



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN OKSİDATİF STRES,
DNA FRAGMENTASYONU, KROMATİN YAPI VE mTOR
EKSPRESYONUNDA MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLER
İLE SPERM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

MELEK USTA

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi SEDA KARABULUT

İSTANBUL

2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi: Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Tez Sahibi : Melek USTA
Tez Başlığı : Sperm Kriyoprezervasyonunun Oksidatif Stres, DNA
Fragmantasyonu, Kromatin Yapı ve mTOR Ekspresyonunda
Meydana Getirdiği Değişiklikler ile Sperm Parametreleri
Üzerine Etkisinin İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 25.07.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Dr.Öğr.Üyesi Seda KARABULUT	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<u>Sınav Jüri Üyeleri</u>		
Doç.Dr. İlknur KESKİN	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Doç.Dr. Zeynep Birsu ÇİNÇİN	Nişantaşı Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

MELEK USTA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen, değerli görüşleri ve yönlendirmeleriyle tecrübelerinden faydalandığım çok kıymetli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Seda KARABULUT'a ve anabilim dalı başkanımız İlknur KESKİN'e ve Emb. Pelin KUTLU'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sürecinde büyük yardımları dokunan arkadaşlarım Can ATAMBAY, Şeyda DÜRMEİİ ve Aylin YAŐAR'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan başarılarımın temel kaynağı sevgili annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli arkadaşlarım Ayşenur İrem TATLİGÜİ, Gülay AKKAYA ve Kıymet Merve UZUN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
RESİMLER LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1. İnfertilite.....	8
4.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	8
4.3. Sperm Kriyoprezervasyonu.....	10
4.4. Sperm Çözme Yöntemleri.....	12
4.5. Kriyoprezervasyonun Etkileri	12
4.6. Kriyohasara Karşı Kullanılan Stratejiler	14
4.6.1. Kriyoprotektanlar	14
4.6.2. Antioksidanlar	15
4.6.3. Antifriz proteinleri (AFP)	16
4.6.4. Diğer savunma stratejileri	17
4.7. Sperm Kriyoprezervasyonunda Moleküler Değişiklikler	17
4.7.1. Spermde hücresel ve proteomik değişiklikler	18
4.7.2. Spermde epigenetik değişiklikler	19
4.8. Sperm DNA Hasarı	20
4.9. Sperm DNA Hasarına Neden Olan Faktörler.....	21
4.10. Sperm DNA Yapısı	22
4.11. Sperm DNA Fragmantasyonu Nedenleri	25
4.12. Sperm DNA Hasarını Değerlendiren Test Sistemleri	26

4.13. Oksidatif Stres	30
4.14. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi.....	32
4.14.1. Endojen kaynaklar.....	32
4.14.2. Eksojen kaynaklar	34
4.15. Oksidatif Stresin DNA Hasarındaki Rolü	37
4.16. Oksidatif Stres ve Semen Parametreleri.....	38
4.17. Oksidatif Stres ve Spem Kriyoprezervasyonu	38
4.18. Fosfoinositol-3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT)/rapamisinin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağı	39
4.18.1. Fosfatidil-inositol-3-kinazlar (PI3K)	40
4.18.2. Rapamisinin memeli hedefi (mTOR).....	41
4.19. Rapamisin ve Erkek Fertilitesi	42
4.20. mTOR, Testis Fizyoloji ve Sertoli Hücre Fonksiyonu.....	43
5. MATERYAL VE METOT	46
5.1. Hasta Gruplarının Seçilmesi ve Semen Örneklerinin Toplanması	46
5.2. Semen Örneklerinin Hazırlığı	46
5.3. Sperm Kriyoprezervasyonu.....	47
5.4. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi	49
5.4.1. Total oksidan seviyesi	49
5.4.2. Total antioksidan seviyesi	50
5.5. DNA Fragmantasyon Analizi.....	51
5.6. Kromatin Yapı Analizi.....	52
5.7. mTOR Proteinini İmmünohistokimyasal Analizi	53
5.7.1. Kimyasal maddeler ve solüsyonlar	53
5.7.2. mTOR proteini immünohistokimyasal analiz protokolü.....	54
5.8. İstatistiksel Analiz.....	57
6. BULGULAR	58
6.1. Sperm Parametreleri.....	58
6.2. Oksidatif Stres Parametreleri	58
6.3. DNA Fragmantasyon Analizi.....	60
6.4. Kromatin Yapı Analizi.....	63
6.5. mTOR Proteinini İmmünohistokimyasal Ekspresyonu.....	67

7. TARTIŞMA	74
7.1. Sperm Parametreleri.....	75
7.2. Oksidatif Stres Parametreleri	76
7.3. Sperm Kromatin Yapısı ve DNA Fragmantasyonu	78
7.4. mTOR Protein Ekspresyonu	81
8. SONUÇ.....	83
9. KAYNAKLAR.....	84
10. ETİK KURUL ONAYI.....	112
11. ÖZGEÇMİŞ.....	116



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- OH:** Hidroksil radikalleri
¹O₂: Singlet oksijen
8-OHdG: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin
8-OHG: 8-hidroksiguanine
ACO2: Aconitate hidrataz mitokondriyal 2 aconitase 2
AFGP: Antifriz glikoproteinleri
AFP: Antifriz proteinler
AFPIII: Antifriz protein 3
AIFM1: Apoptosis inducing factor mitochondria associated 1
AKT: Protein kinaz B
AO: Akridin oranj
ASRM: Amerikan üreme tıbbi derneği
ATP: Adenozin trifosfat
BCL-2: B-cell lymphoma 2
CAT: Katalitik
CMA3: Kromomisin A3
COMET: Tek hücre jel elektroforezi
DFI: DNA fragmantasyon indeksi
dH₂O: Distile su
dk: Dakika
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
DSÖ: Dünya sağlık örgütü
DTT: Ditiotreitol
dUTP: Deoxyuridine Triphosphate
EAU: Avrupa üroloji derneği
EBK: Endokrin bozucu kimyasallar
ETZ: Elektron taşıma zinciri
FasL: Fas-ligand
FSH: Folikül uyarıcı hormon

G6PD: Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
GP: Geçiş proteinleri
GPx: Glutatyon peroksidaz
GSH: Glutatyon
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HOCl: Hipokloröz asit
HPG: Hipotalamus-hipofiz-gonad
ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IUI: İntrauterin inseminasyon
IVF: İn vitro fertilizasyon
iNOS: İndüklenebilir NOS
kDa: Kilodalton
KO: Knock-out
KTB: Kan-testis bariyeri
LH: Lüteinizan hormon
LLLI: Low-Level Laser Irradiation
LN₂: Sıvı nitrojen
LPO: Lipid peroksidasyon
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
mil: Milyon
miRNA: Mikro-ribonükleik asitler
mL: Mililitre
mLST8: Mammalian lethal with sec-13 protein 8
MMP-9: Matris metalopeptidaz 9
MMP: Matriks metalloproteinaz
MPO: Miyeloperoksidaz
mPTP: Mitochondrial permeability transition pores
mRNA: Mesajcı ribonükleik asit
MtDNA: Mitokondriyal DNA
mTOR: Rapamisinin memeli hedefi
mTORC1: mTOR kompleksi 1
mTORC2: mTOR kompleksi 2

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
nNOS: Nöronal NOS
NO: Nitrik oksit
NO•: Nitrik oksit radikali
NOS: Nitrik oksit sentaz
O₂⁻: Süperoksit anyonları
O₂•⁻: Süperoksit radikalleri
OH⁻: Hidroksil radikalleri
ONOO⁻: Peroksinitrit
OS: Oksidatif stres
OSI: Oksidatif stres indeksi
PBS: Phosphate buffered saline
PDK1: Fosfoinositid-bağımlı kinaz-1
PFA: Paraformaldehit
PI-4,5-P2: Fosfatidilinositol-4,4-bifosfat substratından
PI: Propidium iyodür
PI3,4,5-P3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat
PI3K: Fosfoinositol-3-kinaz
PKB: Protein kinaz B
PRM: Protamin
PRM1: Protamin tip 1
PRM2: Protamin tip 2
PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri
ROT: Reaktif oksijen türleri
rpm: Dakikadaki dönme sayısı
SCD: Sperm kromatin dispersiyonu
SCSA: Sperm kromatin yapısı tayini
SDF: Sperm DNA fragmantasyonu
SDS: Sodyum dodesil sülfat
SOD: Süperoksit dismutaz
SOD1: Süperoksit dismutaz 1

TAS: Total antioksidan seviyesi

TB: Toluidin Blue

TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase

TESE: Testiküler sperm ekstraksiyonu

Topo II: Endojen nükleaz topoizomeraz II

TOS: Total oksidan seviyesi

TUNEL: Terminal uridine nick-end labeling

UV: Ultraviyole

YÜT: Yardımcı üreme teknolojisi

µl: Mikrolitre



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1 Dünya Sağlık Örgütü semen parametre değerleri	10
Tablo 6.1 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda ortalama sperm parametreleri	58
Tablo 6.2 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda oksidatif stres parametreleri	59
Tablo 6.3 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda DNA fragmantasyon indeksi (DFI)	60
Tablo 6.4 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda DNA Hasarı.....	64
Tablo 6.5 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda immün reaktivite skoru (IRS).....	67

RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.1 Sperm kriyoprezervasyonu işlemi	48
Resim 5.2 Seminal sıvı oksidatif stres parametrelerinin analizi.....	50
Resim 5.3 İmmünohistokimyasal analiz basamakları	56
Resim 6.1 Çalışmaya katılan hastaların sperm hücrelerinin SCD yöntemiyle belirlenen DNA fragmentasyon analizinin ışık mikroskopik görüntüsü ...	61
Resim 6.2 15 ve 24 numaralı hastalara ait sperm hücrelerinin SCD yöntemiyle belirlenen DNA fragmentasyon analizinin ışık mikroskopik görüntüsü ...	62
Resim 6.3 Kriyoprezervasyon işlemi sonrası çözülen semen örneğinin Annexin V-PI yöntemiyle DNA fragmentasyonu analiz sonuçları.....	63
Resim 6.4 Toluidin Blue ile sperm kromatin bütünlüğü değerlendirilen sperm hücreleri görüntüsü	65
Resim 6.5 7 numaralı hastaya ait sperm hücrelerinin Toluidin Blue analizinin ışık mikroskopik görüntüsü	66
Resim 6.6 10 numaralı hastanın kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerindeki mTOR proteini ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü	69
Resim 6.7 34 numaralı hastanın çözme işlemi sonrası sperm hücrelerindeki mTOR proteini ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüleri	70
Resim 6.8 3 numaralı hastanın kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerindeki mTOR proteini ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü	72
Resim 6.9 Kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve sonrası sperm hücrelerindeki mTOR proteini ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü.	73

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 Standart semen analizi	9
Şekil 4.2 Kriyoprezervasyon işlemi uygulanmış sperm hücrelerinin mitokondrilerinde ROT üretimi	13
Şekil 4.3 Sperm DNA fragmentasyonunun nedenleri.....	22
Şekil 4.4 Spermiyogenez sırasında kromatin değişikliklerinin ve sperm kromatininin DNA fragmentasyonuna duyarlı bölgelerinin şematik gösterimi	25
Şekil 4.5 ROT kaynakları	32
Şekil 4.6 PI3K/Akt/mTOR yolağının şematik gösterimi.....	40
Şekil 4.7 mTOR sinyalizasyonunun düzenlemesini etkileyen upstream sinyalleri ...	42
Şekil 4.8 mTOR inhibisyonu veya yokluğunun testis hücreleri ve spermatogenez üzerindeki bilinen etkilerini gösteren şematik gösterim	45
Şekil 5.3 HaloSperm yöntemiyle sperm boyaması	52
Şekil 6.1 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda oksidatif stres indeksi	59
Şekil 6.5 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda DNA Hasarı	64
Şekil 6.8 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda immün reaktivite skoru (IRS).....	67

1. ÖZET

SPERM KRIYOPREZERVASYONUNUN OKSİDATİF STRES, DNA FRAGMENTASYONU, KROMATİN YAPI VE mTOR EKSPRESYONUNDA MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLER İLE SPERM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dünya Sağlık Örgütüne göre 1 yıl düzenli ve korunmasız cinsel birlikteliğe rağmen gebelik elde edilememesi infertilite olarak tanımlanmaktadır. İnfertil çiftlerin yaklaşık %50'sinde erkek faktörünün primer veya katkıda bulunan faktör olduğu düşünülmektedir. Günümüzde, infertilite dahil olmak üzere farklı sebeplerle spermin dondurularak saklanması sperm kriyoprezervasyonu olarak bilinmektedir. İşlem sırasında, soğuk şoku ve buz kristali oluşumunun indüklenmesi ile sperm parametreleri, DNA ve hücresel yapılar olumsuz etkilenmekte, fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesinin düştüğü öne sürülmektedir. Rapamisinin memeli hedefi (mTOR), biyolojik homeostazın merkezi düzenleyicisi ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağında fonksiyon gösteren anahtar bir kinazdır. Erkek üreme sisteminin birçok aşamasında yer alan mTOR sinyalizasyonu üzerinde yapılmış kapsamlı çalışmalara rağmen, işlevleri ve nasıl koordine edildikleri belirsizliğini korumaktadır, mTOR'un olgun spermdeki rolü ise hala bilinmemektedir. Bu çalışmada tüp bebek tedavisine başvuran 20 hastanın semen numuneleri ile çalışılmış, kriyoprezervasyon işleminin oksidatif stres parametreleri, DNA fragmentasyonu, kromatin yapı ve mTOR proteininin ekspresyon seviyesinde meydana getirdiği değişiklikler ile sperm parametreleri üzerine etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Kriyoprezervasyon sonrasında öncesine kıyasla DNA fragmentasyonu ve mTOR proteini ekspresyonu artmış; ve kromatin bütünlüğünde istatistiksel olarak anlamlı bir bozulma gözlenmiştir. Sonuçlarımız, sperm kriyoprezervasyon işleminin DNA fragmentasyonuna sebep olduğu, aynı zamanda kromatin yapısına zarar verdiği bu durumun da mTOR sinyal yolağını aktive ettiğini göstermiştir. Konu ile ilgili yapılacak kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır bununla birlikte çalışmamız, kriyoprezervasyon işleminin olgun sperm hücresindeki mTOR ekspresyonu ile ilişkilendirilen ilk çalışmadır ve bu sinyal yolağı ile ilgili yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: DNA fragmentasyonu, kriyoprezervasyon, mTOR, oksidatif stres, sperm

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CHANGES CAUSED BY SPERM CRYOPRESERVATION IN OXIDATIVE STRESS, DNA FRAGMENTATION, CHROMATIN STRUCTURE AND mTOR EXPRESSION AND ITS EFFECTS ON SPERM PARAMETERS

According to the World Health Organization, infertility is defined as the inability to achieve pregnancy despite 1 year of regular and unprotected sexual intercourse. The male factor is thought to be the primary or contributing factor in approximately 50% of infertile couples. Today, freezing of sperm for different reasons, including infertility, is known as sperm cryopreservation. During the procedure, it is suggested that sperm parameters, DNA and cellular structures are adversely affected by cold shock and induction of ice crystal formation, and fertilization rate and embryo quality decrease. The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central regulator of biological homeostasis and a key kinase that functions in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Despite extensive studies of mTOR signaling at many stages of the male reproductive system, their function and how they are coordinated remains unclear, while the role of mTOR in mature sperm is still unknown. In this study, semen samples of 20 patients who applied for in vitro fertilization were studied, and it was aimed to analyze the effects of cryopreservation on oxidative stress parameters, DNA fragmentation, chromatin structure, changes in the expression level of mTOR protein and sperm parameters. After thawing, DNA fragmentation and mTOR protein expression increased; chromatin integrity decreased compared to pre-freeze samples. Our results showed that the sperm cryopreservation process causes DNA fragmentation and also damages the chromatin structure, which also activates the mTOR signaling pathway. Further research is needed on this subject, however, our study is the first study to correlate the cryopreservation process with mTOR expression in mature sperm cells, and we think that it will contribute to the studies to be done on this pathway.

Keywords: cryopreservation, DNA fragmentation, mTOR, oxidative stress, sperm

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, 1 yıl düzenli ve korunmasız cinsel birlikteliğe rağmen gebelik elde edilememesi ile tanımlanan erkek veya kadın üreme sistemi ile ilgili bir sağlık sorunudur (1). İnfertilite tüm dünyada üreme çağındaki kadınlar, aileler ve topluluklar olmak üzere milyonlarca insanı etkilemektedir. Tüm dünyada 48 milyon çift ile 186 milyon kişinin infertilite sorunu yaşadığı (2, 3), infertilite prevalansının %8-12 arasında olduğu ve çiftlerin yaklaşık %50'sinde erkek faktörünün primer veya katkıda bulunan faktör olduğu düşünülmektedir (4).

Erkek infertilitesinin, genetik mutasyonlar, yaşam tarzı faktörleri, tıbbi hastalıklar, kullanılan ilaçlar gibi çeşitli nedenleri bulunmaktadır. Deoksiribonükleik asit (DNA) fragmantasyonu, kapasitasyon ve ileri baba yaşını inceleyen son çalışmalar da daha önce bilinmeyen konulara ışık tutmaktadır (5). Kemoterapi ve radyasyon tedavisi de fertilitiyi olumsuz etkileyen nedenler arasındadır. Bu durum azospermi olarak bilinen ejakülat sıvısında hiç sperme rastlanmaması durumuna yol açabilmektedir (6, 7). Günümüzde, kanser tedavisine başlamadan önce spermin dondurularak saklanması olarak bilinen sperm kriyoprezervasyonu, erkeklerde fertilitenin korunmasında kullanılan tek yöntemdir (8). Yardımcı üreme teknolojisinde (YÜT), sperm kriyoprezervasyonu infertilite tedavisi ve kanser hastalarında fertilitenin korunması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (9). Günümüzde, insan sperm hücrelerinin dondurularak saklanmasında konvansiyonel dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere iki ana yöntem bulunmaktadır. Geleneksel dondurma, yavaş dondurma olarak da bilinir ve birçok kez insan sperminin dondurularak saklanmasında başarıyla kullanılmıştır. Buna karşılık, vitrifikasyon, son on yılda yapılan çalışmalardan sonra insan sperminin kriyoprezervasyonu için daha etkili hale gelmiştir. Vitrifikasyon, sperm numunelerinin doğrudan sıvı nitrojene daldırılmasına dayanan hızlı, basit ve uygun maliyetli bir yöntemdir (10).

Kriyoprezervasyon sırasında, soğuk şoku ve buz kristali oluşumunun indüklenmesi, sperm hücrelerindeki organellerin tahrip olmasına yol açabilir, sperm motilitesi, mitokondriyal aktivite ve canlılık gibi birçok sperm parametresini olumsuz etkileyebilir (11, 12). Ayrıca, sperm hücresinin erken kapasitasyonunu başlatabilir (13). Aynı zamanda hücresel bileşiklerin oksidasyonunun yanı sıra, DNA, akrozom ve

plazma membranı gibi hücresel yapıların bozulması ve hasar görmesiyle fertilizasyon oranını ve embriyo kalitesini düşürdüğü öne sürülmektedir (12, 14). Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonları (O_2^-) ve hidroksil radikalleri (OH^-) gibi reaktif oksijen türleri (ROT) apoptozu, membran lipid peroksidasyonunu, mitokondri ve DNA hasarını indükleyebilir (15). DNA fragmantasyonu olmasa bile, spermelerin dondurulup çözülmesinden sonra bazı genom bölgelerinde önemli DNA hasarlarının tespit edilebileceği düşünülmektedir (16, 17). DNA değişikliklerinin başlıca nedeni, apoptoz gibi diğer süreçlerden ziyade kriyoprezervasyon sırasında ROT'ların artması gibi görünmektedir (18-20). Oksidatif stres (OS) kaynaklı meydana gelen DNA hasarları arasında abazik bölgelerin oluşumu, çapraz bağlanma, nitrojen bazlarında modifikasyon ve DNA zincir kırılmaları gösterilebilir (21, 22). Kriyoprezervasyonun sperm parametreleri üzerindeki etkisinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Sperm hücresinin gen ve protein ekspresyonu, mesajcı ribonükleik asit (mRNA) stabilitesi ve epigenetik içeriğinin kriyoprezervasyon işlemi sırasında modüle edildiği düşünülmektedir. Valcarce ve ark. yaptığı çalışmada sperm kriyoprezervasyonunun fertilité ile ilgili anahtar genlerin ekspresyonunu etkileyebildiği gösterilmiştir (17). Yapılan bazı çalışmaların bulgularına dayanarak, kriyoprezervasyon ve fertilité prosedürlerini optimize etmek için kriyoprezervasyon sırasında bazı genlerin transkript seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin iyi tanımlanması gerekmektedir (23).

Bir organizmanın optimal işleyişi için dengenin sağlandığı iç koşullarının durumuna homeostaz adı verilir. Bu denge, hücre büyümesi, çoğalması ve apoptoz gibi temel süreçleri tehlikeye atabilecek iç ve dış uyaranlar tarafından sürekli olarak tehdit edilmektedir. Bu süreçler, karmaşık sinyal yollarını tetikleyen besinler ve hormonlar dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından düzenlenir. Rapamisinin memeli hedefi (mTOR), bu sinyal yollarından biridir; protein sentezi, glukoz metabolizması ve hücre iskeleti organizasyonu ile ilişkili olarak biyolojik homeostazın merkezi düzenleyicisi olarak son on yılda ortaya çıkmıştır (24, 25). Hücresel metabolizmayı düzenleyen mTOR, tüm memeli ve memeli olmayan hücrelerde bulunmaktadır ve yaklaşık 290 kilodalton (kDa) ağırlığında olan, iyi korunmuş bir Serin/Treonin protein kinazdır (25). Bu kinaz, çekirdek bileşenle ilişkili proteinlere bağlı olarak işlevsel ve yapısal olarak farklı iki biçimde bulunur: mTOR kompleksi 1

(mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) (26, 27). Fosfoinositol-3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT)/mTOR sinyal yolağı, spermatogenez sırasında hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) aksının dzenlenmesi, spermatogonyum ve somatik hcrelerin proliferasyonu ve farklılaşması ve özellikle endokrin bozucu kimyasallar (EBK) başta olmak üzere çevresel kirleticilerin varlığında sperm otofajisi ve testis endokrin fonksiyonunun dzenlenmesi dahil olmak üzere erkek ureme sisteminin birçok aşamasında yer aldığı bildirilmiştir (28). mTOR, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağında AKT'nin hem yukarı hem de aşağı yonunde fonksiyon gosteren anahtar bir kinazdır (29). mTOR, ozellikle spermatogenez sırasında beslenmede onemli bir rol oynayan Sertoli hcrelerinin redoks dengesini ve metabolik aktivitesini dzenlemenin yanı sıra spermatogonyal kock hcrelerin korunmasında ve farklılaşmasında onemli bir rol oynar (28). mTOR'un erkek fertilitisini dzenlediği mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır, ancak her iki tur (mTORC1 ve mTORC2), spermatogenez sırasında kan-testis bariyeri (KTB) dinamiklerinin dzenlenmesinde rol oynamaktadır (30). mTOR'un inhibisyonunun veya yokluğunun sperm uretiminde ve motilitede azalma ile sonuclandığı bildirilmiştir (30). mTORC1, buyume faktoreri, stres sinyalleri ve amino asit durumu dahil olmak üzere ceşitli kaynaklardan gelen sinyalleri entegre eder. Bu sinyallere gore protein ve lipit sentezini, ribozom biyogenezini, hucre metabolizmasını ve adenosin trifosfat (ATP) uretimini teşvik eder, bu sayede hucre buyumesini regule edebilir, aynı zamanda otofajiyi inhibe etmede onemli bir role sahiptir. mTORC2 ise, downstream hedefleri fosforile eden AKT aracılığıyla hucre proliferasyonu, metabolizması ve hucre iskeleti organizasyonunda rol oynar (31). Sonucl olarak, mTOR sinyalizasyonu uzerinde yapılmış kapsamlı calışmalara rağmen, işlevleri ve nasıl koordine edildikleri belirsizliğini korumaktadır. mTOR sinyal yolağında yer alan proteinlerin spermdeki rolu ise hala bilinmemektedir.

Superoksit radikalleri ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 , hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) ve singlet oksijen (1O_2) başlıca radikallerdir. OS ise, hcrelerde ve dokularda ROT uretimi ve birikimi ile biyolojik bir sistemin bu reaktif urunleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir fenomendir. ROT, hucre sinyalleşmesi gibi fizyolojik olaylarda rol alır ve bunlar normalde oksijen metabolizmasının yanı urunleri olarak uretilir; bununla birlikte ultraviyole (UV), iyonlaştırıcı radyasyonlar, kirleticiler

ve ağır metaller gibi çevresel faktörler ve ksenobiyotikler ROT üretimini büyük ölçüde artırır, bu durumun hücre ve doku hasarına yol açan dengesizliğe yani oksidatif strese neden olduğu iddia edilmektedir (32).

Sperm kriyoprezervasyonu, OS ve ROT üretimi ile ilişkilidir ve ROT kaynaklı hasara yol açtığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarla kriyoprezervasyonun spermdeki antioksidan etkinliğinde azalmaya neden olduğu ve spermelerin ROT hasarına daha yatkın hale geldiği öne sürülmektedir. Bununla birlikte, kriyoprezervasyon sonrasında yüksek miktarda ROT içeren sperm örneklerinde motilite ve canlılık oranlarının anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (33). Oksidatif stres, hücre hasarının yanında birçok hücrede mTOR yolağını aktive ettiği öne sürülmüştür (34). Spermde kriyoprezervasyon sonrası meydana gelen oksidatif hasarın mTOR sinyal yolağı üzerindeki rolü bilinmemektedir.

Protaminasyon sürecindeki başarısızlıklar, apoptoz ve ROT etkisi DNA fragmentasyonunun en önemli nedenleri olarak kabul edilir (35). Kriyoprezervasyon ve çözme prosedürleri kaspazı aktive edebilir ve apoptozu indükleyebilir. İnsan sperm kriyoprezervasyonu, sperm membran bütünlüğü, akışkanlığı, mitokondriyal metabolik aktivitesi, morfolojisi, sperm proteomu ve transkriptomda değişiklikler meydana getirerek spermde pek çok kriyohasara neden olabilmektedir (36). Literatürde kriyoprezervasyonun herhangi bir sperm DNA fragmentasyonuna neden olup olmadığı konusunda bir fikir birliği yoktur. Çalışmaların çoğu kriyoprezervasyonun DNA hasarına neden olduğunu öne sürerken (37, 38), araştırmacıların bir kısmı bu sonuçların eşlik eden farklı faktörlerden kaynaklanabileceğini iddia etmektedir (39, 40). DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesinde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) Deoxyuridine Triphosphate (dUTP) Nick End Labeling Assay (TUNEL), Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (COMET), Sperm Kromatin Yapısı Tayini (SCSA) ve Sperm Kromatin Dispersiyonu (SCD) gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır (33). Sperm kromatin bütünlüğünü ve paketlenmesindeki bozuklukları değerlendirmede kullanılan temel boyalardan biri Toluidine Blue (TB) boyasıdır. Kromatin anormallikleri ve fragmente DNA içeren sperm nükleusunda daha fazla fosfat grubu bulunur. Bu fosfat grupları TB gibi bazik boyalara bağlanmaya daha eğilimlidir. TB boyamasıyla metakromatik boyanan hücrelerde zayıf bir DNA bütünlüğünün olduğu, DNA kırıklarının mevcut olduğu gösterilir (41).

Bu çalışmada sperm kriyoprezervasyonu işleminin seminal plazma OS parametreleri, DNA fragmantasyonu, kromatin yapı ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerindeki mTOR proteininin ekspresyon seviyesinde meydana getirdiği değişiklikler ile sperm parametreleri üzerine etkilerinin kapsamlı olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfertilite

Dünya sağlık örgütü (DSÖ), en az 12 ay düzenli, korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebe kalamama durumunu infertilite olarak tanımlamaktadır (42). İnfertilite dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur ve üreme çağındaki çiftlerin %8-12'sini etkilediği tahmin edilmektedir (43). The Global Burden of Disease'in yaptığı bir araştırmada, 1990 ile 2017 yılları arasında, yaşa göre standardize edilmiş infertilite prevalansının kadınlarda yıllık %0,370, erkeklerde ise %0,291 arttığı bildirilmiştir (44). Aynı zamanda infertilite, önemli psikolojik ve sosyal sıkıntılara neden olmakta (45, 46), hastalar ve sağlık sistemleri üzerinde önemli bir ekonomik yük oluşturmaktadır (47).

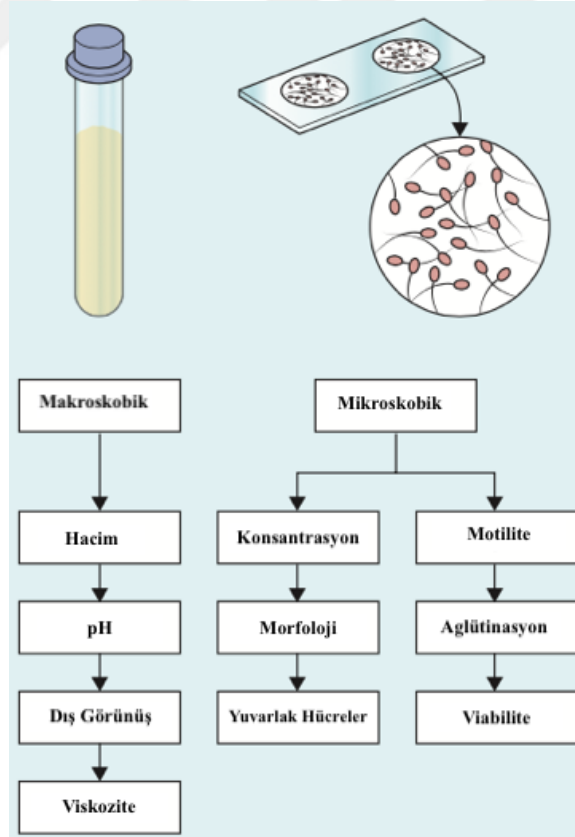
Konjenital, edinsel ve idiyopatik olarak sınıflandırılabilen çok sayıda neden ve risk faktörü, erkek infertilitesinin insidansının artmasına katkıda bulunur (48). Erkek infertilitesinin bilinen başlıca genetik nedenleri, kistik fibroz gen mutasyonları ile ilişkili vas deferensin konjenital bilateral yokluğu, Kallmann sendromu (49), testis fonksiyonunun bozulmasına yol açan kromozomal anormallikler ve izole spermatogenik defektlerle sonuçlanan Y kromozomu mikrodelsiyonlardır. Erkek infertilite vakalarının yaklaşık %30-50'si idiyopattır ve belirgin bir neden veya katkıda bulunan kadın infertilitesi yoktur (50, 51). Oksidatif stres, sperm hücresi disfonksiyonunun başlıca nedeni olduğu düşünülmekte ve spermin hem yapısal hem de işlevsel bütünlüğünün bozulması nedeniyle erkek infertilitesinin etiolojisine katkıda bulunan önemli bir faktör olduğu öne sürülmektedir (50). Toksik kimyasallara çevresel veya mesleki maruziyet (52) ve sigara içimi (53), alkol tüketimi (54), uyuşturucu kullanımı (55) obezite (56) ve psikolojik stres (57) gibi çeşitli yaşam tarzı faktörleri erkek infertilitesi için potansiyel risk faktörleridir.

4.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Erkek infertilitesinin ilk değerlendirilmesinde tıbbi ve üreme öyküsü ve en az bir semen analizi Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) ve Avrupa Üroloji Derneği

(EAU) tarafından önerilmektedir (58, 59). İlk değerlendirme sonuçlarına göre, tam bir tıbbi öykü alımı ve fiziki muayene gibi kapsamlı bir değerlendirme için bir uzmana sevk edilmesi önerilir. Sonuçlara bağlı olarak, daha ileri androlojik değerlendirmeler ve prosedürler tavsiye edilebilir.

DSÖ, erkek fertilité potansiyelinin değerlendirilmesinde ilk adım olarak klasik semen analizini önermektedir. Semen ortam sıcaklığına bağılı değişikliklere maruz kalmaması için numune laboratuvara yakın bir odada verilmelidir. Bir diğer önemli faktör ise cinsel perhiz süresidir ve bu süre en az iki, en çok yedi günlük olmalıdır. Ejakülat sperm için toksik olmayan cam veya plastik bir kap içine alınmalıdır. Semen likefiye olurken numune kabı 37°C bir inkübatörde bekletilir. Numunenin makroskopik incelemesinde ejakülatın görünümü, semen hacmi, semen pH'sı değerlendirilir. İlk mikroskopik değerlendirmede mukus iplikçik oluşumu, sperm agregasyonu, sperm dışında hücrelerin varlığı, sperm motilitesi, vitalitesi, sayısı, morfolojisi DSÖ parametrelerine göre değerlendirilir (42, 60) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Standart semen analizi (Agarwal A., 2020)

DSÖ, insan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla 1980'den beri laboratuvar kitapçıkları yayınlamıştır (42). En güncel olanı ise 2010'da yayınlanan kitapçığıdır (42). Semen parametreleri için önerilen eşik değerler, yıllar içinde değiştirilerek yenilenmiştir, ancak semen kalitesiyle ilgili terminoloji değişmeden kalmıştır (Tablo 4.1). DSÖ kitapçığının en son baskısında gösterilen alt referans limitleri, dünyanın dört bir yanından 1953 fertil erkeğin semen parametrelerinin istatistiksel analiziyle oluşturulmuştur.

Günümüzde klasik semen analizinin yanı sıra yarı otomatik ve tam otomatik bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri de geliştirilmiştir. Sperm morfolojisini doğru bir şekilde değerlendirmesindeki eksikliklere rağmen, (61, 62) bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri birçok androloji ve in vitro fertilizasyon (IVF) kliniğinde semen parametrelerinin doğru bir şekilde ölçülmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (63).

Tablo 4.1 Dünya Sağlık Örgütü semen parametre değerleri (77)

	WHO 1980	WHO 1987	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010
Hacim	Belirtilmemiş	≥ 2,0 mL	≥ 2,0 mL	≥ 2,0 mL	≥ 1,5 mL
Sperm konsantrasyonu	20-200 x10 ⁶ /mL	≥ 20 x10 ⁶ /mL	≥ 20 x10 ⁶ /mL	≥ 20 x10 ⁶ /mL	≥ 15 x10 ⁶ /mL
Total sperm sayısı	≥ 40 x10 ⁶ /mL	≥ 40 x10 ⁶ /mL	≥ 40 x10 ⁶ /mL	≥ 40 x10 ⁶ /mL	≥ 39 x10 ⁶ /mL
Sperm motilitesi (% progresif)	≥ 60%	≥ 50%	≥ 50%	≥ 50%	≥ 32%
Sperm vitalitesi	Belirtilmemiş	≥ 50%	≥ 75%	≥ 75%	≥ 58%
Sperm morfolojisi	≥ 80,5%	≥ 50%	≥ 30%	≥ 15%	≥ 4%

4.3. Sperm Kriyoprezervasyonu

Kemoterapi ve radyoterapi gibi sitotoksik ve cerrahi tedaviler testis yetmezliğine veya ejakülasyon disfonksiyonuna yol açabilir (64, 65). Bu gibi durumlarda sperm kriyoprezervasyonu fertilitiyi korumak için uygun bir çözüm olabilir; kriyoprezervasyon işlemi sonrası çözölen semen, intrauterin inseminasyon (IUI), IVF veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için kullanılabilir (9). Kriyoprezervasyon yöntemi, testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) geçirmiş azospermik hastalardan elde edilen spermleri korumak için yaygın olarak

kullanılmaktadır (66). Hayvanlarda suni tohumlama işleminde, verimli klonların oluşturulmasında genetik iyileştirme oranını artırmak amaçlı dondurulmuş-çözölmüş spermeler yaygın olarak kullanılmaktadır (67, 68). İlk olarak 1938'de kurbağa spermının vitrifikasyonu, Luyet ve Hoddap tarafından gerçekleştirilmiştir (69). Polge ve ark., Londra'daki Ulusal Tıp Araştırmaları Enstitüsü'nde, çeşitli türlerden alınan sperm örneklerini gliserol ile başarılı bir şekilde dondurduktan sonra, "Spermilerin yeniden canlanması" iddiasını ortaya atmıştır (70). İlk kez 1953 yılında Iowa Eyalet Üniversitesi'nde iki araştırmacı tarafından yayımlanan rapora göre kuru buz üzerinde dondurulan sperm sonrasında çözölmüş ve ilk canlı doğum gerçekleştirilmiştir (71). Yaklaşık on yıl sonra, aynı grup sıvı nitrojen (LN₂) ile kriyoprezervasyon gerçekleştirilmiş ve başarılı olmuştur (72). LN₂'de 40 yıl saklandıktan sonra dondurulmuş spermde canlı doğumlar elde edildiği bildirilmiştir (73). Sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonu, hastalarda onkolojik nedenlerle, genetik, inflamatuvar hastalıklar veya üreme tıbbi teknikleri nedeniyle fertilitiyi korumak için uygulanabilmektedir (74).

İnsan ve hayvan sperm hücrelerinin dondurularak saklanması için birçok teknik mevcuttur. Son yıllarda sperm dondurma teknolojisine çeşitli prosedürler eklenmiştir (75). İnsan spermının dondurularak saklanmasında uygulanan, geleneksel dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere iki ana yöntem vardır. Geleneksel bir teknik olan konvansiyonel yavaş dondurma, geçmişten günümüze insan spermının dondurularak saklanmasında kullanılmıştır. Vitrifikasyon ise yeni bir tekniktir ve hızla büyüyen alternatif bir hızlı dondurma yöntemi olmuştur. Vitrifikasyon, sperm numunelerini doğrudan LN₂'ye daldırarak uygulanan hızlı, basit ve uygun maliyetli bir yöntemdir. Vitrikiye sperm kullanılarak gerçekleştirilen ICSI (76) ve IUI yöntemiyle (77) gebelik ve canlı doğumlar elde edilebilmektedir. Geleneksel kriyoprezervasyon teknikleri, tüm dünyada YÜT kliniklerinde hala yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak vitrifikasyon, son on yılda yapılan çalışmalardan sonra insan spermının kriyoprezervasyonu için daha etkili hale gelmiştir (78). Le ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada vitrifikasyon ve yavaş dondurma yöntemleri karşılaştırılmış (79) ve konvansiyonel dondurmanın daha yüksek motilite ve canlılık ile sonuçlandığı, vitrifikasyona tabi tutulan spermelerin morfolojik açıdan daha sağlıklı olduğu ve sperm baş, orta parça ve kuyruk defektlerinin daha az olduğu gösterilmiştir

(79). Pabon ve ark. (80), vitrifikasyon ve konvansiyonel dondurma protokollerinin etkinliğini karşılaştırmıştır. Vitrifikasyon protokolünün uygulanması daha iyi motilite ve daha yüksek mitokondriyal aktivite ile sonuçlandığından vitrifikasyonun sperm kriyoprezervasyonu için optimal olduğunu bulmuşlardır (80). Benzer sonuçlar daha önce başka araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (81-83).

4.4. Sperm Çözme Yöntemleri

Çözme prosedürü de dondurma prosedürü kadar önemli bir adımdır. Bu aşamada, ani termal değişikliklerden mümkün olduğunca kaçınmaya çalışarak hücrenin normal biyolojik aktivitelerinin geri kazanılmasına izin verilmelidir. Genel olarak, kriyoprezervasyon protokollerinde çözme sıcaklığı olarak 37°C kullanılır. Daha yüksek çözme sıcaklıkları hücre hasarıyla ilişkili riskler nedeniyle kullanılmamaktadır (84). Günümüzde, birçok çözme tekniği kullanılmaktadır. Genellikle semen çözüldükten sonra kültür medyumunda yıkanarak ve santrifüj edilerek kriyoprezervasyon ortamından ayrılır (85).

4.5. Kriyoprezervasyonun Etkileri

İnsan spermlerinin dondurularak saklanması sırasında, lipid peroksidasyonundaki artışa bağlı olarak hücre içi yapılarda ve membranlarda önemli fizikokimyasal hasar meydana geldiği iddia edilmektedir (12, 86). Bu olay, hücrenel bileşiklerin oksidasyonunun yanı sıra DNA, akrozom ve plazma membranı gibi hücrenel yapıların bozulmasına ve hasar görmesine neden olabilmekte, fertilitiyi olumsuz etkilediği bildirilmektedir (12). H_2O_2 , O_2^- ve OH^- gibi ROT apoptozu, membran lipid peroksidasyonunu, mitokondrinin bozulmasını ve DNA hasarını indükleyebileceği (87) ve hücre iskeletinde değişiklikler meydana gelebileceği öne sürülmüştür (76, 88) (Şekil 4.2). Motilitenin en çok etkilenen parametre olduğu bildirilmiştir (40, 89). O'Connell ve ark. 2002'de yaptıkları çalışmada, sperm motilitesindeki azalmanın mitokondriyal hasar ve sperm kuyruğundaki fiziksel değişikliklerden kaynaklandığını öne sürmüştür. Mitokondriyal membranlarda meydana gelen hasarın, enerji üretim sürecini kesintiye uğratarak sperm hücrelerinde

4.6. Kriyohasara Karşı Kullanılan Stratejiler

Yaklaşık 70 yıldır kriyoprezervasyonun sperm hücreleri üzerindeki zararlı etkilerinin azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda, bazı stratejiler önerilmiştir. Savunma stratejileri, sperm hücrelerini hasara karşı korumak için dondurma ortamına farklı katkı maddelerinin eklendiği yöntemlerdir. Bu katkı maddeleri kriyoprotektanlar, antioksidanlar, antifriz proteinler (AFP), yağ asitleri, hayvan serumu, nanopartiküller veya bitkisel esansiyel yağlar olabilir (15).

4.6.1. Kriyoprotektanlar

Sperm yüzeyinde karbonhidrattan zengin bölgede kriyoprezervasyona bağlı değişiklikler sperm plazma membran bütünlüğünü azaltabilir ve fertilite potansiyelini etkileyebilir (66). İyon kanalları gibi proteinlerin içerik ve konumlarındaki değişiklikler, kriyoprezervasyondan sonra membran fonksiyonunun bozulmasının bir başka olası nedenidir. Bu nedenle, spermleri hasara karşı korumak için sperm dondurma ortamına kriyoprotektanlar eklenebilmektedir.

Kriyoprotektanlar, spermleri buz kristalizasyonun neden olduğu donma hasarından korumak için kullanılan düşük moleküler ağırlıklı ve oldukça geçirgen kimyasallardır. İyi bilinen dört ana kriyoprotektan vardır: gliserol, etilen glikol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve 1,2-propandiol (66). Kriyodilüentlerin donma hasarına karşı kriyoprotektif etkisi, hücre içi ve hücre dışı suyun donma noktasının düşürülmesi (90), sitoplazmik bileşenlere nüfuz etmesi, bunlarla etkileşime girmesi, numunenin sıvı fazında bulunan tuzların ve çözünenlerin miktarını azaltarak sperm hücresi içinde buz oluşumunun engellenmesi ve ayrıca sperm membranlarının etrafında koruyucu bir tabaka oluşturulması gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla hareket ettiği bildirilmiştir (90).

Genel olarak kriyoprotektanlar, geçirgen ve geçirgen olmayan olarak iki gruba ayrılır. Gliserol, DMSO, dimetil asetaldehit, propilen glikol ve etilen glikol dahil geçirgen kriyoprotektanlar (66) plazma membranından geçerek ve sperm hücresindeki suyu değiştirdiği bildirilmiştir. Bu tür kriyoprotektanların daha yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (91). Rafinoz, sakaroz,

yumurta sarısı, sitrat, albümin, polietilen glikol ve polivinil piroolidon gibi geçirgen olmayan maddeler, plazma membranından geçemeyen ancak koruyucu özellikler sağlayan yaygın kriyo katkı maddeleridir (66). Son yıllarda, soya fasulyesi lesitini ve düşük yoğunluklu lipoprotein gibi yeni kriyoprotektif takviyeler, insan ve hayvan spermlerinin dondurulmasında değerlendirilmiştir (92). Bu yeni kriyo katkı maddeleri, ROT ile doğrudan mücadele edebilen lipid özelliklerine sahip olduğu bildirilmiştir (93, 94).

Kriyoprezervasyon işlemi sırasında genellikle eşit hacimde semen içine damla damla eklenir, oda sıcaklığında hafifçe karıştırılır ve daha sonra hücreler ve ortam arasında uygun dengenin sağlanması için 10-15 dakika 37°C'ye alınır. Medyumun hücrelerle etkileşime girmesi gereklidir. Gliserol, membran yapısı, lipid çift tabakasının geçirgenliği ve stabilitesi, yüzey proteinlerinin ilişkisi ve hücre metabolizma üzerinde etkili olan insan spermi için yaygın olarak kullanılan nüfuz edici kriyoprotektandır. Gliserol kalitesiz spermlerin dondurulmasına izin vermesine rağmen, membran ve akrozom yapısı üzerinde olumsuz etkileri bulunduğu bildirilmiştir (95). Sherman'ın çalışmaları, gliserol kullanımının membranda dalgalanmalar, akrozomal iç membranda değişiklikler, homojen olmayan nükleus gibi değişikliklere neden olabileceğini göstermiştir (96). Bu gözlemlerin ardından DMSO, 1,2-propandiol gibi başka koruyucu maddeler önerilmiştir.

4.6.2. Antioksidanlar

Son zamanlarda çok sayıda çalışma, dondurma solüsyonlarına antioksidanların eklenmesinin ROT'u nötralize edebileceğini ve çözme sonrası sperm fonksiyonunu iyileştirebileceğini göstermiştir (97, 98). Bazı antioksidanlar çözme sonrası sperm kalitesini iyileştirebilirken, diğerleri bu etkilere sahip değildir (99). Antioksidanlar kimyasal yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere ikiye ayrılırlar. Enzimatik antioksidanlar arasında glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz bulunmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar, E vitamini (α - tokoferol), C vitamini (askorbik asit), glutatyon (GSH), taurin gibi radikal süpürücüler ve antioksidan enzimlerin işlevi için gerekli olan selenyum veya çinko gibi kofaktörlerden oluşur. Bunlar, serbest radikallerle savaşabilen savunma sistemlerini

temsil eder (100-102). Dondurularak saklanan insan sperm hücrelerinde, antioksidan seviyelerinin azaldığı bilinmektedir. Bu duruma yönelik antioksidan tedavisinin uygulanması, insan spermindeki ROT hasarını azaltmak için olası bir strateji olarak ortaya çıkmıştır (103). Bu amaçla ilk yaklaşım olarak, insanlarda hem erkek hem de dişi gametler üzerinde yapılan farklı incelemelerde oral antioksidan takviyesi önerilmiştir (61, 62). Sonrasında, YÜT sırasında kullanılan besiyerlerinde, özellikle kriyoprotektan solüsyonlarında antioksidan takviyesi yaklaşımı önerilmiştir. Bu bağlamda, kriyoprezervasyon işleminde antioksidanların kullanımı çeşitli çalışmalarda kapsamlı bir şekilde tartışılmıştır (4, 64, 65). Yapılan ileri çalışmalarla, antioksidanların, spermlerin motilite, canlılık ve DNA bütünlüğünde meydana gelen hasarı iyileştirdiğini göstermiştir (104, 105).

4.6.3. Antifriz proteinleri (AFP)

AFP ve antifriz glikoproteinleri (AFGP), bazı böcekler ve bitkilerin yanı sıra kutup balıkları gibi ekstrem sıcaklık koşullarına adapte olmuş sayısız türde bulunan biyolojik antifriz ajanlardır (106, 107). Bu bileşenler, donma noktasını düşürerek, buz kristali oluşumunu engeller ve plazma membranlarının fosfolipitlerini ve doymamış yağ asitlerini stabilize ederek etki eder. AFP ve AFGP'nin, sperm dondurma sırasında hücrel membran bütünlüğünü korumaya yardımcı olabileceğine inanılmaktadır (108). AFP'nin insan spermlerinin dondurulmasındaki olası yararlı etkileri ayrıntılı olarak açıklanmamıştır; bununla birlikte, bu bileşiklerin donma-çözme sonrasında bazı türlerin sperm hücrelerinin motilitesini ve canlılığını önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur (109, 110). Hem AFP hem de AFGP, kriyoprezervasyon sırasında boğa sperm hücrelerinin ozmotik direncini artırdığı (111), antifriz protein 3 (AFPIII), tavşan (112) ve bufalo sperm hücrelerinin (113) çözme işlemi sonrasında sperm motilitesini ve plazma membran bütünlüğünü artırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, farklı türlerdeki spermlerin korunması için bir kriyoprezervasyon katkı maddesi olarak AFP kullanımının daha fazla araştırılması gerekmektedir.

4.6.4. Diğer savunma stratejileri

Dondurma medyumunun temel solüsyonu olarak manyetize suyun kullanılması son yıllarda kullanılan bir yöntemdir. Yakın tarihte yapılan bir çalışmaya göre, manyetize bir solüsyonunun domuz sperm hücrelerinin plazma, akrozomal ve mitokondriyal membranlarını dondurarak saklamanın neden olduğu hasara karşı koruyabileceğini göstermiştir (114).

Low-Level Laser Irradiation (LLLI), çözülme sonrası spermlerin kalitesini iyileştirmeye yönelik biyofizik temelli yeni bir yaklaşımdır. Lazer ışınması, fotonik enerjiyi biyolojik bir sisteme sokar, bu enerji ATP'ye dönüştürülür ve daha sonra hücrel metabolizma için kullanılabilir (115). Bu sayede ROT'un azalmasına neden olarak mitokondride oksijen tüketiminin ve ATP restorasyonuna katkıda bulunabilir. Yapılan birkaç çalışma, bu yöntemin, çözme işlemi sonrası sperm hücrelerinin canlılığını, akrozom bütünlüğünü ve ATP üretimini iyileştirebileceğini iddia etmektedir (116). Bu yöntemle, dondurma sırasında sperm hücresinin sağ kalımı artırılabilir (117).

4.7. Sperm Kriyoprezervasyonunda Moleküler Değişiklikler

Sperm kriyoprezervasyonu alanında kaydedilen kapsamlı ilerlemeye rağmen süreçte yer alan biyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. kriyoprezervasyon sonrası düşük sperm kalitesinin nedenleri olarak ani sıcaklık değişiklikleri, buz oluşumu ve ozmotik stres gibi kriyoprezervasyon işlemi sırasındaki çeşitli faktörler öne sürülmüştür. Spermin epigenetik ve proteomik modülasyonu ve sperm kriyoprezervasyon işleminin transjenerasyonel etkileri gibi sperm kriyobiyojisinin yeni yönleri hakkında çok az şey bilinmektedir (118). Sperm kriyoprezervasyonunun, membran geçirgenliği, motilite, metabolizma, apoptoz, kapasitasyon ve fertilizasyon ile ilgili çeşitli hücrel süreçlere katılan proteinleri değiştiren fiziksel değişiklikleri indüklediği iddia edilmektedir (119).

4.7.1. Spermde hücresel ve proteomik değişiklikler

İnsan spermindeki OS, lipid bileşimini, proteinleri ve DNA'yı etkileyerek canlılığı, motiliteyi ve fertilitate potansiyelini olumsuz yönde etkilediği öne sürülmüştür (120, 121); bu nedenle, OS, kriyoprezervasyon sırasında önemli bir hasar mekanizması olarak önerilmiştir. Sperm hücrelerinin dondurulması, ROT üretimini indüklediği ve lipit peroksidasyonuna, DNA fragmantasyonuna, apoptoza yol açtığı ve çözme sonrası membran hasarı ile ilişkili olan antioksidan faktörlerin seviyelerini azalttığı öne sürülmüştür (103, 122).

İnsan sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonu, Kaspaz 3, 8 ve 9'un aktivasyonu ve mitokondri ile ilişkili proteinlerin salınımını indükleyen mitokondriyal membran potansiyel bozukluğu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (123). Ayrıca, Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1 (AIFM1) ve sitokrom CYC2'nin protein seviyelerinin azaldığı ve mitokondriyal apoptoz ve DNA hasarında rol oynayan proteinler olan Clusterin ve Importin-1β'nin arttığı belirtilmiştir (119). Yapılan çalışmalarla kriyoprezervasyon sonrası sperm örneklerinde Annexin 1, 3 ve 4 protein seviyelerinin artışı gözlenmiştir, bu da hücre membranında hasar olabileceğini düşündürmektedir. Sperm motilitesinde rol oynayan Tubulin-α 1A zincirinin, dondurularak saklanan örneklerde yüksek düzeylerde olduğu gösterilmiştir (119). Ayrıca, başka bir çalışmada, dondurulan ve uzun süre saklanan sperm örneklerinde α-Tubulin'in önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (165). Daha sonraki çalışmalar, sperm kriyoprezervasyonundan sonra hücre iskeleti defektleri ve sperm motilitesi ile ilgili benzer sonuçlar bulmuşlardır. Dondurularak saklanan insan sperminin proteomik analizinde, Vimentin, Tektin-1 ve Aconitate hidrataz mitokondriyal 2 aconitase 2 (ACO2) ekspresyonunda azalma olduğu bulunmuştur. Vimentin, spermdeki fertilizasyon ile ilişkili hücre yüzey bölgelerinin birleştirilmesine ve stabilizasyonuna katılır; düşük Vimentin ekspresyonu, dondurularak saklanan sperm hücresinde akrozomal bozulmaya yol açabileceği düşünülmüştür. Sperm motilitesinde önemli bir rol oynayan Tektin-1, sil ve flagelladaki mikrotübüllerin yapısal bir bileşeni olduğu belirtilmektedir. ACO2, ATP üretimi için çok önemli olan trikarboksilik asit döngüsünde sitratın izositrata izomerizasyonunu katalize eder; izositrat içeriği kriyoprezervasyon uygulanan spermde önemli ölçüde azaldığı gösterilmiş; ATP

bağımlı sperm motilitesinin bu sebeple bozulabileceği belirtilmiştir (124). Yapılan bir çalışmada, sağlıklı donörlerin dondurularak saklanan spermelerinde motilite ve P34H seviyeleri azalmıştır. Bu protein sperm, yumurtanın zona pelusidasına bağlanmasında kilit rol oynadığı belirtilmiştir. Sperm membranındaki P34H eksikliği, insanlarda infertilite vakalarıyla ilişkilendirilmiştir (125). Yavaş dondurma yapılan insan sperm hücrelerinde, motilitede rol oynayan CATSPER2 ve TEKT2'nin mRNA ve protein seviyelerinde düşüşler gösterdiği bildirilmiştir. CATSPER2, sperm flagellumunda bulunan bir kalsiyum iyon kanalıdır ve düşük motiliteye sahip olan subfertil erkek spermelerinde CATSPER2 ekspresyonu düşük bulunmuştur. Öte yandan, TEKT2, kamçı oluşumu ve gelişiminde kritik bir rol oynayan mikrotübül oluşumuna katılır; TEKT2 genindeki mutasyonlar sperm motilitesini etkiler ve infertiliteye yol açtığı iddia edilmiştir (126). Sperm ile ilişkili antijenler olan SPAG5, SPAG7 ve SPAG12, YÜT başarısıyla ilişkili genlerdir ve kriyoprezervasyon uygulanan insan spermde önemli ölçüde azaldıklarından IVF başarısızlığı ile ilişkili olabilir (127).

4.7.2. Spermde epigenetik değişiklikler

Kriyoprezervasyon süreçlerine maruz kalan spermde, DNA yarıklanması ve onarımında yer alan Topoizomeraz II α 'nın SUMOilasyonunda artış görülmüş (128), belirgin DNA fragmentasyonu gözlenmese bile HOXA3, HOXB5, SOX2 ve β -GLOBIN gibi farklı kompaksiyon paternlerine sahip genlerde DNA hasarı gösterilmiştir. Dondurularak saklanan sperm örneklerinde özellikle fertilizasyon, embriyo gelişimi ve epigenetik sendromlarda rol oynayan PRM1, BIK, FSHB, PEG1/MEST, ADD1, ARNT, UBE3A ve SNORD116/PWSAS genlerinde DNA hasarı gösterilmiştir (17). Bu sonuçlar, YÜT'de motilite ve fertilizasyonu olumsuz yönde etkileyen moleküler değişikliklerin sperm kriyoprezervasyonu ile ilişkisini belirten tutarlı bilgiler sağlar.

4.8. Sperm DNA Hasarı

Günümüzde erkek infertilitesinin değerlendirilmesi, hala rutin semen analizine dayanmaktadır (129). Bu analiz, bireyin klinik durumu hakkında temel bilgi sağlamaktadır, tanı ve klinik yönetime yardımcı olur ancak bazı sınırlamaları bulunmaktadır (130). Bu sınırlamalar, oksidatif stres ve sperm DNA fragmentasyonu (SDF) gibi sperm fonksiyonu ve seminal sıvı kalitesinin değerlendirilmesine yönelik metodların geliştirilmesine yol açmıştır (131).

Sperm hücresi, baş, orta parça ve kuyruktan oluşan oldukça farklılaşmış hücrelerdir. Sperm hücresinin baş kısmı, fertilizasyon sonrası oosit içine aktarılan haploid genomu taşımaktadır. Sperm DNA'sının bütünlüğü ve yapısı, somatik hücrelerinkinden farklıdır (132) ve embriyonik genomun %50'sine katkıda bulunduğundan, fertilizasyon başarısı, embriyo gelişimi, implantasyon ve başarılı gebelikle sonuçlanması için kritik öneme sahip olduğu düşünülmektedir (133). Bu nedenle sperm DNA bütünlüğü spermin fertilite potansiyelinin önemli bir göstergesi olarak düşünülmektedir (134).

Sperm DNA bütünlüğü, normal embriyo gelişimi için de önemli bir parametre olduğu düşünülmektedir (135). DNA hasarı olan spermeler fertilizasyon yeteneğine sahiptir, ancak fertilizasyon sonrası embriyo gelişiminde bozukluklar meydana gelebileceği iddia edilmiştir. Yavrularda görülen infertilite ve genetik anormallikler de sperm DNA hasarı ile ilişkilendirilmiştir (136, 137). Rutin olarak yapılan sperm analizinde, sperm DNA analizi yapılmamaktadır. İnsanlarda yapılan çalışmalar, sperm DNA'sındaki hasarın üreme bozuklukları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (136-138). Ayrıca, insan sperm DNA hasarı, embriyo gelişimi ve gebelik oranlarını etkileyebileceği (139), implantasyon oranlarını azaltabileceği öne sürülmüştür (140).

Sperm DNA hasarı, hasarın yeri ve yapısına bağlı olarak DNA fragmentasyonu, mitokondriyal DNA hasarı, telomer kısalması, Y kromozomu mikrolezyonları ve epigenetik anormallikler olarak sınıflandırılmıştır (141, 142). Bir dereceye kadar hasar kaçınılmazdır ve sperm hücreleri kendi DNA'sını tamir etme kapasitesine sahip olmadığı belirtilmiştir. Meydana gelen hasar oosit sitoplazmasında bulunan faktörler tarafından onarılabilir ancak bu hasar oositin onarım kapasitesini aştığında, bu durum fertilizasyonda bozukluklara ve gebeliğin başarısızlıkla

sonuçlanmasına neden olabileceği öne sürülmüştür (143). Yapılan çalışmalara bakıldığında hem anormal semen parametreleri olan erkeklerde (144) hem de infertil çiftlerdeki normozoospermik partnerlerde (145) SDF'nin arttığı gösterilmektedir.

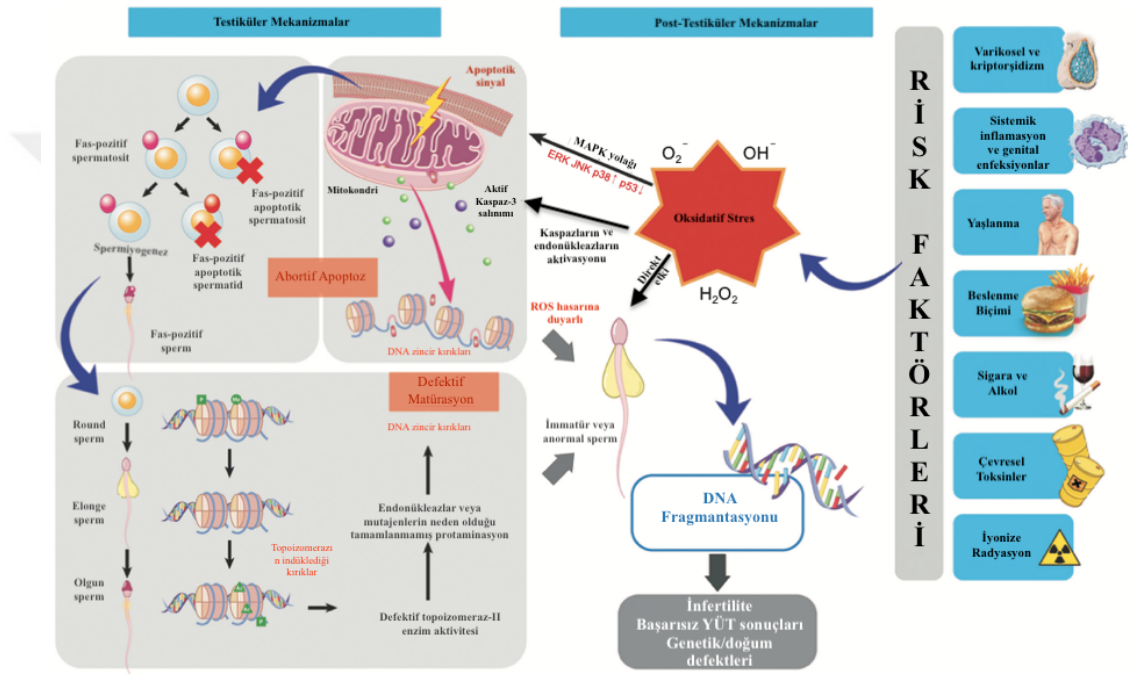
4.9. Sperm DNA Hasarına Neden Olan Faktörler

SDF için çok sayıda iç ve dış risk faktörü bulunmaktadır ancak altta yatan nedenler arasında çoğunlukla anormal kromatin kondenzasyonu, abortif apoptoz ve oksidatif stres yer aldığı belirtilmiştir. Testiküler sperm hücrelerinde hasar, spermatogenez ve olgunlaşma sırasında, post-testiküler hasar ise erkek üreme kanalında sperm taşınması sırasında meydana gelebileceği düşünülmüştür. Spermatogenez defekti ve kromatinin yeniden şekillenmesi sırasında oluşan anormallikler ve abortif apoptoz, spermatogenez yoluyla sperm DNA'sının bütünlüğünü etkileyen başlıca faktörlerdir. Testiküler ve post-testiküler OS'nin artması da DNA hasarına neden olduğu düşünülmüştür. Genel olarak oksidatif stres hem nükleer hem de mitokondriyal sperm DNA'sında hasara neden olduğu bildirilmiştir (141).

Spermatogenez sırasında, sperm DNA'sı, DNA'ya bağlı histonların protaminlerle (PRM) değiştirildiği, histon/protamin oranının azalmasıyla sonuçlanan protaminasyon sürecinden geçer. DNA'ya bağlı histonların hiperasetilasyonu sperm kromatin yapısının gevşemesine neden olur. Geçiş proteinleri (GP) DNA'ya bağlanarak, histonların ayrılmasını sağlar. Sonrasında GP'ler tamamen PRM'ler ile yer değiştirir ve sperm DNA'sının sıkıca paketlenmesi sağlanır (146). Tüm bu süreç endojen nükleaz topoizomerez II (Topo II) tarafından kolaylaştırılır. Topo II, histonların ayrılması ve kromatinin paketlenmesi esnasında oluşan burkulma stresini azaltmak için geçici DNA zincir kırıkları oluşturur, bu kırıklar spermiyogenez ve ejakülasyon öncesi tamir edilir (147, 148). Paketlenen kromatindeki bu kırıklar tamir edilmediğinde, sperm matürasyonunda defektler ve ejakülatta DNA fragmantasyonu olan spermeler görüldüğü belirtilmiştir (149, 150) (Şekil 4.3).

ROT oldukça reaktiftir ve hücre yapısına veya işlevine zarar verebilmektedir. Hem fertil hem de infertil bireylerde üretilirler ve olumlu olduğu kadar olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Semendeki üretimleri hem sperm hücreleri hem de seminal

plazma antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol edilir. Sperm hücreleri, türe bağlı olarak SOD, GPx, peroksiredoksin, tioredoksin, tioredoksin redüktaz gibi hücre içi düşük aktiviteye sahip antioksidanlar içermektedir (151). Spermde ROT üretimi ve antioksidan savunma sistemi arasında dengesizlik oluştuğunda, artan ROT zamanla uzaklaştırılmaz ve yüksek seviyedeki konsantrasyonları, nükleer ve mitokondriyal DNA hasarı, telomer kısalması, epigenetik değişiklikler ve Y kromozomu mikrolezyonları ile sonuçlanan OS'ye yol açabilir (141).



Şekil 4.3 Sperm DNA fragmentasyonunun nedenleri (Agarwal A., 2020)

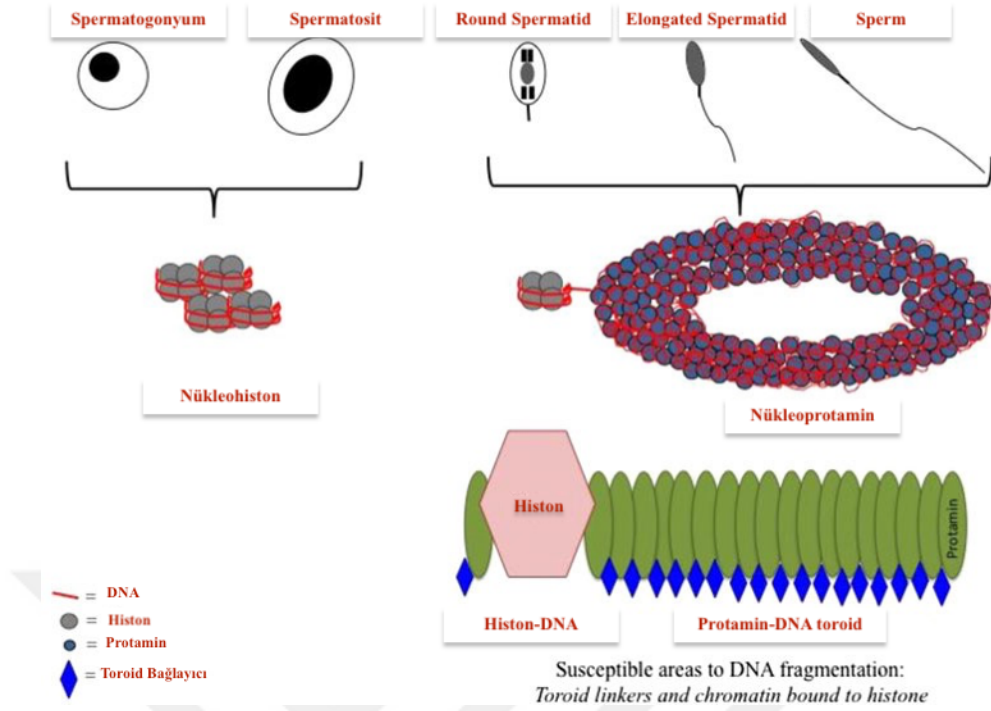
4.10. Sperm DNA Yapısı

Sperm hücreleri, spermatogenez adı verilen bir süreçle seminifer tübüllerde üretilir. Bu süreç puberte sonrası meydana gelir ve mayoz bölünme, mitoz bölünme ve hücresel yeniden şekillenme sürecinden oluşur. Spermatogonyal faz, spermatositogenez fazı (mayoz bölünme) ve spermatid fazı (spermiyogenez) olmak üzere üç aşamaya ayrılır. Seminifer tübül epitelinin kök hücreleri olan A tipi spermatogonyumlar, daha fazla spermatogonyum üretmek için sürekli mitotik bölünme geçirir. B tipi spermatogonyumlar bölünür ve farklılaşarak primer spermatositleri oluşturur. Spermatositogenezde, primer spermatositler, sekonder

spermatositleri oluşturmak için mayoz bölünme (mayoz I) geçirir. Sekonder spermatositler, spermatidleri meydana getirmek için ikinci mayoz bölünme (mayoz II) geçirir (152). Spermiyogenez, sperm oluşumunun son sürecidir ve yuvarlak spermatidlerin olgun sperm hücrelerine farklılaşması ile karakterize edilir. Sperm hücresinin, spermi oosite yönlendiren kuyruk, kompakt ve stabil DNA'ya sahip haploid bir nükleus içeren baş bölgesi olmak üzere iki ayrı bölgesi vardır (153). Sperm kromatini, baskılanmış transkripsiyonel aktiviteye ve kondanse DNA'ya sahiptir (154).

Histonlar, somatik hücrelerde DNA paketlemesinden sorumlu temel nükleer proteinlerdir. Histonların hiperasetillenmesiyle DNA yeniden şekillenir ve nükleozomlar ayrıldığında (155), histon ve histon olmayan proteinler GP1 ve GP2 ile tamamen veya kısmen yer değiştirir. GP'ler normal DNA kondenzasyonunda son derece önemlidir çünkü DNA kırıklarını azalttığı bildirilmiştir (156). Spermiyogenezin sonunda, GP'lerin yerini PRM nükleoproteinleri alır. PRM veya keratin proteinleri bir histonun yarısı büyüklüğündedir ve kromatini stabilize etmeye katkıda bulunan inter-protamin ve intra-protamin disülfid bağları oluşturabilen arginin ve oksitlenmiş sistein açısından zengindirler (157). Histonların PRM'lerle yer değiştirdiği bu sürece protaminasyon süreci denir. Memeli sperm hücrelerinde Protamin tip 1 ve 2 (PRM1, PRM2) bulunur. PRM1 tüm memelilerde eksprese edilir (155), PRM2 ise insan, primat, murin ve at (158) ve sığır sperm hücrelerinde (159) tanımlanmıştır. Protamin tip 3, bir PRM2 izoformu olarak tanımlanır ve sıçan (160), insan ve maymunda tanımlanmıştır. PRM, sperm DNA'sını somatik hücre DNA'sından altı kat daha kompakt olacak şekilde sıkıştırır, sperm çekirdeğinin stabilizasyonunu ve korunmasını sağlar (161). DNA kompaksiyonu hücre hacmini azaltır, dişi üreme yolundan geçişi, penetrasyonu ve oosit aktivasyonunu kolaylaştırır, bu da daha sonra DNA hasarı olmadan embriyonik gelişimi başlatır (162). Bu süreçte PRM'ler, DNA'ya bağlanır ve nükleoprotaminler adı verilen yüksek oranda sıkıştırılmış kompleksler oluşturur. PRM bağlanmasından sonra, sperm kromatini aşırı derecede kompakt ve durağan (inert) hale gelir ve sperm kromatinin temel paketleme birimi olan toroid oluşturulur. Nükleoproteinlerin toroidleri, her bir DNA eğriliğinde bulunan ve bağlayıcılarla birbirine bağlanan yüksek oranda sıkıştırılmış DNA içerir. Proteindeki sistein kalıntıları arasındaki çapraz bağlar protamin toroidlerinin yüksek oranda

sıkıştırılmasını sağlar ve DNA stabilitesini destekler (163). Bağlayıcılarla birbirine bağlanan nükleoproteinlerin toroidleri, her bir DNA kavisinde bulunur ve yüksek oranda sıkıştırılmış DNA içerir. Bağlayıcı bölgelerde kromatin, DNA fragmentasyonuna karşı daha savunmasızdır (156) (Şekil 4.4). DNA Topo II enzimi, spermiyogenez sırasında DNA'da fizyolojik olarak kırıklar ve bağlanmalar oluşturarak DNA kondenzasyonunu destekler. Spermiyogenez sırasında meydana gelen sperm DNA kırıkları, kromatin torsiyonunu hafifleterek protaminasyon sürecini kolaylaştırır. Meydana gelen bu endojen DNA kırıkları olgun sperm hücresinde kalıcı olmamalıdır (147) ve protaminasyon süreci sona ermeden önce hücrenin kendisi tarafından onarılmalıdır (164, 165). Bununla birlikte, farklılaşmanın ileri aşamalarındaki hücreler (spermatidler ve sperm hücresi) DNA onarım mekanizmasına sahip değildir, bu nedenle ejakülatta DNA hasarı olan hücreler mevcut olabilir. DNA hasarı olan sperm fertilizasyon yeteneğine sahiptir ancak embriyo gelişiminde bozukluklar meydana gelebilir (140). Oosit ve embriyo, gelişimin erken aşamasında sperm DNA hasarını onarabilir, ancak bu kapasite sınırlıdır ve çift zincir kırıkları ve histonla ilişkili bölgelerdeki kırıklar gibi problemler çözülmez (166). Bu nedenle, sperm DNA bütünlüğü, üreme biyoteknolojisinde fertilite potansiyeli ile ilişkilendirilen önemli bir özelliktir (167). Yakın zamanda yayımlanan bir derlemede, açıklanamayan infertiliteye sahip erkek hastaların değerlendirilmesinde sperm DNA fragmentasyon testinin kullanılmasının faydalı olduğu belirtilmiştir (134).



Şekil 4.4 Spermiyogenez sırasında kromatin değişikliklerinin ve sperm kromatininin DNA fragmentasyonuna duyarlı bölgelerinin şematik gösterimi (Hamilton T., 2020)

4.11. Sperm DNA Fragmentasyonu Nedenleri

Kromatin hasarı ve sperm DNA fragmentasyonunun üç olası nedeni bildirilmiştir: protaminasyon başarısızlıkları, apoptoz ve oksidatif stres. Sperm DNA fragmentasyonu, bu süreçlerin bir sonucu olabilir (168). Protaminasyon sürecinde oluşabilecek hatalar, kromatin kondenzasyonunda bozukluklara ve nükleazlar, serbest radikaller veya mutajenler gibi endojen ve eksojen ajanlara karşı daha savunmasız spermier üretilmesine neden olduğu bildirilmiştir (168).

İnfertil erkekler üzerinde yapılan bir çalışmada, PRM'lerdeki translyasyon hasarı ve sperm protaminasyon hasarının ilişkili olduğu gösterilmiştir (169). GP knockout (KO) farelerle yapılan bir çalışmada, PRM değişiklikleri ve sperm kromatin hasarının, fertilitenin azalmasına ve embriyo implantasyonunda başarısızlıklara yol açtığı tespit edilmiştir (170).

Sperm DNA fragmentasyonunun ikinci olası nedeninin apoptotik süreç olduğu bildirilmiştir. Apoptoz, normalde birçok fizyolojik süreçte meydana gelen programlanmış hücre ölümü için kullanılan terimdir. Sperm, spermatogenez sırasında

ve epididimiste olgunlaşma sırasında apoptoz belirteçlerini eksprese eder. Testiste apoptoz, hasarlı germ hücrelerinin yok edilmesi, sperm üretiminin kontrol edilmesi (abortif apoptotik süreç), germ ve Sertoli hücreleri arasındaki oranın korunmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (171). Apoptoz yolaklarında yer alan kaspaz 1, 3, 8 ve 9 gibi moleküllerin varlığı, çift sarmallı sperm DNA kırıklarının varlığını gösterge belirtilmiştir. Çift sarmallı DNA kırıkları, sperm nükleer matrisine bağlanır ve mayoz bölünme sırasında DNA onarımı gerçekleşemediği bu durumun düşük ve implantasyon başarısızlıklarına neden olduğu düşünülmektedir (172).

Sperm DNA fragmentasyonunun üçüncü olası nedeninin OS olduğu düşünülmektedir. OS, ROT'ların üretimi ile seminal plazmada SOD ve katalaz gibi enzimler ve redüksiyon reaksiyonunu bloke eden antioksidanlar arasında bir dengesizlik olduğunda ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu tip reaksiyon, DNA zincirlerinden en az birinde hasar oluşturarak sperm DNA fragmentasyonunu indüklediği ileri sürülmüştür (173). Yapılan bir çalışmada koç sperminin lipid peroksidasyonuna duyarlılığının sperm kalitesini ve oksidatif homeostazı bozarak OS oluşumunun indüklenmesiyle sperm kromatin hasarının ana nedeni olabileceği belirtilmiştir (173). Aynı durum insan sperminde de gözlenmiştir (174).

4.12. Sperm DNA Hasarını Değerlendiren Test Sistemleri

4.12.1.1. Sperm kromatin yapı tayini (SCSA)

Bu yöntemde sperm DNA bütünlüğü, ısı veya asit kaynaklı denatürasyondan sonra metakromatik florofor akridin oranj (AO) kullanılarak flow-sitometre değerlendirilir. Test ilk tanımlandığında, sperm DNA ipliğinin kırılma bölgelerinin denatürasyonu için ısı (100°C, 5 dakika) kullanılıyordu ve ardından AO ile boyama yapılmaktaydı. Ancak son zamanlarda bu protokol değiştirilerek, sperm DNA'sının denatürasyonu için düşük pH kullanılmaya başlandı (168). Bu protokole DNA denatürasyonu süreci kullanıldığından, kromatin bütünlüğünün dolaylı bir değerlendirmesi olarak kabul edilir. Bu teknik, çok sayıda sperm hücresini hızlı bir şekilde değerlendirir. Aynı zamanda hassas ve tekrarlanabilir olması ile yüksek istatistiksel güce sahiptir. AO, DNA ipliklerinin arasına girerek ve çift iplikli DNA'nın

varlığını belirten yeşil bir renk yayar; kırmızı ise kromatin yapısının denatürasyonunu gösteren tek iplikli DNA'nın varlığını belirtir. Kırmızı ve toplam floresan ışması arasında elde edilen ilişki, flow sitometride ölçülerek DNA fragmantasyon indeksi (DFI) belirlenir. Sperm DNA kırıkları denatürasyona büyük ölçüde duyarlıdır; bu nedenle daha yüksek DFI değerine sahip sperm hücreleri hasarlı DNA'ya sahiptir. DNA fragmantasyonu olan bölgelerde genetik bilgide olası değişiklik olabilir (175).

4.12.1.2. Sperm kromatin ayrılma testi/ sperm kromatin dispersiyonu (SCD) testi

SCD testi, sperm DNA hasarını göstermektedir ve ilk olarak insan sperminde tanımlanmıştır (176). Bu testte spermler agaroz matriks jele yerleştirilir. Asit denatürasyonundan sonra sperm membranı ve proteinlerinin uzaklaştırılması için ortama litik bir tampon solüsyonu eklenir. Ardından nükleoidin oluşturduğu merkezi bir kor etrafında ayrılmış DNA halkalarına bağlı bir hale görüntüsü oluşur. Normal DNA'ya sahip spermler geniş ışık haleleri oluştururken, fragmente DNA'ya sahip spermler çok küçük ya da hiç ışık halesi oluşturmamaktadır. Spermler Wright's boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda, floresan boya ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenebilir. Bu teknik ile DNA'nın tek zincir ve çift zincir kırıkları tespit edilebilir (172).

4.12.1.3. Tek hücre elektroforez (COMET) yöntemi

Tek hücreli jel elektroforezi (COMET) analizi, genellikle tek ve çift zincirli DNA kırıklarını ölçmek için kullanılan nispeten basit, hassas, güvenilir, hızlı ve düşük maliyetli bir tekniktir (177). Bu yöntemde hücreler, bir agaroz matrisinde tek bir hücre süspansiyonu olarak gömülür, ardından yüksek tuz ve deterjanla parçalanır ve elde edilen nükleoidler, kontrollü bir alkalın denatürasyon aşamasına maruz bırakılarak DNA'nın nükleer matrise nükleoid olarak bağlanması sağlanır. Ardından jellere gömülü nükleoidler elektroforeze tabi tutulur (178). DNA moleküllerinin göçü, DNA hasarının düzeyine ve elektroforez koşullarına bağlı olarak gerçekleşir. DNA zincirlerinde kırıklar varsa farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırık DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. Bu durumda

hasarsız DNA, kuyruk ya da comet oluşturmazken, farklı elektrik yükü ve moleküler ağırlığına sahip hasarlı DNA fragmentleri kuyruklu yıldız şeklinde bir görüntü oluştururlar. Nötral koşullarda sadece çift zincir kırıkları tespit edilebilirken, alkali koşullarda tek veya çift zincir kırıkları tespit edilebilir. Nötralizasyondan sonra, bir floresan boya ile boyama yapılarak floresan mikroskobu ile görüntüleme gerçekleştirilir. Her nükleoiddeki floresan yoğunluğuna bağlı olarak comet ya da kuyruk oluşur. Boyanma yoğunluğu ve oluşan kuyruğun uzunluğu DNA fragmentasyonunun derecesini belirler (177).

4.12.1.4. Terminal Uridine Nick-End Labeling (TUNEL) analizi

TUNEL analizi, TdT kullanılarak dUTP tek ve çift zincirli DNA kırıklarına bağlanması yoluyla sperm DNA hasarını doğrudan ölçen bir yöntemdir. TdT, DNA polimeraz enzimi tek veya çift zincirli DNA kırıklarının 3'-hidroksil grubuna rastgele dUTP ekler (179). Floresan sinyali, DNA zincir kırıklarının sayısı ile orantılı ışımaya yapar. TUNEL testi sırasıyla spermin fiksasyonu ve permeabilizasyonu, DNA fragmentlerinin işaretlenmesi, spermin boyanması ve değerlendirilmesinden oluşur. Flow sitometre ile kantitatif analiz, floresan veya ışık mikroskobu ile de kalitatif analiz gerçekleştirilir (180). Ölçülen değer, erkek infertilitesini değerlendirmek için bir indeks olarak kullanılır ve YÜT sonuçlarını öngörebildiği bilinmektedir (181). TUNEL yöntemi ile 200 veya daha az sperm hücresi ile değerlendirme yapılabilmektedir. Bu durum testis biyopsisi gibi çok az sayıda sperm hücresi elde edilen işlemlerden sonra DNA hasarının değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır (182).

4.12.1.5. Annexin V yöntemi

Bu yöntemin esası FITC'ye konjuge olan Annexin V'nin, apoptoz sürecine giren hücrelerin dış yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanmasına dayanır. Nekrotik hücrelerde de membran geçirgenliği kayb olduğu için bu hücreler de Annexin V-FITC DNA'ya bağlanmaktadır. Canlı, erken apoptotik ve nekrotik veya geç apoptotik hücreler arasında ayırım yapmaya yardımcı olmak için bu prosedüre propidium iyodür (PI),

dahil edilmiştir. PI, sağlıklı hücrelerde membranı geçemezken, membran geçirgenliğini kaybetmiş nekrotik hücrelerde DNA'ya bağlanır. Bu yöntemle hücreler, apoptotik ve apoptotik olmayan hücreler olmak üzere birbirinden ayırt edilebilirler (183).

4.12.1.6. Toluidin Blue (TB) boyaması ile protaminasyon eksikliğinin değerlendirilmesi

TB, sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan temel bir boyadır. Gevşek paketlenmiş kromatine sahip ve/veya hasarlı DNA içeren sperm çekirdeğindeki fosfat grupları, TB gibi bazik boyalarla bağlanmaya daha yatkındır. Semen örneğinin TB boyaması için lam üzerine yayma preparat alınır ve havada kurutulur, %96 etanol:aseton (1:1) ile fikse edilir ve 0.1 N HCl ile hidrolize tabi tutulur. Sperm kromatininin değerlendirilmesi için %0,05 TB solüsyonu uygulanır. Sperm DNA hasarı olmayan sperm başları açık mavi, DNA hasarı olanlar ise mor boyanır. Bu teknik, hızlı, düşük maliyetli ve verimli olduğu için erkeklerde sperm DNA analizinde sıklıkla kullanılmaktadır (184).

4.12.1.7. Sperm kromatininde protamin eksikliği değerlendirmesi

Kromomisin A3 (CMA3), DNA'da PRM'ler ile aynı bölgelere bağlanan bir florokromdur. Sperm kromatin paketlemesini değerlendirmek için güvenilir bir araçtır ve protamin eksikliğinin dolaylı olarak görüntülenmesini sağlar. CMA3 analizi, mikroskop veya flow sitometride değerlendirilebilir. Yüksek oranda CMA3 boyaması, DNA'ya protamin bağlanma oranının düşük olduğunu, dolayısıyla gevşek paketlenmiş sperm kromatin yapısını ifade eder. Protamin eksikliği ise, erkek infertilitesinin nedenlerinden biri olarak tanımlanmaktadır (185).

4.12.1.8. Sperm nükleusunda protamin ekspresyonu

Protaminlerin incelenmesi, erkek fertilitésinin önemli bir belirleyicisi olarak rapor edilmiştir (186). İnsanda PRM (PRM1 ve PRM2) yaklaşık olarak eşit oranda eksprese edilir. Fertil erkeklerde PRM1/PRM2 oranının 1:1 olduğuna inanılmaktadır (187). Farelerde, PRM 1 ve 2 arasındaki oran bozulduğunda DNA bütünlüğü değiştiği gözlenmiştir (188). PRM1 ve PRM2 arasındaki oran türler arasında farklılık göstermektedir. Bu oranı belirlemek için sperm nükleusundaki bu proteinlerin miktarı belirlenmelidir. Protaminlerin ekstraksiyonu ve analizi için Ditiotritol (DTT) ile disülfid bağlarını kırmak gerekir (189). Ardından sisteinler indirgenmeli ve protaminler elektroforez ile ayrılmalıdır. Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid asetik asit-üre jel elektroforezi uygulanır (190). Coomassie blue ile boyanmış jelin taranması ile protaminler tanımlanır. PRM1 ve PRM2'nin rölatif (bağıl) miktarı, görüntüleme yazılımı kullanılarak değerlendirilebilir. Jel bir poliviniliden florür membranına aktarılır ve PRM1 ve PRM2 primer antikolarıyla inkübe edilir. Sekonder antikorun uygulanmasından sonra, pozitif bantlar kemilüminesans veya floresan ile tespit edilir, ardından PRM miktarı belirlenir ve bunlar arasındaki oran tahmin edilir.

4.13. Oksidatif Stres

OS, hücreler ve dokularda ROT üretimi ve birikimi ile biyolojik bir sistemin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir olgudur. ROT, hücre sinyalleşmesi gibi bazı fizyolojik süreçlerde rol oynar ve normalde oksijen metabolizmasının yan ürünleri olarak üretilirler. UV, iyonlaştırıcı radyasyonlar, çevre kirliliğine yol açan maddeler ve ağır metaller gibi çevresel stresörler ve ksenobiyotikler ROT üretimini büyük ölçüde artırır, bu nedenle hücre ve doku hasarına yol açan dengesizliğe yani OS'ye neden olur (191). Yaygın olarak tanımlanan ROT, Süperoksit radikalleri, Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijen ve biyolojik sistemler tarafından metabolik yan ürünler olarak üretilirler. ROT, birçok biyolojik süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Serbest radikallerin redoks sinyali olarak bilinen bazı hücrel sinyalleşme süreçlerinde de yer aldığına inanılmaktadır (192). Düşük ya da orta miktarda ROT varlığı hem

homeostazın korunması ve düzenlenmesinde hem de çok çeşitli hücrese fonksiyonlarda görevlidir (192, 193). ROT üretimi arttığında proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi önemli hücrese yapılar üzerinde zararlı etkiler göstermeye başlarlar (194).

Aşırı ROT üretimi, hücrese proteinlerin yapısal modifikasyonu ve işlevlerini değiştirerek hücrese fonksiyonlarda hasara ve hücrenin yaşamsal süreçlerinin bozulmasına neden olur (192). Yüksek ROT seviyeleri lipid, protein ve DNA hasarına neden olur, lipid membranı parçalayarak, membran akışkanlığını ve geçirgenliğini artırabilir. ROT, deoksiribozu oksitleyebilir, DNA zincirini kırabilir, nükleotidleri çıkarabilir, bazıları değiştirebilir ve DNA-protein çapraz bağlanmaları oluşturarak DNA'ya hasar verebilir (195).

Primer serbest oksijen radikalleri olan süperoksit ve hidroksil radikali kimyasal redüksiyon koşulları altında moleküler oksijenden oluşmaktadırlar. Bu serbest radikallerin aşırı miktarlarda üretilmesi, kanser, felç, miyokard enfarktüsü, diyabet, metabolik bozukluklar, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olan hücre hasarına ve apoptoza yol açabilir (196).

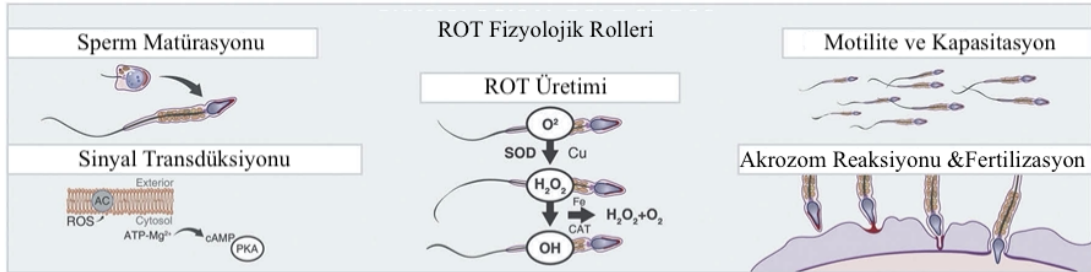
ROT, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda mitokondri organelleri tarafından üretilir. Bu organeller hücre içi ROT temizleme kapasitesine sahiptir ancak, mitokondri tarafından üretilen ROT miktarını temizleyerek hücrese ihtiyacı karşılamak için yeterli değildir (197). ROT üretimi temel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlara dayanır. ROT oluşturabilen enzimatik reaksiyonlar, elektron taşıma sistemi, prostaglandin sentezi, fagositoz ve sitokrom P450 sistemi ile ilgili olanlardır (198). Süperoksit radikalleri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH) oksidaz, ksantin oksidaz ve peroksidazlar tarafından üretilir. Oluştuktan sonra, sırayla hidrojen peroksit, hidroksil radikali, peroksinitrit ($ONOO^-$), hipokloröz asit ($HOCl$) vb. üretilmesini sağlayan çeşitli reaksiyonlara katılır. Çoklu oksidaz enzimleri, yani amino asit oksidaz ve ksantin oksidaz tarafından üretilen hidrojen peroksit, serbest radikal değildir ve biyolojik membranlara kolayca nüfuz ederek hidroksil radikalinin oluşmasında aracı bir rol oynar. Tüm serbest radikal türleri arasında *in vivo* en reaktif olan OH^- , Fe^{2+} veya Cu^+ gibi metal iyonları ile reaksiyona girerek Fenton Reaksiyonu sonucu üretilir. Süperoksit radikali ile hidrojen peroksit arasında gerçekleşen Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda da hidroksil radikali oluşur.

Bazı önemli fizyolojik işlevlere sahip olan nitrik oksit radikali (NO•), nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından arginin-sitrülin oksidasyonundan sentezlenir (191).

4.14. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi

Reaktif oksijen türlerinin sperm fonksiyonları üzerinde hem yararlı hem de yıkıcı etkileri olabilir ve bu etkiler ROT'un düzeyine bağlıdır. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, fizyolojik bazı fonksiyonları gerçekleştirebilmek için belli seviyelerde düzenlenmelidir. Düşük miktarlarda ROT, kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozomal reaksiyon dahil olmak üzere spermin normal fonksiyonlarında fizyolojik bir role sahiptir. Fertilizasyonun sağlanması için kritik bir süreç olan sperm kapasitasyonu, süperoksit, H₂O₂, NO ve süperoksit anyon radikali gibi ROT ile gerçekleşir (199) (Şekil 4.5).

Genital sistem enfeksiyonu, varikosel, metabolik sendromlar, sigara, aşırı alkol ve ilaç tüketimi, iyonlaştırıcı radyasyon, cep telefonu kullanımı, mental stres, şiddetli egzersiz, omurilik yaralanması ve çevre kirliliği gibi çeşitli kaynaklar OS'ye neden olur. Genel olarak, bu kaynaklar endojen ve eksojen olarak iki gruba ayrılır (200).



Şekil 4.5 ROT kaynakları (Dutta S., 2019)

4.14.1. Endojen kaynaklar

4.14.1.1. Olgunlaşmamış sperm

Spermatogenez aşamasında, spermin fazla olan sitoplazmik kısmı Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir, sperm sıkı ve uzun formunu kazanır (298). Spermatogenez sırasında sitoplazmanın atılması süreci esnasında meydana gelen bir

hata, spermin germinal epitelden gelen fazlalık bir sitoplazma bölgesi taşımasına sebep olur ve oluşan spermler genellikle olgunlaşmamış ve fonksiyonel olarak işlevsizdir. Orta parçada fazla sitoplazmik kalıntı bulunan spermler, olgunlaşmamış ya da immatür sperm olarak bilinir. Spermin orta kısmındaki ek sitoplazma, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimi içerir. Bu sitoplazmik enzim, hücre içi NADPH üretimini kontrol eder. NADPH, sperm membranı içinde yer alan NADPH oksidaz yoluyla ROT üretiminde kullanılır (201). Ek olarak, orta parçada sperm hareketliliği için enerji depolayan çok sayıda mitokondri vardır. Mitokondriyal solunum zincirindeki bir enzim olan diaforaz, indirgenmiş ve oksitlenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) formları arasındaki oranı kontrol eder; böylece sperm enerji dengesine katkıda bulunur. Bu oksidoredüktaz mitokondriyal solunum zinciri ile entegredir ve ROT seviyesini etkileyen süperoksit anyonları üretir (202). Mitokondriyal disfonksiyon ROT üretimine yol açabilir ve sperm hücrelerinde mitokondriyal bütünlüğü etkileyebilir; bu da mitokondriyal membranda hasara yol açarak ROT üretiminde artışa neden olur. Sonuç olarak mitokondri ve sperm membranı, olgunlaşmamış spermlerde ROT üretimi için iki ana bölge olarak bildirilmiştir (203).

4.14.1.2. Lökositler

Her doğal ejakülasyonda az sayıda lökosit vardır. DSÖ kriterlerine göre, lökosit sayısı 1 ml semende 1 milyondan fazlaysa bu durum lökositospermi olarak tanımlanır (204). Lökositospermiye bağlı olarak artan ROT, antioksidan konsantrasyonunda bir azalmaya yol açarak sperm DNA'sına zarar verir. Reprodüktif sistemde meydana gelen inflamasyon veya enfeksiyon nedeniyle seminal plazmada lökosit sayısı artar. Peroksidaz-pozitif lökositler, heksoz monofosfat transferi yoluyla NADPH üretimini artırarak spermden 1000 kat daha fazla ROT üretebilir (205). Çalışmalar, fertil erkeklerde ROT düzeylerinin infertil erkeklere göre daha az olduğunu ve OS ile lökosit sayısı artışı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermektedir (206).

4.14.2. Eksojen kaynaklar

4.14.2.1. Sigara kullanımı

Sigaradaki nikotin ve diğer kimyasallar hormon düzeylerini bozar ve semen parametrelerini etkiler (207). Sigara içimi, spermın üretildiği bölgede yüksek ROT birikimine neden olabilir, sperm DNA'sına zarar verebilir. Sigara dumanındaki partiküllerde kararlı ve kararsız serbest radikaller, ROT, çok sayıda toksik madde, kanserojen ve mutajenik madde içerir. Aynı zamanda süperoksit anyonlarının ve H₂O₂'nin üretimini artırarak hücrelerin lipid membranlarında, proteinlerde, enzimlerde ve DNA'da oksidatif hasara neden olur, infertiliteye yol açar (208).

4.14.2.2. Alkol kullanımı

Aşırı alkol tüketimine bağlı olarak sperm motilitesinde ve konsantrasyonunda belirgin bir azalma görülmekte ve ayrıca normal morfolojiye sahip sperm oranını da azaltmaktadır. Alkol apoptoz yoluyla sperm kromatin bozukluklarına neden olarak sperm motilitesini, nükleer matürasyonu ve DNA bütünlüğünü etkilemektedir (203).

4.14.2.3. Radyasyon

Erkek fertilitasını etkileyen diğer bir dış faktör de radyasyondur. İyonize ve iyonize olmayan radyasyon spermatogenezi etkiler. Erkek fertilitesi, termal, radyoaktif, radyo frekansı ve diğer tehlikeli radyasyondan büyük ölçüde etkilenir. Radyo frekansı radyasyonu ve erkek infertilitesi üzerindeki etkileri üzerine yapılan diğer çalışmalar, OS nedeniyle glutatyon seviyesinin azaldığını ve sperm membran bütünlüğünü bozduğunu bildirmiştir. Bu nedenle araştırmacılar, ROT üretiminin erkek infertilitesi ve radyasyon patofizyolojisinde önemli bir rol olabileceği sonucuna varmışlardır (209).

4.14.2.4. Çevresel faktörler

ROT'un en önemli çevresel kaynaklarından biri genital ısı stresidir. Uzun süre ısıya maruz kalmak skrotal hipertermiye ve aşırı ROT üretimine yol açar (210). Ftalatlar, hava kirliliği ve ağır metaller gibi çevresel kirlleticiler de ROT kaynağı olabilmektedir (211). Hava kirliliği, sperm lipid membranını etkileyerek oksidatif strese neden olabilir, serbest radikallerin üretimini sağlayabilir ve sperm parametrelerini etkileyebilir (212). Ayrıca, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller de ROT kaynağı olarak kabul edilir ve testiküler oksidatif strese neden olarak sperm DNA'sına ve semen parametrelerinde olumsuz etkilere sebep olduğu bildirilmiştir (213).

4.14.2.5. Genetik ve epigenetik faktörler

Erkek fertilitasını etkileyen durumlar arasında genetik faktörler de yer almaktadır. Bu faktörler cinsiyet hormonlarının seviyesi, kromatin stabilitesi ve sperm kalitesi ile ilişkilidir. Sperm sayısı, hormonal düzeyler, sperm morfolojisi ve sperm kromatin parametrelerinde gözlenen değişikliklerin yaklaşık %20'sinin kalıtsal faktörlerden etkilendiği belirtilmiştir (210). ROT, endojen ve çevresel faktörlerden etkilendiğinden ve sperm kalitesi ve DNA'ya büyük zarar verebileceğinden, antioksidan enzimler, spermatogenez ve fertilizasyon sırasında OS'ye karşı koymada önemli roller oynamaktadır. NRF2, SOD, CAT, GPX, PRX, GRX, TRX ve NOS genleri spermatogenezde yer alan bir dizi antioksidan genlerdir. Bu genler tarafından kodlanan enzimler, spermatogenez sırasında antioksidan yanıtlarda, sentezlerde ve GSH'nin azaltılmasında ve tiyol indirgenme redoks döngüsünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bu genlerin çoğu, OS'ye karşı savunma mekanizmalarını düzenler. SOD'lar ve CAT'lar, NRF2-ARE sinyal yolağı tarafından düzenlenen genlerdir ve spermi süperoksit ve H₂O₂'nin oksidatif hasarından korurlar. SOD, süperoksit radikalının yıkımı ile moleküler oksijen ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olur. İnsanlarda SOD (SOD1), mitokondriyal SOD (SOD2) ve ekstraselüler SOD (SOD3) olmak üzere üç SOD izozim ailesi bulunur (212), bunlar arasında SOD2 izozimi insan spermlerinde daha fazla eksprese edilir (214). SOD geninin birkaç çeşidi

bulunmaktadır ve yapılan çalışmalar, rs4880 polimorfizminin erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (213). CAT, CAT genleri tarafından kodlanan bir hem enzimdir. Bu enzim H₂O₂'yi oksijene ve suya dönüştürür ve normal ROT seviyelerini korur ve spermi ROT'a karşı korur (215).

OS sisteminde yer alan genlerde bulunan genetik polimorfizmler erkek infertilitesini etkileyebilir. Genetik polimorfizmler, gen haritasındaki konumlarına bağlı olarak bir proteinin ekspresyonunu ve yapısını değiştirebilir (216). Genlerin kodlayan veya kodlamayan bölgelerinde genetik varyasyonlar meydana gelebilir. Kodlamayan bölge mutasyonları ve kodlama bölgelerindeki mutasyonlar, gen ekspresyonunu ve RNA uçbirleştirmesini (RNA splicing) etkileyebilir. Promoter bölgelerdeki mutasyonlar, gen ekspresyonu ile doğrudan ilişkili olabilir (217). Epigenetik regülasyonlar, gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlayan mekanizmalardır (218) ve DNA dizisindeki doğrudan değişikliklerle ilişkili değildir. DNA metilasyonu, histon değişiklikleri ve kodlamayan RNA'ların işlevini içeren epigenetik mekanizmalar, genomik imprinting ve X kromozomu inaktivasyonu dahil olmak üzere bir dizi biyolojik süreç için gereklidir (219). Spermlerde gamet canlılığında önemli rol oynayan epigenetik belirteçler, hücre büyümesi ve farklılaşmasında görülmektedir. Sperm DNA'sının epigenetik regülasyonu, spermatogenezin birçok önemli adımında gerçekleşir (219).

4.14.2.6. Lipid peroksidasyonu

Sperm hücreleri, çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) oluşan lipid membranları nedeniyle oksidatif hasara karşı özellikle hassastır. PUFA'lar, değişen karbon-karbon çift bağlarının doğası gereği redoks reaksiyonlarının mükemmel hedefleridir ve kolayca lipid radikallerine dönüştürülür (220). Lipid peroksidasyon (LPO) kaskadlarının indüksiyonu, spermlerde hücre içi ROT seviyelerinin kontrolsüz bir şekilde yükselmesi sonucu meydana gelir ve sperm fonksiyonunun azalmasına neden olduğu gösterilmektedir (221). LPO, lipid membranların akümüülasyonunu, yapısını ve dinamiklerini değiştirir, membran yağ asitlerinin neredeyse %60'ı kaybolur, membran akışkanlığı azalır, non-spesifik iyon geçirgenliği artar ayrıca membran reseptörlerinin ve enzimlerin etkilerini inhibe eder. Dolayısıyla LPO

oluşumu, anormal fertilizasyona neden olan otokatalitik bir kimyasal reaksiyon olduğu bildirilmiştir (222).

4.15. Oksidatif Stresin DNA Hasarındaki Rolü

İnfertilite ile birlikte spermelerde yüksek düzeyde DNA hasarı meydana geldiği bildirilmiştir (223). ROT düzeyini artıran faktörler sperm kromatin bütünlüğünü etkileyebileceği düşünülmektedir. Guanin bazı, serbest radikaller tarafından oksidatif saldırıya maruz kalan ve 8-hidroksiguanine (8-OHG) dönüşen organik bir bazdır. İnfertil erkek sperm DNA'sı üzerinde yapılan araştırmalara göre infertil bireylerde 8-OHG'nin fertil bireylere kıyasla 100 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. OS, özellikle daha az PRM olan genom lokasyonlarında 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) gibi oksitlenmiş DNA baz bileşiklerinin üretimine yol açar (224).

Eksojen ve endojen faktörlere bağlı olarak antioksidanların koruyucu etkisindeki yetersizliğin, spermde oksidatif hasara ve nihayetinde DNA hasarına yol açtığı öne sürülmektedir (225). DNA hasarı, tek veya çift zincir kırıkları, DNA fragmentasyonu, serbest baz bölgelerinin oluşturulması, pürin, pirimidin, deoksiriboz ve DNA çapraz bağlanması gibi bir dizi değişikliğe neden olur (223). Bu değişiklikler, gen transkripsiyonunun durdurulmasına veya başlatılmasına, son transdüksiyon yollarının indüklenmesine, telomerik DNA'nın degradasyonunun artmasına, replikasyon hatalarına, genomik kararsızlığa ve CG'den AT'ye transversiyona yol açabilir (226). Ciddi DNA oksidatif hasarı olan hastaların spermleri dejenere olur ve epididimdeki spermatogenez ve sperm matürasyonu süreciyle absorbe edilir. Bu hastalarda sperm sayısında azalmaya neden olur. DNA fragmentasyonu ROT hasarının son aşamasıdır ve sıklıkla infertil erkeklerin spermlerinde görülür (227). ROT ve SDF arasında yakın bir ilişki vardır. SDF, varikosel, enfeksiyon, yaşlanma, sıcaklık, yaşam tarzıyla ilgili faktörler, eksik protaminasyon ve bazen bir sebebe bağlı olmadan çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilir. Bunların çoğuna ROT aracılık eder ve bu nedenle ROT, SDF'nin ana nedenidir. ROT sperm mitokondriyal DNA'sına (MtDNA) da zarar verebilir. MtDNA'da, histon ve nükleotid eksizyon onarım (NER) yoluyla olmadığından, ROT saldırısına daha duyarlıdır. Ek olarak, ROT iç mitokondriyal

membran yapısını bozduğundan mtDNA'ya doğrudan zarar verebilir ve aynı anda ETZ'den elektron sızıntısına neden olabilir ve bu da OS üretimini artırır (141).

ROT düzeyinin yüksek olması, iç ve dış mitokondriyal membranları parçalayarak kaspazların aktivasyonuna ve apoptoza neden olabilir. Apoptoz sürecinde sitokrom C'nin salınması, ROT seviyelerini daha da artırır, DNA hasarı ve fragmentasyonunu indükler (228), apoptotik kaspazları aktive eder (229). İnfertil erkeklerin seminal plazmadaki sitokrom C seviyelerinin yüksek olması, yüksek ROT seviyelerinin neden olduğu mitokondride önemli hasar olduğunu düşündürebilir (229, 230).

4.16. Oksidatif Stres ve Semen Parametreleri

ROT, yan ürünler olarak semende hücrelerin fizyolojik metabolik süreçleri sırasında salınır (212). Yüksek ROT seviyeleri, konsantrasyon, morfoloji ve motilite dahil olmak üzere sperm parametrelerini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (231).

4.17. Oksidatif Stres ve Spem Kriyoprezervasyonu

Sperm kriyoprezervasyonu sırasında sperm, yüksek ozmotik ve termal strese, hücre içi buz kristallerinin oluşumuna bağlı fiziksel hasara ve aşırı ROT üretiminden kaynaklanan OS'ye maruz kaldığı düşünülmektedir ve bu nedenle sperm fonksiyonlarının bozulduğu belirtilmektedir (232). Sperm, plazma membranındaki yüksek PUFA ve sınırlı bir intrinsik antioksidan savunma mekanizmasına sahip olması nedeniyle OS'ye karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir (223). Kriyoprezervasyon sırasında OS, mitokondriyal disfonksiyona doğrudan veya dolaylı olarak aracılık eder. Dondurulmuş çözülmüş semende, C11-BODIPY581/591 (Lipid Peroxidation Sensor) ile boyama yapıldığında, spermin orta parçasının OS'tan en fazla etkilendiği sonra kuyruk plazma membranının ve baş bölgesinin ise en az etkilendiği gösterildi (233). Kriyoprezervasyon işlemi süresince eklenen dilüentler, sperm antioksidan savunma mekanizmasını bozar, kriyoprezervasyon işlemi sırasında serbest radikallerin aşırı üretimi ise spermin peroksidatif hasara karşı duyarlılığını daha da artırır (232). ROT seviyelerinin yükselmesi ile, Mitogen-activated protein kinase (MAPK) sinyal yolağı

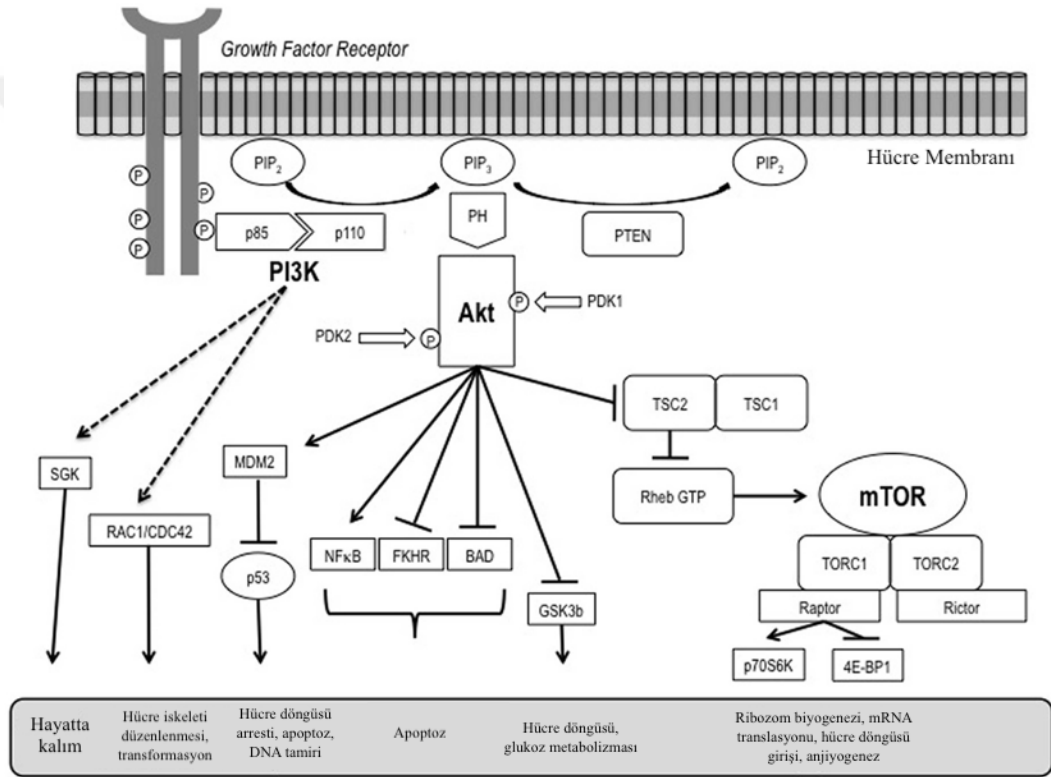
aktive edilir, B-cell lymphoma 2 (BCL-2) protein ailesi, BAX ve BAK proteinleri aracılığıyla dış mitokondriyal membranda mitochondrial permeability transition pores/mitokondriyel geçirgenlik geçiş porları (mPTP) oluşumunu destekler ve sitozolde proapoptotik faktörlerinin ve sitokrom C'nin salınmasını sağlar. Apoptozom oluşumunu uyarır, ardından kaspaz-9'u aktive eder böylece sperm fonksiyonları bozulur, spermin dışı üreme sisteminde hayatta kalımı azalır, kaspaz aracılı apoptotik hücre ölümüne yol açar (234).

Kriyoprezervasyonda hücrel hasarın ana nedeni, plazma membranında meydana gelen hasardır. İlk olarak, soğuk şokun membran çift tabakasının lipid bileşimi ile ilişkili olduğu varsayılmıştır (235). Soğutma işlemi sırasında sıcaklık düşürüldüğünde, fosfolipid lateral hareketinde sınırlanmalar meydana gelir, bu da sıvı fazdan jel fazına dönüşmesine ve böylece membranın daha sert ve kırılabilir hale gelmesine neden olur. Lipid membranları içeren faz değişiklikleri, lipid faz ayırımına yol açar; böylece proteinler geri dönüşümsüz olarak kümelenir (236).

4.18. Fosfoinositol-3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT)/rapamisininin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağı

Çok hücreli organizmalar dış uyaranlara göre tepki verirler, yani metabolik ihtiyaçlarını içinde bulunduğu duruma göre uyarılma yeteneğine sahiptirler (237). Bu, yalnızca bilgiyi entegre edebilen ve buna göre tepki verebilen metabolik yolların varlığından kaynaklanmaktadır. PI3K/AKT ve mTOR sinyal yolağı, büyüme faktörleri, enerji durumu, oksijen, stres ve amino asitlerin metabolik sinyallerini dengeleyen ve uyaranlara göre protein ve lipid sentezi veya otofaji ile sonuçlanan sinyalleşme ağında merkezi bir rol oynar (25). Bu sinyal yolağı, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda hücre büyümesi ve hayatta kalımı için çok önemlidir. Birbirleriyle bağlantılı bu yolak birçok sinyal yolağı ile de yoğun bir şekilde etkileşime girebilmektedir (Şekil 4.6). PI3K/AKT yolu, hücrel stres sırasında sağkalımın kilit regülatörüdür (238). Tümörler, sınırlı besin ve oksijen kaynağı, düşük pH gibi stresli bir ortamda var olduklarından, bu yolağın kanserdeki rolü çok önemli görünmektedir. mTOR memeli hücrelerinde her yerde ekspres edilen bir serin/treonin kinazdır (239). Besin alımı, büyüme faktörleri ve diğer hücrel uyaranlar tarafından başlatılan

sinyalleri alır, birleştirir ve downstream sinyali ve protein sentezini regüle eder. Downstream efektörleri olan 4EBP1 ve P70S6 kinazı (S6K) aracılığıyla, hücre büyümesi, hücre döngüsü ilerlemesi ve hücre metabolizması için gerekli proteinlerin ribozomal translasyonunun başlatılmasında rol oynar. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının aktivasyonu, hücre büyümesi ve sağkalım kontrolünün bozulmasına neden olur, bu metastaza, anjiyogenez ve terapiye karşı dirence yol açar. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı, fizyolojik olduğu kadar kanser gibi patolojik koşullarda da hücre büyümesi ve sağkalım için çok önemlidir (240).



Şekil 4.6 PI3K/Akt/mTOR yolağının şematik gösterimi (Porta C., 2014)

4.18.1. Fosfatidil-inositol-3-kinazlar (PI3K)

Fosfatidil-inositol-3-kinazlar (PI3K'ler), inositol fosfolipidlerin inositol halkasının 3'-OH grubunu fosforile etme yeteneği ile karakterize edilen bir lipid kinaz ailesini oluşturur (241). Sınıf I PI3K'ler, bir katalitik (CAT) alt biriminden (p110) ve bir adaptör/regülatör alt birimden (p85) oluşan heterodimerlerdir. Büyüme faktörü reseptör protein olan tirozin kinazların aktivasyonu, tirozin kalıntılarının

otofosforilasyonu ile sonuçlanır. Regülatör alt birim SH2 bölgesi içerir ki bu fosforile tirozin rezidülerine bağlanarak membrana alınır. Bu, CAT alt biriminin allosterik aktivasyonuna yol açar. PI3K aktivasyonu ile, fosfatidilinositol-4,4-bifosfat substratından (PI-4,5-P2) ikinci haberci fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PI3,4,5-P3) üretilir. Plazma membranında artan PI3,4,5-P3, fosfoinositid-bağımlı kinaz-1 (PDK1) ve AKT/protein kinaz B'nin birikimi ve ko-lokalizasyonuna neden olur. AKT, kendi başına, hücre sağkalımı ve hücre döngüsünün ilerlemesinde yer alan birkaç hücrel süreci düzenler. AKT, kendi başına, hücre sağkalımı ve hücre döngüsü ilerlemesinde yer alan birkaç hücre sürecini düzenler. AKT, Bad ve Prokaspaz-9 gibi proapoptotik faktörleri ve Fas-ligand (FasL) gibi diğer proapoptotik faktörlerin ekspresyonunu indükleyen Forkhead transkripsiyon faktörleri ailesini inaktive edebilir (242, 243).

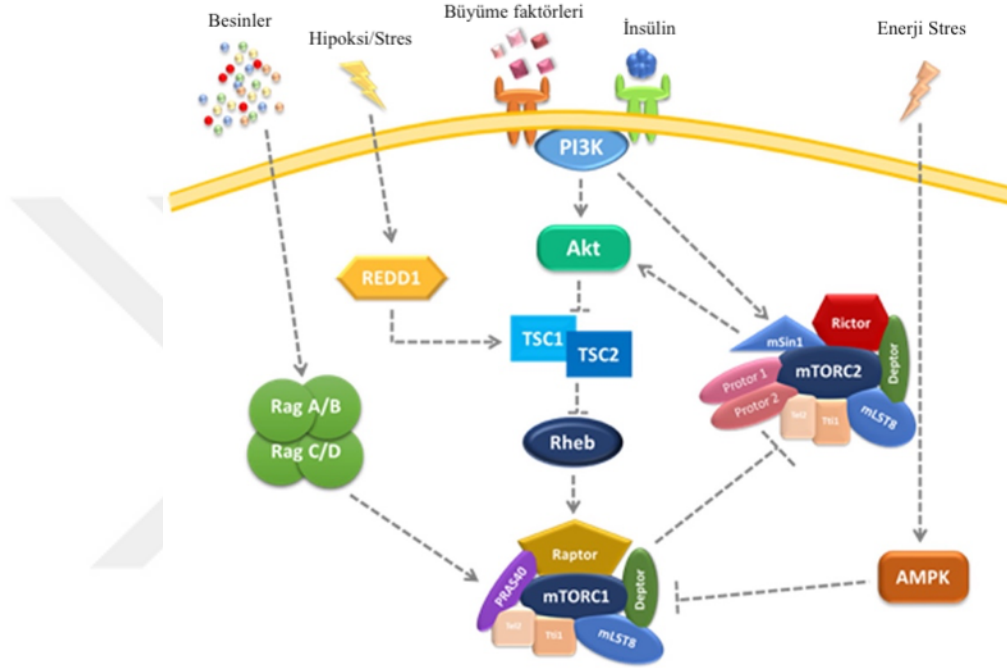
4.18.2. Rapamisinin memeli hedefi (mTOR)

mTOR ilk olarak mayada, aktivitesini inhibe eden bir antibiyotik olan rapamisin uygulaması yoluyla keşfedilmiştir. Daha sonra TOR, memeli hücrelerinde tespit edilmiş ve mTOR olarak adlandırılmıştır (244).

Biyolojik homeostaz, hücre büyümesi, çoğalması ve ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Bu süreçler, büyüme faktörleri, hormonlar, besinler dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından yüksek düzeyde koordine edilir ve düzenlenir. Bu sinyalleri entegre eden sinyal yollarından biri olan mTOR kinaz yolağıdır (245). mTOR, otofajinin yanı sıra protein sentezi, hücrel büyüme, proliferasyon, motilite, hücrel hayatta kalım, glikoz metabolizması (245), hücre iskeleti organizasyonu ve buna benzer çeşitli süreçleri kontrol ederek hücrel homeostaz ve metabolizmanın çok önemli bir düzenleyicisi olarak rol oynayan yaklaşık 290 kDa'lık yüksek oranda korunmuş multifonksiyonel bir serin/treonin protein kinazdır (30).

mTOR işlevlerini yerine getirebilmek için çeşitli proteinlere bağlanarak, mTORC1 ve mTORC2 yapılarını oluşturmaktadır (244). Çeşitli uyarılara yanıt olarak, mTORC1 ve mTORC2 ara bağlantısı, bir sinyalleşme ağı oluşturur. mTORC1 ve mTORC2, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 gibi büyüme faktörleri, amino asitler ve glikoz gibi besinler, leptin gibi hormonlar ve hücrenin hayatta kalmasını destekleyen stresörler (örneğin hipoksi, açlık ve DNA hasarı) dahil çeşitli

yolaklardan gelen sinyalleri entegre eder (244). mTOR, hücrel fizyolojinin temel süreçlerini kontrol eden sinyalleri düzenlemek üzere farklı sinyal yollarıyla etkileşime girer ve bu da mTOR yolağının biyolojik önemini incelemedeki karmaşıklığı artırır (30). mTOR sinyalizasyonu üzerine yapılmış kapsamlı çalışmalara rağmen, işlevleri ve nasıl koordine edildikleri belirsizliğini korumaktadır .



Şekil 4.7 mTOR sinyalizasyonunun düzenlemesini etkileyen upstream sinyalleri (Correia B., 2020)

4.19. Rapamisin ve Erkek Fertilitesi

Spermatogenez esnasında, spermatogonyum birkaç mitoz bölünmeye uğrar, mayoz bölünmelerden geçen birincil spermatozoidlere farklılaşır daha sonra olgun sperme farklılaşan haploid spermatidleri oluşturmaktadırlar (246). Bu süreç, mTOR dahil olmak üzere çok çeşitli sinyal yolları tarafından yüksek oranda kontrol edilir. mTOR sinyal yolağında meydana gelen herhangi bir anormallik, diyabet, kanser ve obezite gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (244). mTOR inhibitörleri, memelilerde yaşam süresini uzatma ve kanser ile yaşa bağlı hastalıkları tedavi etme potansiyeli göstermiştir. İmmüno-supresan ve antikanser ajanı olarak yaygın olarak kullanılan

mTOR inhibitörleri erkeklerde fertilitenin azalması gibi birçok olumsuz yan etkiye sahiptir (30).

mTOR'un erkek fertilitesi üzerindeki olası etkisinin ilk kanıtı, sirolimus (rapamisin) tedavisine bağlı olarak bağışıklık sistemi baskılanmış bir hastanın klinik raporuyla ilgilidir (246). Rapamisin, mTOR'un bir allosterik inhibitörüdür ve 1999'da böbrek nakli hastalarında allogreft reddini önlemek için sirolimus, Rapamune® adı altında immünosupresan olarak onaylanmıştır. Sirolimus (rapamisin) uygulanan hastaların sperm kalitesinde, yani sperm sayısında (oligozoospermi), normal morfolojiye sahip sperm yüzdesinde (teratozoospermi) ve sperm hareketliliğinde (astenozoospermi) belirgin bir düşüş gözlenmektedir (245). Bu hastalara uygulanan immünsüpresif ajan değiştirildiğinde hastanın sperm parametrelerinin tamamen normaleştiği gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada, sirolimusun cinsiyet hormonları seviyeleri üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (245). Bu hastalarda testosteron seviyelerinde azalma, lüteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyelerinde ise artış gözlenmiştir. Bu klinik odaklı raporlar, mTOR inhibitörlerinin kullanımının erkek fertilitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olduğuna dair güçlü kanıtlar sağlamıştır ve bu nedenle mTOR sinyali, erkek üreme potansiyelinin düzenleyicisi olabilir (245). İnsan klinik çalışmalarının sonuçlarına benzer olarak hayvan çalışmalarında da rapamisine maruz kalan sıçanların testis ağırlığında düşüş, seminifer tübül alanında ve sperm üretiminde azalma gözlendi, aynı zamanda G1'de spermatogonyal hücre yüzdesi artarak spermatogonyal hücre döngüsünün ilerlemesi engellendi bu da mTOR inhibisyonunun spermatogenezini bloke ettiğini düşündürmektedir (246). Ayrıca, mTORC1 kompleksinin spermatogonyada aktivasyonu, testis gelişim kusurlarına, sperm sayısında azalmaya ve germ hücre apoptozunun artmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu durum spermatogonyal farklılaşmayı indükleyerek germ hücre havuzunun tükenmesine neden olur. Bu nedenlerden dolayı mTOR, farklılaşma ve spermatogenez için gereklidir (246-248).

4.20. mTOR, Testis Fizyoloji ve Sertoli Hücre Fonksiyonu

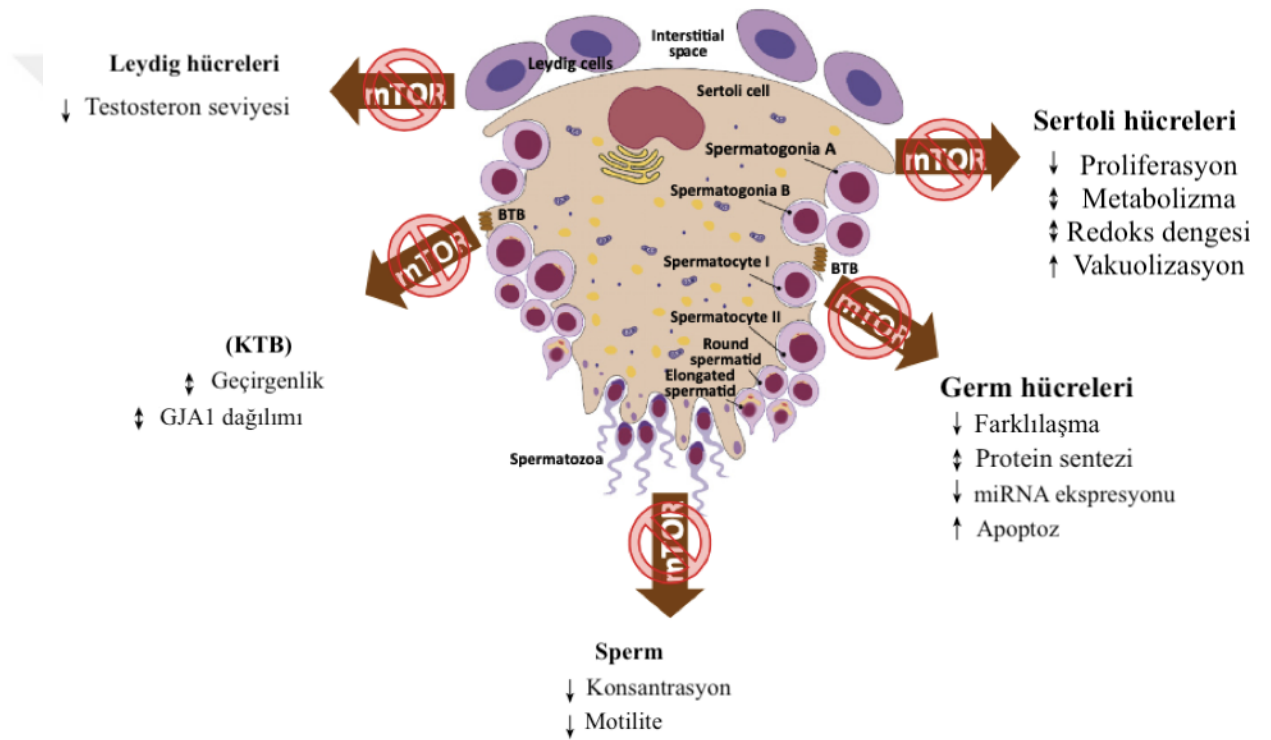
Son çalışmalar, mTOR'un testis fizyolojisindeki kritik mekanizmalarda rol aldığını göstermektedir (Şekil 4.8). mTOR ve ilişkili proteinler testislerdeki hem germ

(özellikle spermatogonyum) hem de somatik (Sertoli ve Leydig) hücrelerde eksprese edildiği, mTORC1 ve mTORC2 tüm bu hücre tiplerinde farklı şekilde bulunduğu belirtilmiştir. Spermatogonyumda, in vitro rapamisin maruziyeti, mTOR/p70s6k yolağının blokajıyla proliferasyonun azalmasına neden olduğu ve bu, mTORC1'in germinal hücre havuzunun korunmasında bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Raptor delesyonuna bağlı olarak mTORC1 geni olmayan fareler sperm motilitesinde azalma göstermektedir, bu mTORC1'in epididimden geçiş sırasında sperm fizyolojisini de düzenlediğini düşündürmektedir (30).

Somatik Sertoli hücreleri, spermatogenez sırasında germ hücre gelişimini sürdürdükleri için hemşire hücreleri olarak bilinir. Sertoli hücrelerinin birbirleri ile birleşerek oluşturdukları Sertoli/KTB oluşturur. Sertoli hücreleri, hormonal ve parakrin kontrol altındadır ve spermatogenez kontrol eden sinyal yollarının çoğunu entegre eder. Bu hücreler mTORC1 ve mTORC2'yi eksprese eder. mTORC1, FSH'nin PI3K/Akt sinyal iletim yolağı aracılığı ile Sertoli hücrelerinin proliferasyonunu sağladığı gösterilmektedir. mTORC1 ayrıca in vitro insan kültür Sertoli hücrelerinin redoks dengesini düzenlediği ve bu hücrelerin gelişen germ hücrelerine sağladığı beslenme desteğini modüle ettiği mTORC2'nin de, spermatogenez sırasında KTB dinamiğinin sağlanmasında rol oynadığı bildirilmiştir (30).

KTB'deki farklı bağlantı türleri aktin hücre iskeletine bağlı olduğundan, KTB'nin yeniden organizasyonu, farklı aktin düzenleyici proteinlerle düzenlenebilir. Yapılan araştırmalar, spermatogenezin epitelyal döngüsü sırasında KTB'nin yeniden yapılandırılmasına yardımcı olmak için F-aktin ağının yeniden düzenlenmesinden mTOR'un da sorumlu olduğunu göstermektedir (249). mTORC2'nin önemli bir bağlayıcı proteini olan Rictor'un, seminifer epitelyal döngünün erken aşamalarında yüksek oranda eksprese edildiği ve p-rpS6 ekspresyonunun yüksek olduğu geç aşamalarda down regüle edildiği gösterilmiştir. Bu, mTORC2'nin, spermatogenezin epitelyal döngüsünün tüm aşamalarında KTB bütünlüğünü korumada rol oynayabileceğini düşündürmektedir (249) (Şekil 4.8). RNAi teknolojisiyle Sertoli hücrelerinde rictor gen sessizleştirilmesi ile, sıkı bağlantı proteinleri ve ZO-1, hücre-hücre bağlantı bölgesinden sitozole taşındığı, böylece hücre adezyonunun zayıfladığı ve Sertoli hücresi sıkı bağlantı bariyerinin bozulmasına yol açtığı bildirilmiştir (249). Ayrıca mTOR yolağının, glikoz taşıyıcılarının ve hız sınırlayıcı glikolitik enzimlerin

aktivitesini kontrol edebileceği öne sürülmüştür. Kanser hücrelerine benzer şekilde (250), rapamisin tedavisi insan Sertoli hücrelerini oksidatif strese, özellikle lipid peroksidasyonuna karşı duyarlı hale getirmektedir (251). Sonuç olarak Sertoli hücrelerinin fizyolojisi ve işlevindeki değişikliklerin, metabolik hastalıklarla ilişkili infertilite için çok önemli olduğu öne sürülmüştür (252). mTOR'un metabolik hastalıkların oluşumunda da yer aldığı rapor edilmiştir (253), bu nedenle, mTOR'un bu patolojik durumların neden olduğu subfertilite veya infertilitedeki olası rolünü araştırmak önemlidir.



Şekil 4.8 mTOR inhibisyonu veya yokluğunun testis hücreleri ve spermatogenez üzerindeki bilinen etkilerini gösteren şematik gösterim (Oliveira PF., 2017)

5. MATERİYAL VE METOT

5.1. Hasta Gruplarının Seçilmesi ve Semen Örneklerinin Toplanması

Bu çalışma için, Ağustos 2021- Ekim 2021 tarihleri arasında Medicana Çamlıca Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri Merkezi'ne infertilite problemiyle başvuran 20 hasta dahil edilmiştir. Semen örnekleri, DSÖ tarafından belirlenen semen parametrelerine göre normozoospermi olan erkek hastalar seçilmiştir (1). Çalışma dışı tutulma kriterleri olarak; 40 yaşından büyük olma, çalışma ortamında toksik maddelere ya da radyasyona maruz kalınması, sigara ve alkol kullanımı, geçirilmiş testis ameliyatı, genital sistem enfeksiyonuna veya kronik hastalığa sahip olma durumu olarak belirlenmiş ve bu kriterlerden herhangi birine sahip kişiler çalışmaya dahil edilmemiştir. Bu çalışmada, hastalardan alınan sperm örnekleri hastaların onayı alınarak kullanılmıştır. Etik kurul onayı Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan, 20/05/2021 tarihinde ve 511 karar numarası ile alınmıştır.

5.2. Semen Örneklerinin Hazırlığı

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) ile hesaplanmıştır. Belirtilen sperm parametrelerinin belirlenmesi ve sperm yıkama prosedürü DSÖ kriterlerine uygun olarak yapılmıştır (1).

En az 2 günlük (2-5 gün) cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla steril bir kaba alınan semen örnekleri, 37°C sıcaklıktaki inkübatörde yaklaşık 20 dakika bekletilmiş ve likefiye olması sağlanmıştır. Likefaksiyon sürecinin ardından ilk 30 dakikada semen parametreleri analiz edilmiştir. Sperm parametrelerinin analizi esnasında semen örnekleri ısıtıcı tabla üzerinde tutulmuştur. 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 spermeler 3 gruba ayrılmıştır. +4 motilite progresif motil yani ileri hızlı hareketli spermeleri, +3 motilite yavaş hareketli spermeleri, +2 motilite yerinde hareketli spermeleri tanımlamaktadır. Sayılan spermeler 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 spermeler ile anormal spermeler ayrılmıştır. Spermeler normal, baş anomalisi, boyun anomalisi ve kuyruk anomalisi olmak üzere dört kategoride incelenmiş, sonuç yüzde olarak verilmiştir.

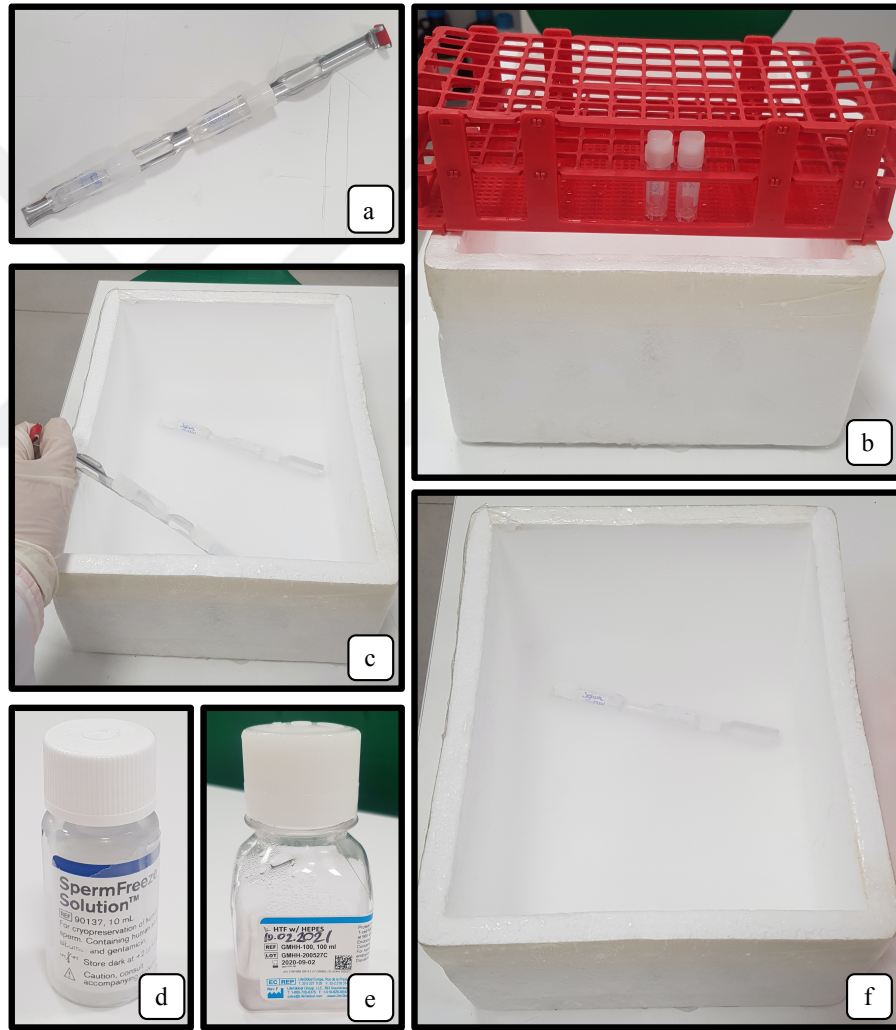
Hastadan alınan semen örneğinin 10 µl'si daha sonra yapılacak analizler için lam üzerine alınarak yayma preparatları hazırlanmış ve kapalı, serin bir ortamda muhafaza edilmiştir. Geriye kalan semen örneğinden 200 µL alınarak 2500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş, total oksidan ve antioksidan seviyeleri (TAS-TOS) ölçümü aşamasına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

5.3. Sperm Kriyoprezervasyonu

Steril kaptaki toplanan semen örneği üzerine 1:1 oranda sperm kriyoprotektan (Vitrolife, 90137, İsveç) (Resim 5.1.d) damla damla eklendi, pipetaj yapılarak karıştırılması sağlandı ve örnekler kriyotüplere aktarıldı (Resim 5.1.a.). 10 dk oda ısısında bekletilen kriyotüpler daha sonra sıvı nitrojen seviyesinin 10-15 cm üzerine yerleştirildi ve 20 dakika sıvı nitrojen buharına maruz bırakıldı (Resim 5.1.b). Bu işlemin ardından kriyotüpler sıvı nitrojenin içine daldırılarak 20 dk bekletildi (Resim 5.1.c ve Resim 5.1.f).

Dondurulan semen örnekleri çözme işlemi için sıvı azot içerisinden oda sıcaklığına alınarak 10 dk bekletildi. Tamamen eriyen kriyoprotektan semen karışımı santrifüj aşaması için ependorfa aktarıldı. Numune üzerine HEPES'li sperm yıkama

medyumu (LifeGlobal, GMHH-100, Belçika) (Resim 5.1.e) ilave edilerek numune süspansede edildi. Oda sıcaklığında 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant ve pelletten oluşan numunenin, süpernatant kısmı atıldıktan sonra pellet üzerine HEPES'li sperm yıkama medyumu (LifeGlobal, GMHH-100, Belçika) ilave edilerek tekrar oda sıcaklığında 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantın bir kısmı kriyoprezervasyon sonrası oksidatif stres parametreleri analizi için ependorfa alınarak seminal oksidatif stres analizi aşamasına kadar -20°C'de muhafaza edildi. Pellet ise süspansede edildi, lam üzerine yayma preparat hazırlandı (254).



Resim 5.1 Sperm kriyoprezervasyonu işlemi

5.4. 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 kullanıldı. Sonuçlar kit protokolünde yer alan formül ile hesaplandı. TOS, seminal plazma total oksidan seviyesini, TAS, seminal plazma total antioksidan seviyesini göstermektedir. Oksidatif stres indeksi (OSI) için TOS ve TAS oranlandı, yüzde olarak belirtildi. Oksidatif stres indeksi hesaplamadan önce TAS analizi sonucundaki mmol değeri TOS analizindeki gibi µmol birimine çevrildi.

$$OSI = TOS / (TAS \times 10)$$

5.4.1. Total oksidan seviyesi

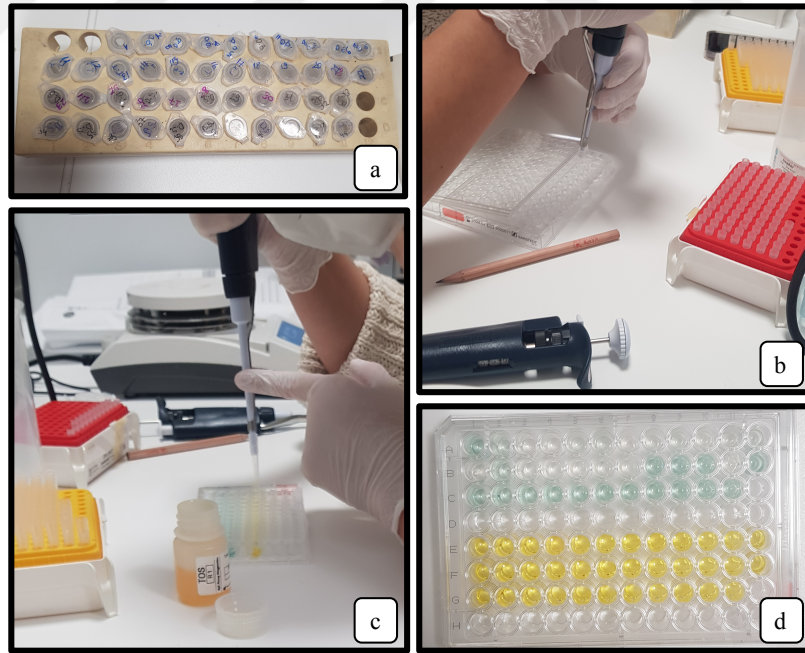
Rel Assay TOS Kit (Sigma-Aldrich) protokolüne göre 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 7,5 µL semen örnekleri eklenmiştir (Resim 5.2.b). Standart 1 için double distile sudan (ddH₂O) 7,5 µL, Standart 2 için ise Rel Assay TOS Kiti içerisinde yer alan 7,5 µL Stock Stabilized Standart solüsyonundan eklenmiştir. Ardından semen örnekleri, Standart 1 ve Standart 2 bulunan kuyucukların içerisine Rel Assay TOS Kiti içerisinde yer alan Assay Buffer (Reagent 1) solüsyonundan 50 µL eklendi (Resim 5.2.c). Spektrofotometre kullanılarak ilk absorbans ölçümü 530 nm'de gerçekleştirilmiştir. İlk absorbans ölçümü sonrası semen örnekleri, Standart 1 ve Standart 2 bulunan kuyucukların içerisine Rel Assay TOS Kiti içerisinde yer alan Prokromojen Solüsyonundan (Reagent 2) 2,5 µL eklendi ve yavaşça çalkalanarak 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak 530 nm'de son absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen değerlerle TOS sonucu hesaplandı.

$$\text{Sonuç} = (\Delta\text{Abs Numune} / \Delta\text{Abs Standart2}) \times 10$$

5.4.2. Total antioksidan seviyesi

Rel Assay TAS Kit (Sigma-Aldrich) protokolüne göre 96 kuyucuklu plakamın her bir kuyucuğuna 3 µL semen örnekleri eklenmiştir. Standart 1 için double distile sudan (ddH₂O) 3 µL, Standart 2 için ise Rel Assay TAS Kiti içerisinde yer alan 3 µL 1.0 mmolTrolox Equiv/L solüsyonundan eklenmiştir. Ardından 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. Spektrofotometre kullanılarak ilk absorbans ölçümü 660 nm'de gerçekleştirilmiştir. İlk absorbans ölçümü sonrası semen örnekleri, Standart 1 ve Standart 2 bulunan kuyucukların içerisine Rel Assay TAS Kiti içerisinde yer alan Colored ABST Radical Solüsyonundan (Reagent 2) 7,5 µL eklendi ve yavaşça çalkalanarak 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak 660 nm'de son absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen değerlerle TAS sonucu hesaplandı.

$$\text{Sonuç} = [(\Delta\text{Abs Standart1}) - (\Delta\text{Abs Numune})]/[(\Delta\text{Abs Standart1}) - (\Delta\text{Abs Standart2})]$$

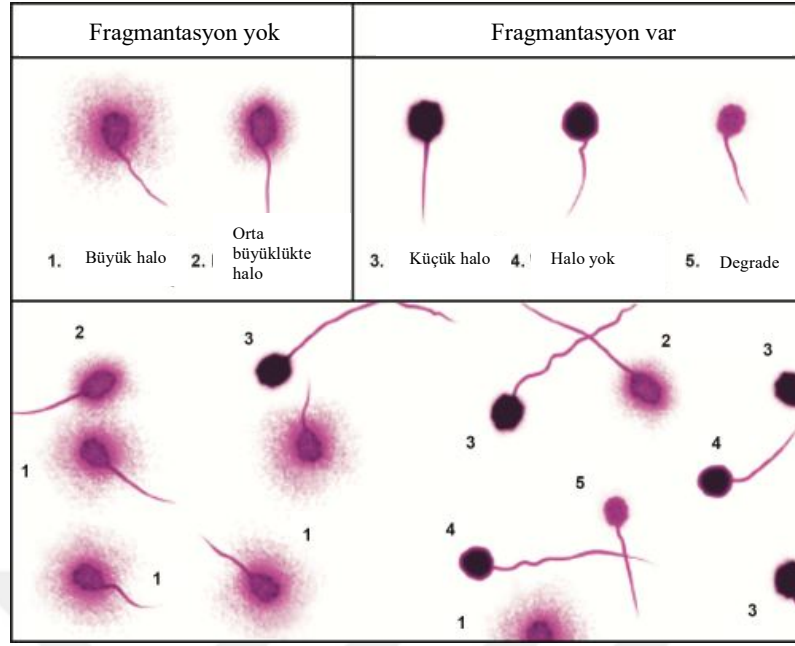


Resim 5.2 Seminal sıvı oksidatif stres parametrelerinin analizi

5.5. DNA Fragmantasyon Analizi

Çalışmaya dahil edilen hastaların sperm hücrelerindeki DNA fragmantasyonu ya da diğer bir deyişle kromatin yapısındaki farklılıkları AnnexinV-PI ve SCD teknikleri ile analiz gerçekleştirilmiştir.

DNA fragmantasyonu belirlemek için ilk olarak HaloSperm kiti (Halotech DNA SL, Halosperm HT- HS10, İspanya) kullanılmıştır. Ticari kit içerisindeki agaroz tüpler eriyene kadar su banyosunda 95°C-100°C'de 5 dk, ardından etüv içerisinde 37°C 5 dk bekletildi. Her bir semen örneği için bir ependorf tüpü içerisine 12,5 µL semen örneği ve 20 µL eritilmiş agaroz jel eklenerek karıştırıldı. Elde edilen karışım kit içerisinde yer alan slayt üzerine yayılarak üzeri bir lamel ile kapatıldı. Ardından agarozun katılaşması ve sperm hücrelerine invazyonu amacıyla buzdolabında 4°C'de 5 dk bekletildi. 80 µL denatürasyon ajanı ile 10mL distile su karıştırılarak denatürasyon solüsyonu hazırlandı. Buzdolabından çıkartıldıktan sonra lamel çıkartıldı ve oda sıcaklığında denatürasyon solüsyonu ile 6 dakika inkübasyonu sağlandı. Sperm yaymaları denatürasyon solüsyonundan çıkarılarak lizis solüsyonu içerisinde 23 dk inkübe edilmiştir. Lizis solüsyonundan çıkartılan slaytlar 5 dk distile su içinde inkübe edildi. Dehidrasyonun sağlanması amacıyla % 70, %90 ve % 100'lük etanolde 2'şer dk inkübe edildi ardından oda sıcaklığında kuruması için beklendi. Kuruma sonrası slaytlar Diffquick ile boyandı. Daha sonra her bir örnek ışık mikroskobu altında immersiyon yağı yardımıyla 100X objektifte sperm hücrelerinin halo oluşturma durumlarına göre 100 hücre sayılarak DFI hesaplandı, sonuçlar yüzde olarak belirtildi. Halo görüntüsü oluşan spermler normal veya hasarsız DNA yapısına sahip olarak kabul edilirken, halo gözlenmeyen spermler ise DNA fragmantasyonu olan spermler olarak kabul edildi (Şekil 5.3).



Şekil 5.1 HaloSperm yöntemiyle sperm boyaması (HaloSperm, Halotech DNA)

Bu çalışmada HaloSperm kiti (Halotech DNA SL, Halosperm HT- HS10, İspanya) ile belirlenen sperm DNA fragmantasyonu ticari olarak satılan Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II MSDS kiti uygulanarak doğrulanmıştır. DNA fragmantasyonu analizi için; 1X steril PBS ile yıkanan hücreler, 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelleti kit içeriğinde bulunan 1X Binding Buffer ile karıştırıldı. Hücre-Binding Buffer karışımından 195 µl alınarak steril tüpe ayrıldı ve karışım üzerine ve 5 µl Annexin V-FITC eklenerek süspanse edildi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Hücreler 1X Binding Buffer ile tekrar yıkandı ve 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti Binding Buffer ile tekrar süspanse edildi ve 10 µl PI eklendi. Ardından konfokal mikroskopta analiz edildi.

5.6. Kromatin Yapı Analizi

Sperm kromatin yapısı TB boyama ile analiz edildi. Sperm yaymaları, 1:1 oranında aseton ve %96 etanol solüsyonu içerisinde 4°C'de 1 saat boyunca fikse edildi. Ardından fiksasyon solüsyonundan alınarak oda ısısında kuruması sağlandı. 4°C'de 0,1 N HCl (Merck K50227117 818, Almanya) içerisinde 5 dakika hidrolize edildi.

Preparatlar distile su ile 5 dk boyunca yıkandı. %1 TB ile oda ısısında 5 dakika boyunca boyandı. Ardından preparatlar distile su ile 5 dk boyunca tekrar yıkandı. Işık mikroskopunda immersiyon yağı yardımıyla 100X objektifte görüntüledi (255). Açık mavi boyanan hücreler kromatin yapısı bozulmamış spermiler olarak, koyu mavi boyanan spermiler kromatin yapısı bozulmuş olarak değerlendirilerek her preparatta 100 sperm hücresi sayılmıştır. Elde edilen değer yüzde olarak belirtilmiştir.

5.7. mTOR Proteini İmmünohistokimyasal Analizi

5.7.1. Kimyasal maddeler ve solüsyonlar

10X Phosphate Buffered Saline (PBS) Stok Solüsyonu

10X PBS stok solüsyonu hazırlamak için 800 ml distile su (dH₂O) içinde 80 gr NaCl, 2 gr KCl, 2 gr KH₂PO₄, 21,6 gr Na₂HPO₄ eklendi ve tüm solüsyon 1 litreye tamamlanarak karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlandı. Elde edilen 10X PBS stok solüsyonu distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanıldı.

%4 Paraformaldehit (PFA) Fiksatif Çözeltisi

%4 PFA hazırlamak için 32 gr PFA, 800 mL dH₂O içerisine eklendi. Çözünme hızını artırmak ve homojen bir karışım sağlamak için solüsyon içerisine 10 küçük NaOH tableti eklendi ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile PFA'nın çözünmesi sağlandı. Berrak görünüm elde edildikten sonra solüsyon soğumaya bırakıldı ve pH metre ile son pH 7,3 olarak ayarlandı.

%3 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Çözeltisi

%30 H₂O₂ (Fisher Scientific JT Baker, Amerika) kullanılarak 80 mL hacimde %3 H₂O₂ hazırlamak için 72 mL metanol (marka) ile 8 ml H₂O₂ karıştırıldı.

Citrate Buffer Solüsyonu

Citrate Buffer (Bio Optica 15M-103, İtalya) solüsyonu hazırlamak için dH₂O kullanılarak 1:10 oranında dilüsyon yapıldı.

mTOR Primer Antikoru

mTOR (Invitrogen AHO1232) antikorunun dilüsyon oranı yapılan dilüsyon denemeleri 1:100 olarak belirlendi. Antikorlar PBS ile dilüe edilmiştir.

DAB Kromojen/Substrat

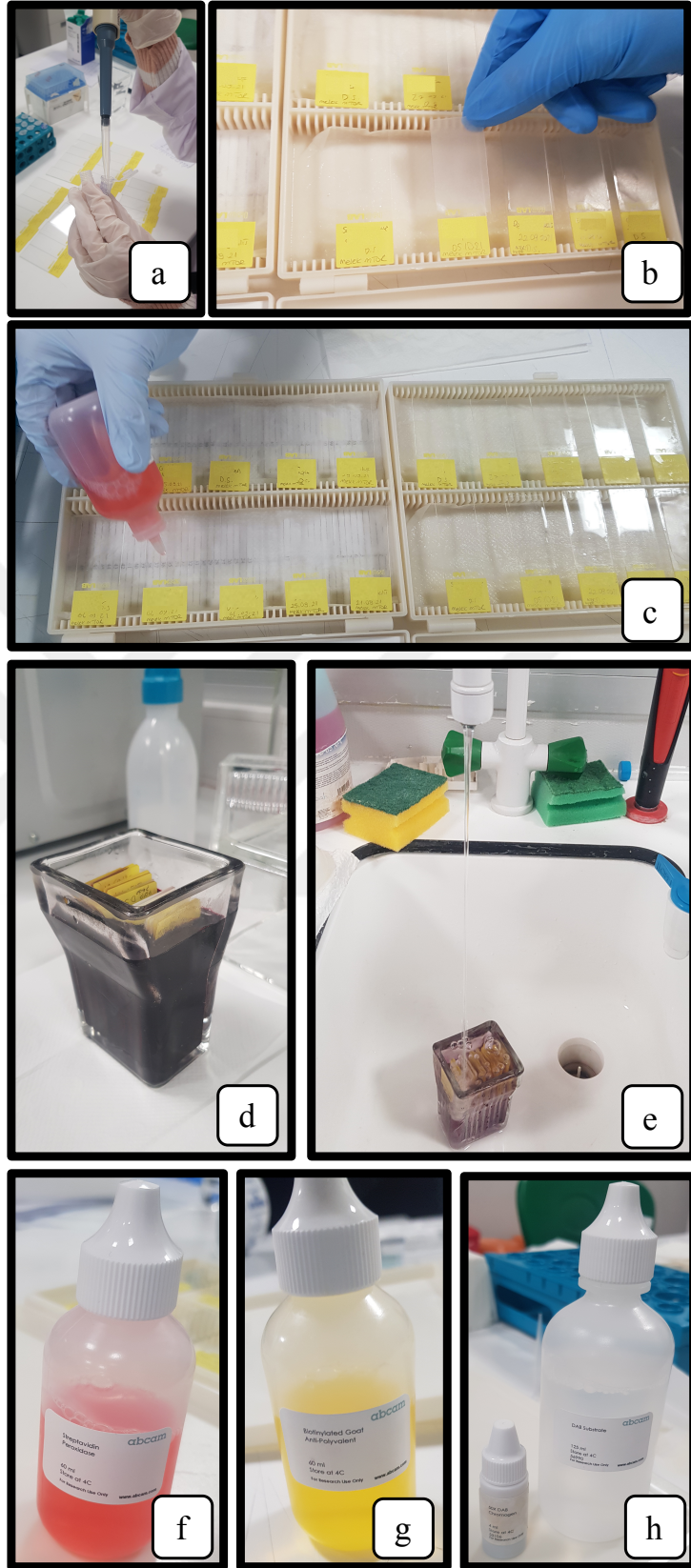
Ticari olarak satın alınan DAB Kromojen/Substrat kit (Abcam, ab64238; İngiltere) prosedüründe yazan bilgilere dayanarak her bir preparata 50 µl damlatılacak şekilde 1:50 oranında hazırlanmıştır.

5.7.2. mTOR proteini immünohistokimyasal analiz protokolü

mTOR proteininin ekspresyonu immünohistokimyasal boyama yöntemiyle belirlendi, bunun için ilk olarak yayma semen örneği preparatları %4'lük PFA ile 30 dk fikse edildi (Resim 5.3.a). Fiksasyon işleminin ardından preparatlar PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı. Endojen peroksidaz aktivasyonunu inhibe etmek amacıyla yayma preparatlar %3'lük hidrojen peroksit ve metanol solüsyonu içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Preparatlar, PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı. Ardından antijenlerin geri kazanımı amacıyla mikrodalgada ısıtma yöntemi kullanıldı. Yayma preparatlar mikrodalga şalesi içine alındı, Citrate Buffer solüsyonu ilave edilerek 800 Watt'ta kaynayana kadar yaklaşık 3 dk boyunca inkübe edildi. Kaynama sonrası ısı kademesi 200 watt'a alınarak preparatlar mikrodalga içerisinde 20 dakika boyunca inkübe edildi. Preparatların bulunduğu şaleler mikrodalgadan çıkarılarak 20 dakika soğumaya alındı. Preparatlar, PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı. Antikorların hücrelere veya Fc reseptörlerine non-spesifik bağlanmasını önlemek amacıyla preparatlara bloklama solüsyonu uygulandı ve 10 dk bekletildi. Preparatlar tekrar PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı. Lamların yüzeyi, PAP pen hidrofobik kalem ile sınırlandırıldı. mTOR primer antikoru (Invitrogen AHO1232) 1:100 dilüsyonda hazırlandı ve her bir preparat üzerine 50 µl damlatılarak, 1 gece boyunca +4 °C'de, ıslak peçeteler kullanılarak hazırlanan nemli bir ortamda inkübasyon gerçekleştirildi (Resim 5.3.b ve Resim 5.3.h). Yaklaşık olarak 18 saatlik inkübasyon sonrası preparatlar, PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı. Yıkanan preparatlar üzerine immünohistokimyasal boyama için kullanılan kit içerisinde hazır olan Biotinilated Goat Anti-Polyvalent (Mouse and Rabbit Specific HRP Detection

IHC Kit, ab93677; Abcam) damlatılarak 10 dk bekletildi (Resim 5.3.g), PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı. Her bir preparat üzerine 3'er damla olacak şekilde Streptavidin Peroxidase (Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit, ab93677; Abcam) damlatıldı (Resim 5.3.c) ve 10 dk bekletildi. Preparatlar, PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı. Preparatlar, antijen-antikor kompleksini görünür hale getirmek için gerekli olan DAB Kromojen (Abcam, ab64238; İngiltere) ile 8 dk boyunca inkübe edildi ardından PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı. PBS ile yıkama işleminin ardından preparatlar zıt boyama için Mayer's hematoksilin'de (Bio Optica 05-06002/L, İtalya) 2 dk bekletildi (Resim 5.3.d). Bu işlemin ardından preparatlar çeşme suyu dolu şale içerisine alındı ve mordanlama işlemi için 10 dk akan çeşme suyunun altında bekletildi (Resim 5.3.e ve Resim 5.3.f). İşlem sonrası preparatlar kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatların üzerine Biomount (Bio Optica 05-BM500, İtalya) damlatıldı ve lamel ile kapatılarak mikroskop altında incelendi (255, 256).

Her preparatta skorlama 100 sperm hücresi sayılarak gerçekleştirilmiş, ekspresyon olmayan veya ekspresyon olan bölgeler (baş, akrozom, sitoplazmik droplet, boyun, kuyruk) olarak sınıflandırıldı. Ekspresyon şiddeti az ise 1, orta ise 2, çok ise 3 olarak puanlandırıldı. Her bir sperme verilen puanlar toplanmış, 100 hücre için ortalama puan belirlendi. Elde edilen değer İmmün Reaktivite Skoru (IRS) olarak belirtildi.



Resim 5.3 İmmünohistokimyasal analiz basamakları

5.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 22.0 istatistik programı kullanıldı, veriler ortalama \pm SD olarak sunuldu, kategorik değişkenler için ki-kare testi kullanılarak grupların karşılaştırılması yapıldı. Nicel değişkenlerin karşılaştırılmasında t-test ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ olarak kabul edildi.



6. BULGULAR

6.1. Sperm Parametreleri

Sperm konsantrasyonu, toplam motilite ve normal morfoloji oranı olmak üzere sperm parametreleri, DSÖ laboratuvar kılavuzuna göre değerlendirilmiştir. Buna göre kriyoprezervasyon öncesi sperm konsantrasyonu $34,75 \pm 9,42$ olarak bulunmuş, çözme işlemi sonrası ise $31,50 \pm 8,58$ olarak belirlenmiştir. Toplam motilite kriyoprezervasyon öncesi $53,50 \pm 33,49$ olarak belirlenmiş, çözme sonrası ise $40,00 \pm 27,77$ olarak belirlenmiştir. Normal morfoloji oranı kriyoprezervasyon işlemi öncesinde $1,00 \pm 1,15$ iken çözme sonrası $0,50 \pm 0,57$ olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve çözme sonrası olmak üzere belirtilen sperm parametreleri karşılaştırıldığında azalma gözlenmiştir ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 6.1).

Tablo 6.1 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda ortalama sperm parametreleri (Ort \pm SD)

Sperm Parametreleri	Gruplar		<i>p</i> değeri
	Kriyoprezervasyon Öncesi	Çözme Sonrası	
Sperm Konsantrasyonu ($\times 10^6/\text{mL}$)	$34,75 \pm 9,42$	$31,50 \pm 8,58$	0,48
Toplam Motilite Oranı (%)	$53,50 \pm 33,49$	$40,00 \pm 27,77$	0,34
Normal Morfoloji Oranı (%)	$1,00 \pm 1,15$	$0,50 \pm 0,57$	0,68

Ort \pm SD: Ortalama \pm Standart Sapma

6.2. Oksidatif Stres Parametreleri

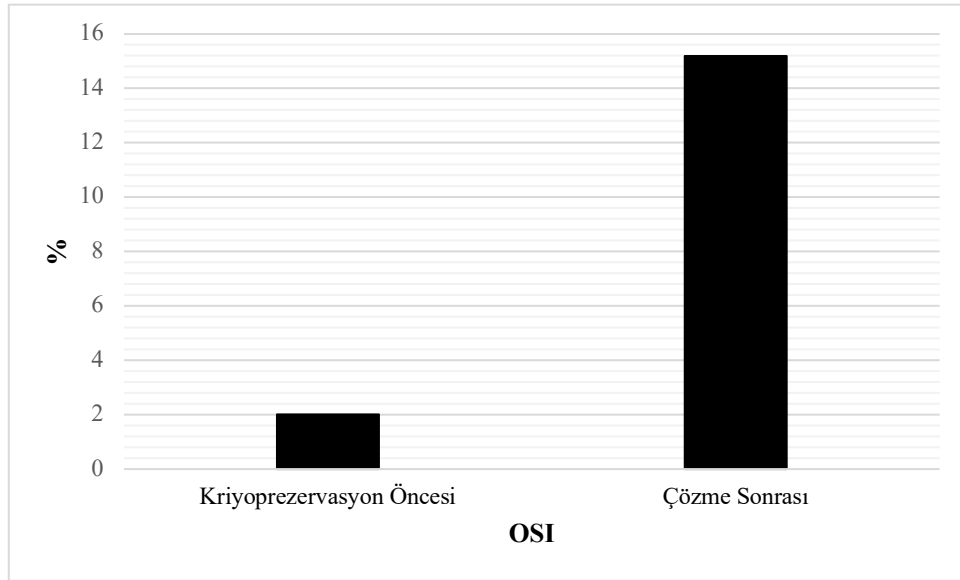
Tablo 6.2'de kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve çözme sonrasında hastaların seminal plazmalarındaki total antioksidan ve oksidan parametreleri gösterilmiştir. Tablodan da görüldüğü üzere çözme sonrası TAS seviyesi, kriyoprezervasyon öncesi

gruba göre düşük bulunmuştur. TOS seviyesine bakıldığında ise çözme sonrası grupta diğer gruba kıyasla daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur.

OSI, TOS'un, TAS'a oranı ile hesaplanmış ve yüzde olarak verilmiştir. OSI, çözme sonrası grubunda kriyoprezervasyon öncesi gruba kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 6.2 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda oksidatif stres parametreleri (Ort \pm SD)

Oksidatif Stres Parametreleri	Gruplar		<i>p</i> değeri
	Kriyoprezervasyon Öncesi	Çözme Sonrası	
TAS (mmol Trolox eq.)	0,98 \pm 0,45	0,13 \pm 0,12	
TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	8,95 \pm 1,32	10,32 \pm 1,10	
OSI (Ort \pm SD)	2,01 \pm 3,96	15,19 \pm 12,70	0,83



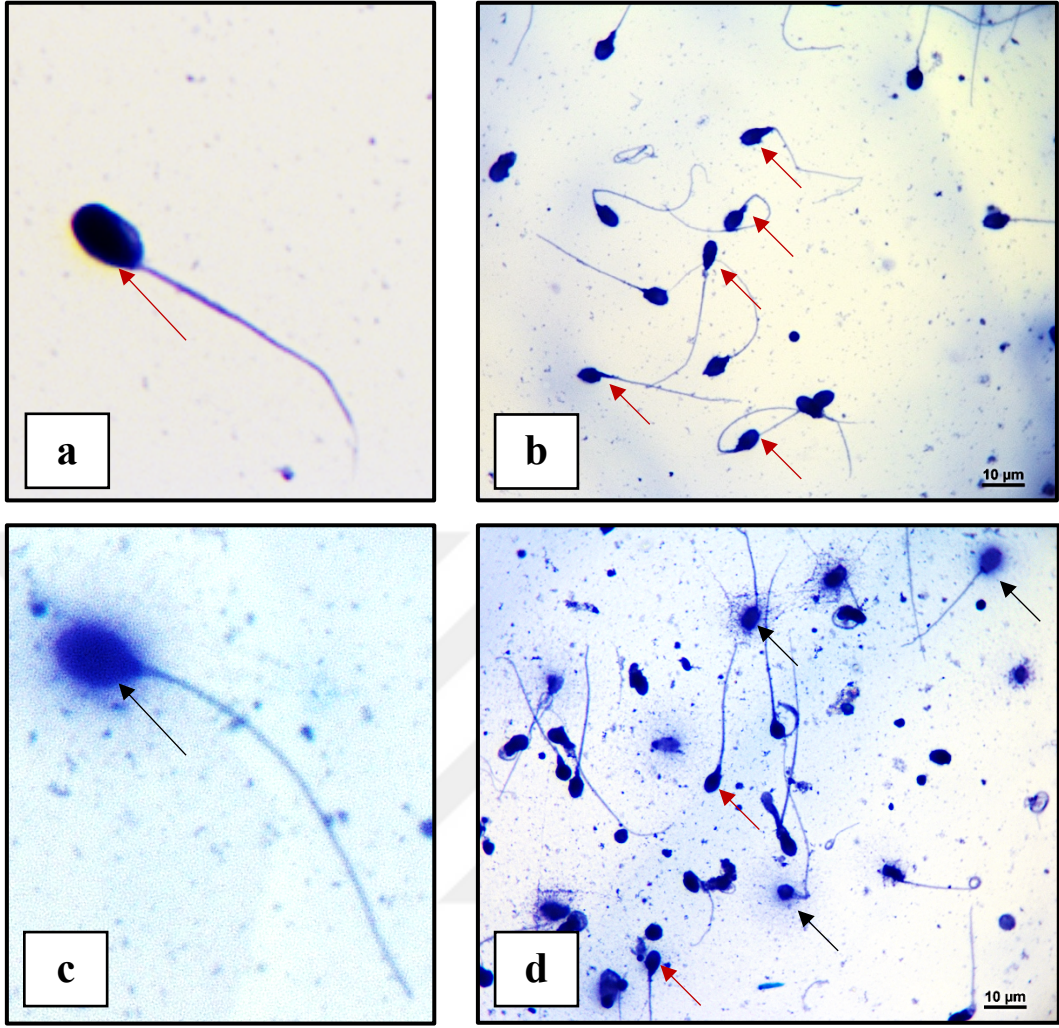
Şekil 6.1 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda oksidatif stres indeksi (%)

6.3. DNA Fragmantasyon Analizi

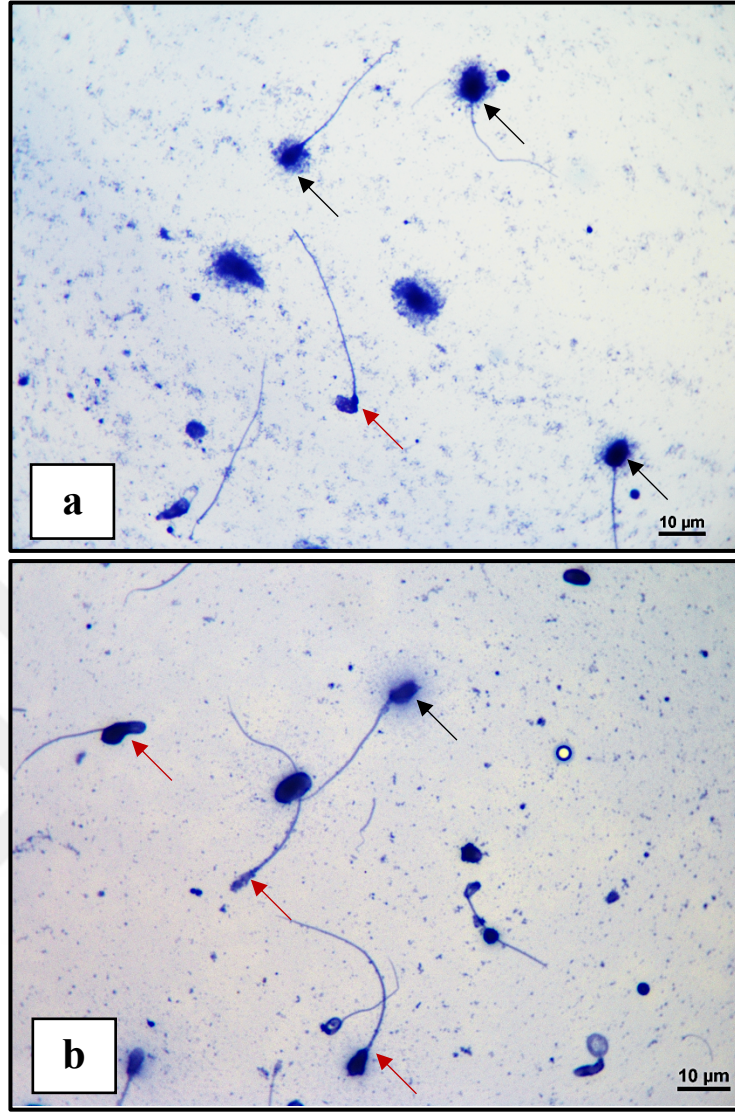
HaloSperm kiti ile yapılan DNA fragmantasyon analiz sonuçları Tablo 6.3'te, görüntüleri ise Resim 6.1, Resim 6.2 ve Resim 6.3'te gösterilmiştir. Tablo 6.3'te kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve kriyoprezervasyon işlemi sonrası grupların sperm hücrelerinin DFI değerleri gösterilmektedir. Gruplar arasında kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası olmak üzere DFI değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p \leq 0,05$). Kriyoprezervasyon öncesi DFI değeri $31,29 \pm 15,18$ iken kriyoprezervasyon sonrası DFI değeri $61,79 \pm 13,53$ olarak hesaplanmıştır. HaloSperm kiti ile yapılan DNA fragmantasyonu analizi Annexin V-PI ile doğrulanmıştır. Annexin V-PI ile DNA fragmantasyon analizi sonuçlarına göre kriyoprezervasyon işlemi sonrası çözülen semen örneğinde apoptotik (kırmızı-yeşil) hücrelerde apoptotik olmayan hücrelere (boyanmamış) kıyasla önemli ölçüde artış gözlenmiştir.

Tablo 6.3 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda DNA fragmantasyon indeksi (DFI) (Ort \pm SD)

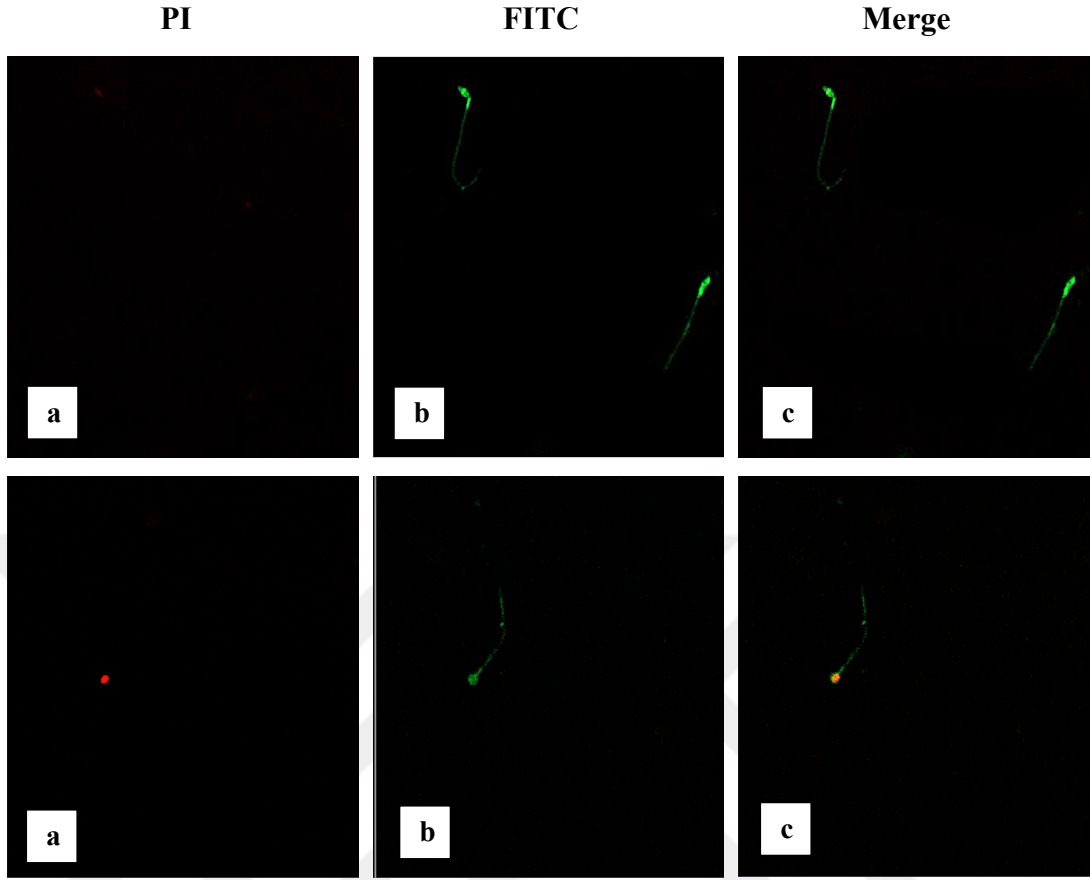
	Gruplar		<i>p</i> değeri
	Kriyoprezervasyon Öncesi	Çözme Sonrası	
DFI (Ort \pm SD)	$31,29 \pm 15,18$	$61,79 \pm 13,53$	0,057
Min-Max	17,27 - 52,20	50,38 - 80,42	



Resim 6.1 Çalışmaya katılan hastaların sperm hücrelerinin SCD yöntemiyle belirlenen DNA fragmentasyon analizinin ışık mikroskopik görüntüsü (X100). DNA fragmentasyonu olan hücreler kırmızı ok ile, DNA fragmentasyonu olmayan hücreler siyah ok ile gösterilmiştir. a. DNA fragmentasyonu olan sperm hücresi b. DNA fragmentasyon analizi sonrası DNA fragmentasyonu olan sperm hücreleri c. DNA fragmentasyonu olmayan sperm hücresi d. DNA fragmentasyon analizi sonrası DNA fragmentasyonu olan ve olmayan sperm hücreleri



Resim 6.2 15 ve 24 numaralı hastalara ait sperm hücrelerinin SCD yöntemiyle belirlenen DNA fragmentasyon analizinin ışık mikroskopik görüntüsü (X100). a. Kriyoprezervasyon işlemi öncesi DNA fragmentasyon analizi b. Çözme işlemi sonrası DNA fragmentasyon analizi. DNA fragmentasyonu olan hücreler kırmızı ok ile, DNA fragmentasyonu olmayan hücreler siyah ok ile belirtilmiştir.



Resim 6.3 Kriyoprezervasyon işlemi sonrası çözölen semen örneğinin Annexin V-PI yöntemiyle DNA fragmentasyonu analiz sonuçları (X20). Apoptotik hücreler kırmızı ve yeşil ile gösterilmiştir. a. PI boyaması (kırmızı) b. FITC boyaması (yeşil) c. Merge (birleştirilmiş) görüntüsü

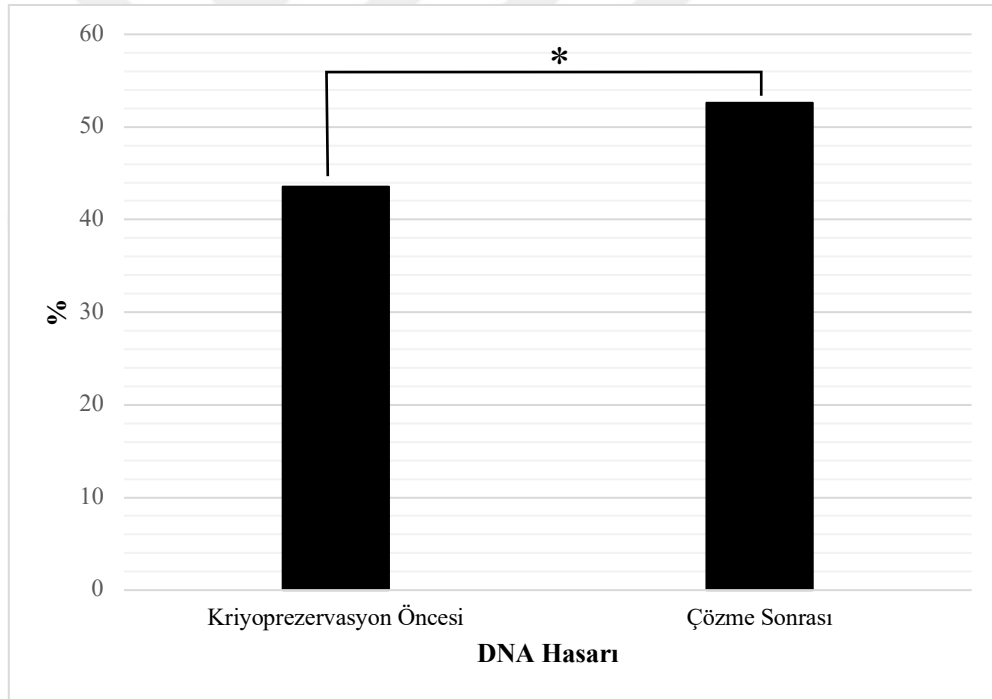
6.4. Kromatin Yapı Analizi

Bu çalışmada kromatin bütönlüğü analizi için TB yapılmış, analiz sonuçları Tablo 6.4 ve Şekil 6.5'te, görüntüleri ise Resim 6.4 ve Resim 6.5'de gösterilmiştir. Hastaların sperm sayısına göre TB analizi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları karşılaştırıldığında kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,05$).

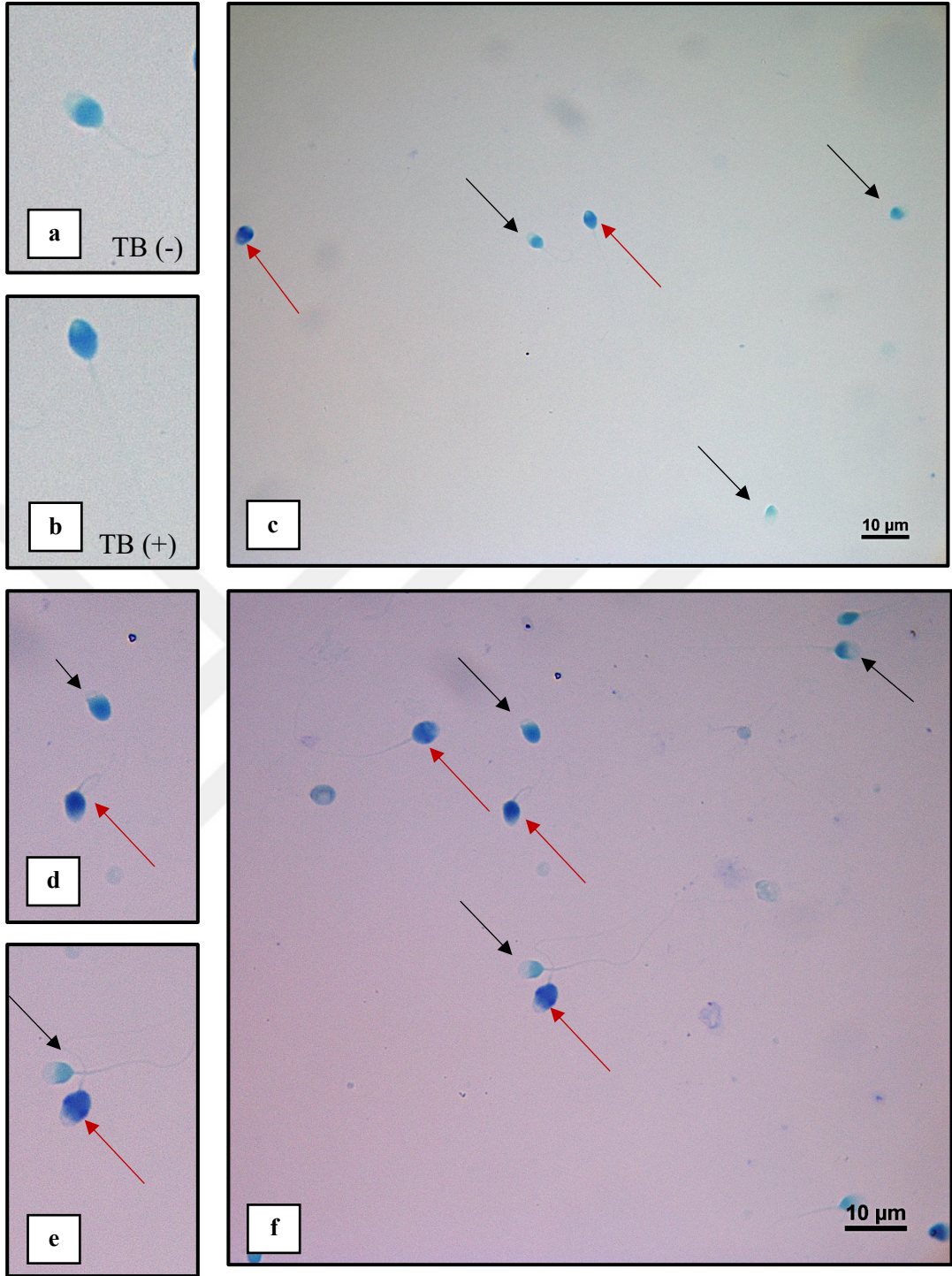
Tablo 6.4 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda DNA Hasarı (Ort \pm SD)

	Gruplar		<i>p</i> değeri
	Kriyoprezervasyon Öncesi	Çözme Sonrası	
DNA Hasarı (Ort \pm SD)	43,55 \pm 8,08	52,59 \pm 10,27	0,006
Min-Max	28,95 - 56,92	33,20 - 73,64	

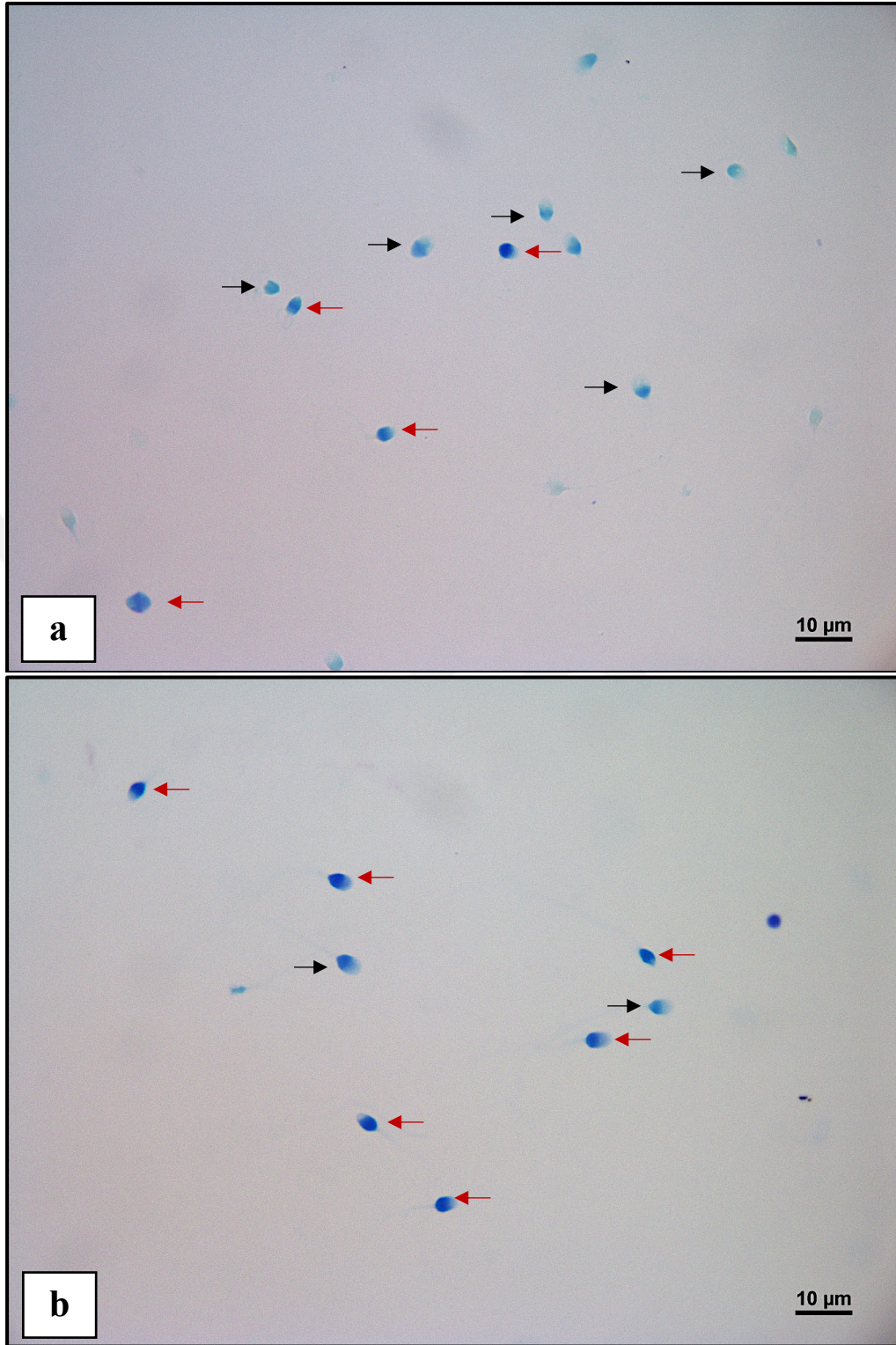
Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası hastaların kromatin bütünlüğü kıyaslandığında çözme sonrası grubunun sperm başı diğer gruba kıyasla daha koyu boyanmış ve koyu boyanmış hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p \leq 0,05$) (Şekil 6.5).



Şekil 6.2 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda DNA Hasarı (%) * İstatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$)



Resim 6.4 Toluidin Blue ile sperm kromatin bütünlüğü değerlendirilen sperm hücreleri görüntüsü (X100). a.Normal DNA'ya sahip sperm hücresi b. Hasarlı DNA'ya sahip sperm hücresi c ve f. TB ile DNA hasarı değerlendirilen sperm hücreleri d ve e. Normal ve hasarlı DNA'ya sahip sperm hücreleri. Hasarlı DNA'ya sahip sperm hücreleri koyu mavi olarak boyanmış ve TB (+) (kırmızı ok) olarak belirtilmiştir. Normal kromatin yapısına sahip sperm hücreleri ise açık mavi renge boyanmış ve TB (-) (siyah ok) ile gösterilmiştir.



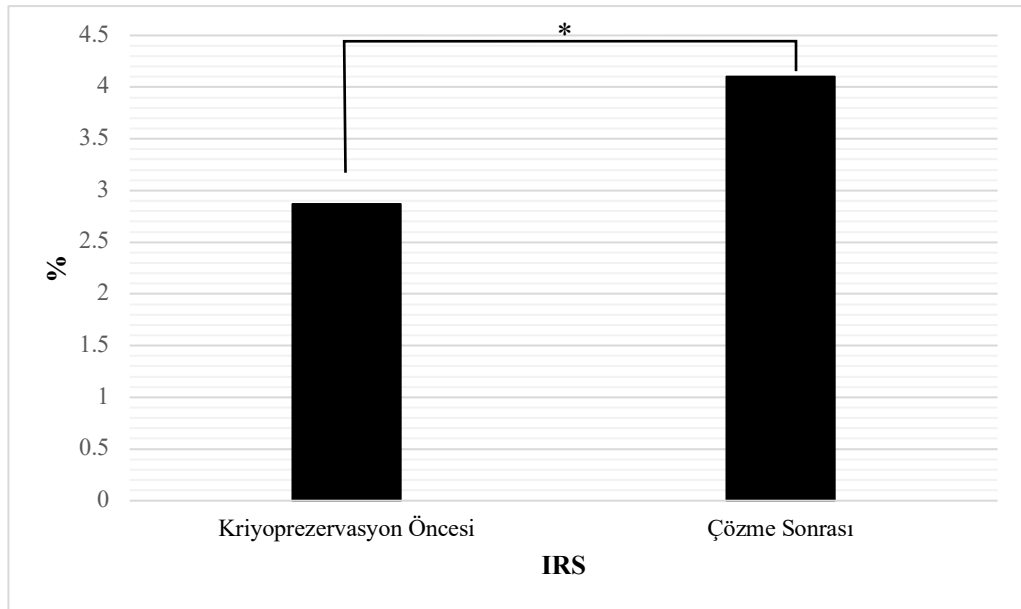
Resim 6.5 7 numaralı hastaya ait sperm hücrelerinin Toluidin Blue analizinin ışık mikroskopik görüntüsü (X100). a. Kriyoprezervasyon işlemi öncesi TB analizi b. Çözme işlemi sonrası TB analizi. TB (+) kırmızı ok ile, TB (-) siyah ok ile belirtilmiştir.

6.5. mTOR Proteini İmmünohistokimyasal Ekspresyonu

Tablo 6.5'te kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve çözme sonrası grupların sperm hücrelerinin mTOR immünohistokimyasal boyama sonrası hesaplanan IRS değerleri gösterilmektedir. Gruplar arasında kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası olmak üzere IRS değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p \leq 0,05$). Kriyoprezervasyon öncesi IRS değeri $2,87 \pm 3,39$ iken çözme sonrası IRS değeri $4,10 \pm 2,07$ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 6.5 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda immün reaktivite skoru (IRS) (Ort \pm SD)

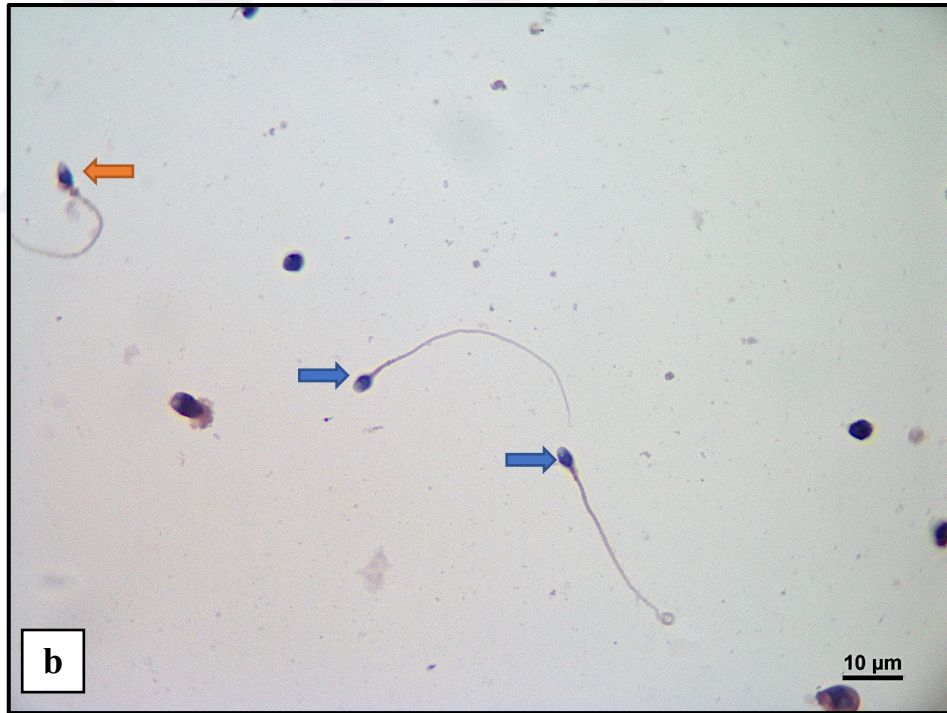
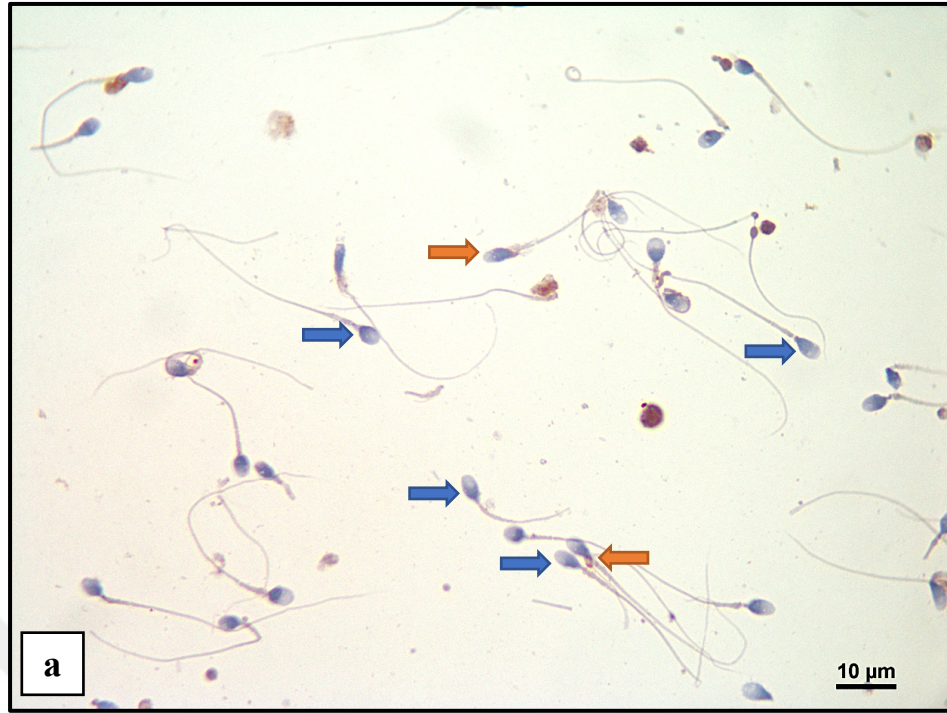
	IRS (Ort \pm SD)	Min-Max	<i>p</i> değeri
Kriyoprezervasyon Öncesi	$2,87 \pm 3,39$	0,41 - 16,86	0,001
Çözme Sonrası	$4,10 \pm 2,07$	0,77 - 11,09	



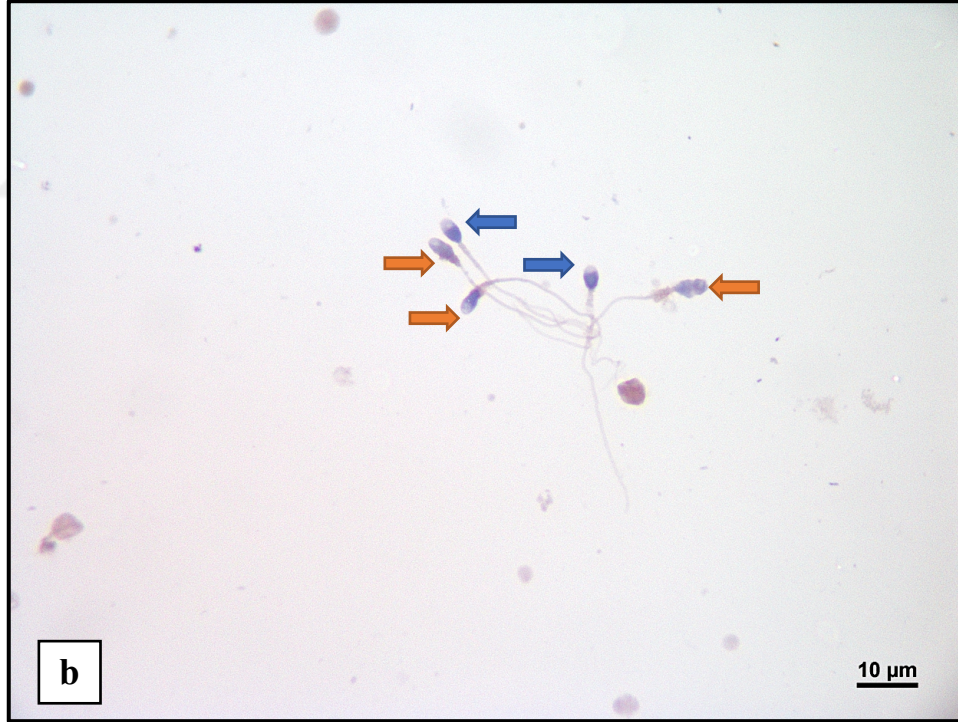
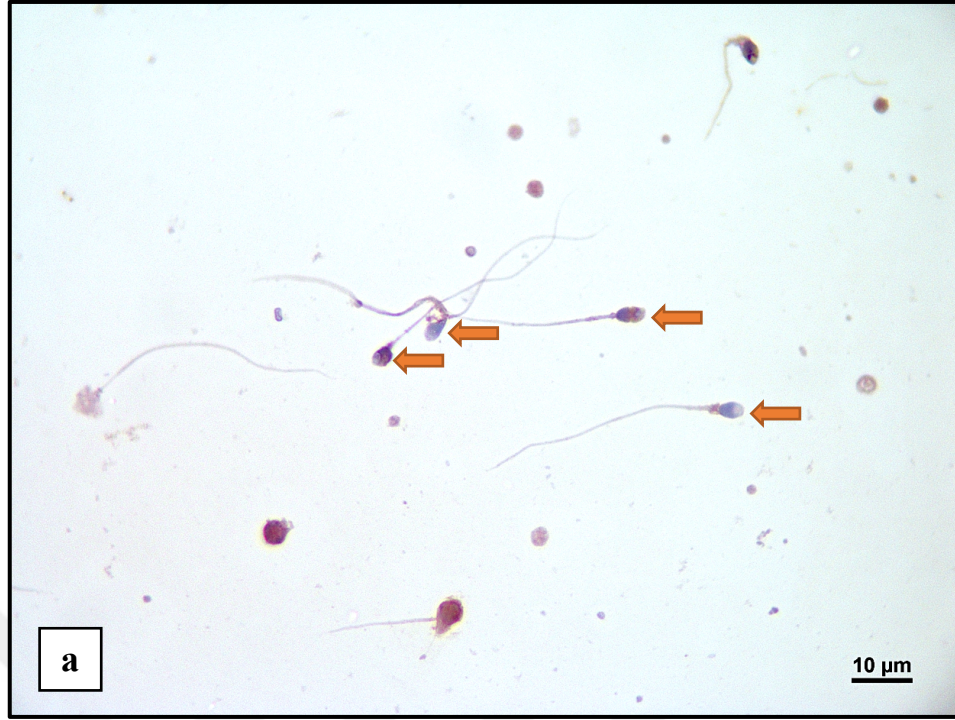
Şekil 6.3 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası gruplarda immün reaktivite skoru (IRS) (%)* İstatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$)

Kriyoprezervasyon öncesi gruba kıyasla çözme sonrası grupta baş ve kuyruk bölgelerindeki boyanma sperm plazma membranı, akrozom, boyun ve sitoplazmik droplet bölgelerine göre daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir.

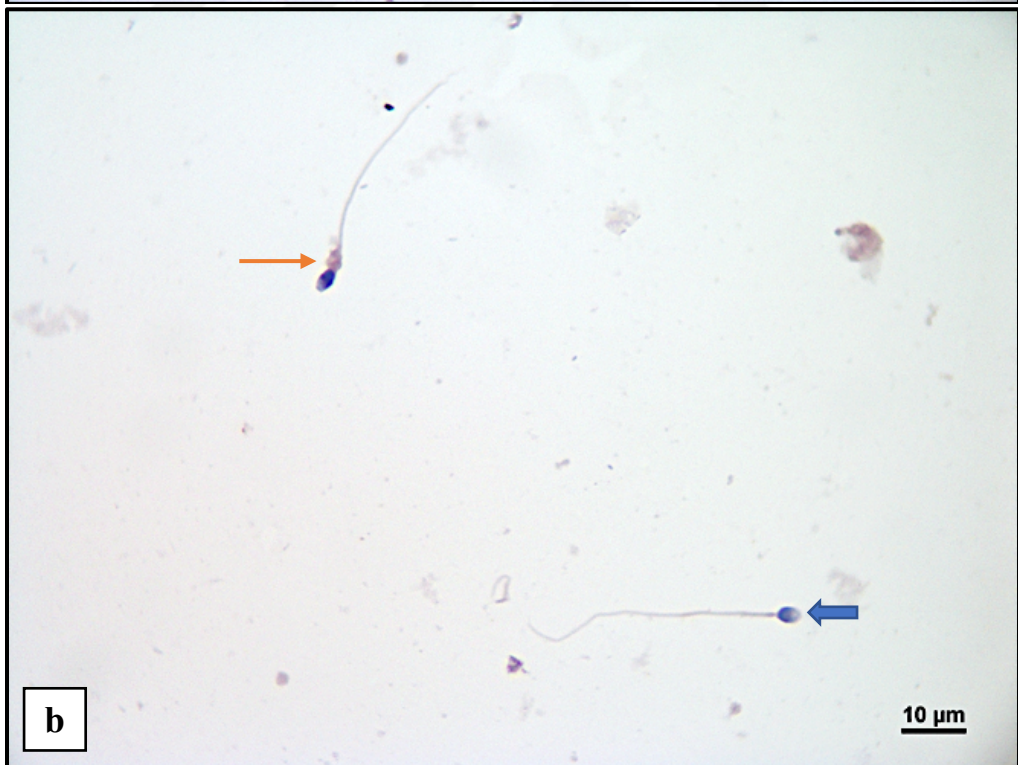
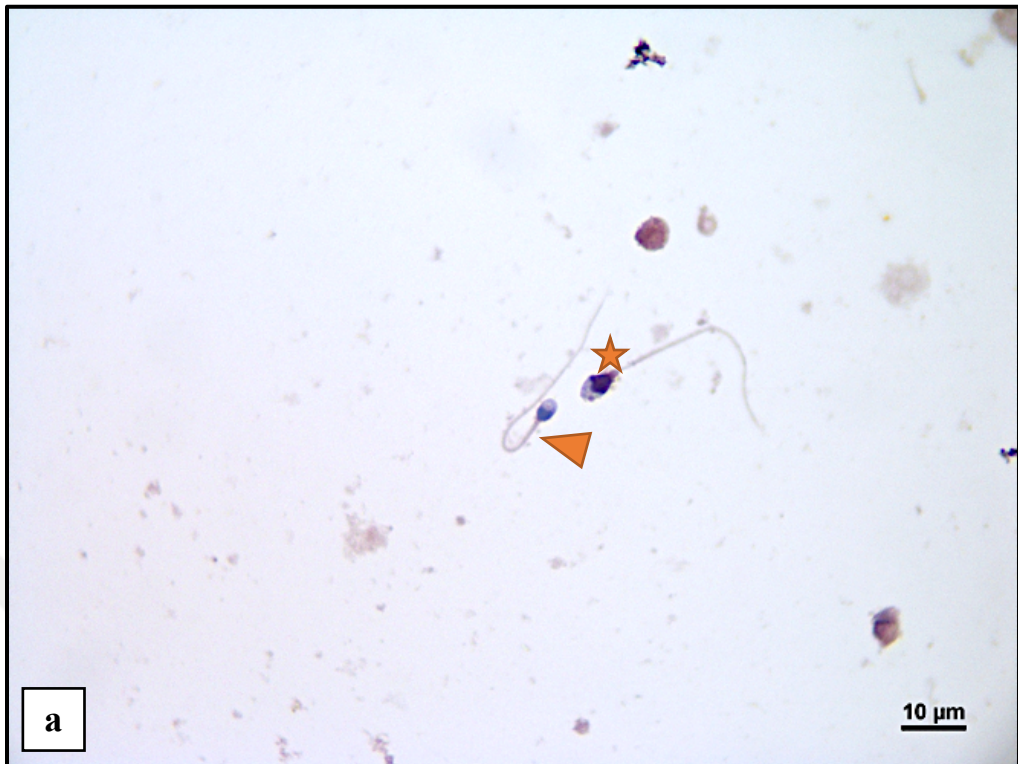


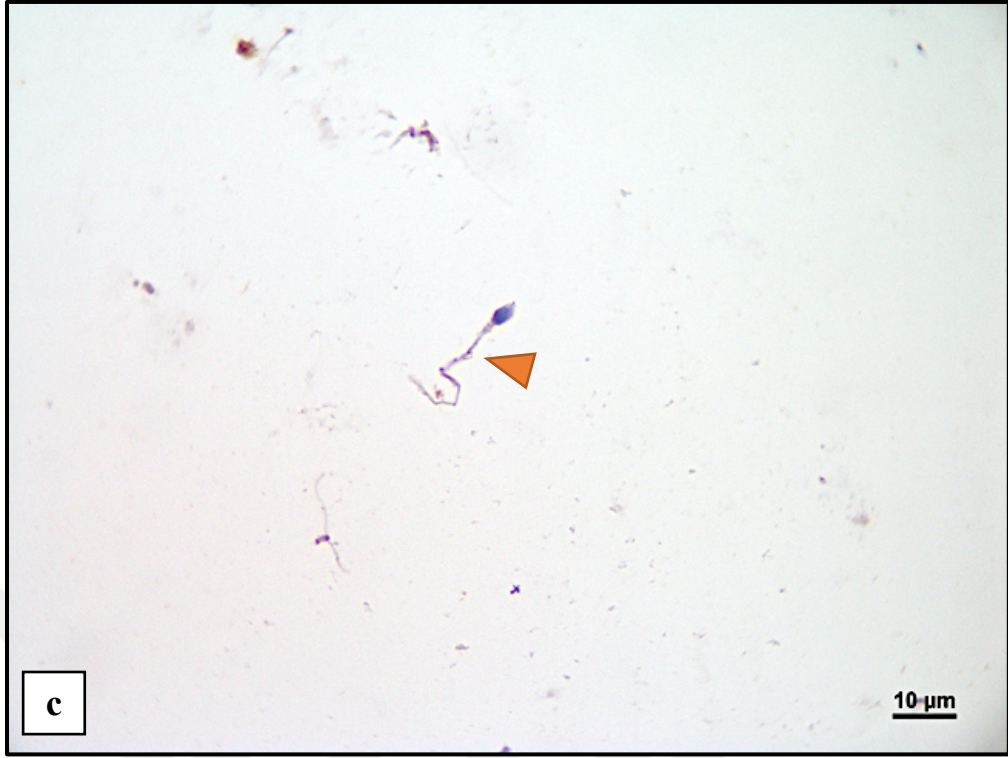


Resim 6.6 10 numaralı hastanın kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerindeki mTOR proteini ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü (X100). a. Kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerinin boyun ve sitoplazmik droplet bölgesinde mTOR proteini ekspresyonu b. Kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerinin baş bölgesinde mTOR proteini ekspresyonu görülmektedir. Turuncu ok, mTOR proteini eksprese eden sperm hücrelerini; mavi ok ise mTOR ekspresyonu gözlemlenmeyen hücreleri göstermektedir.

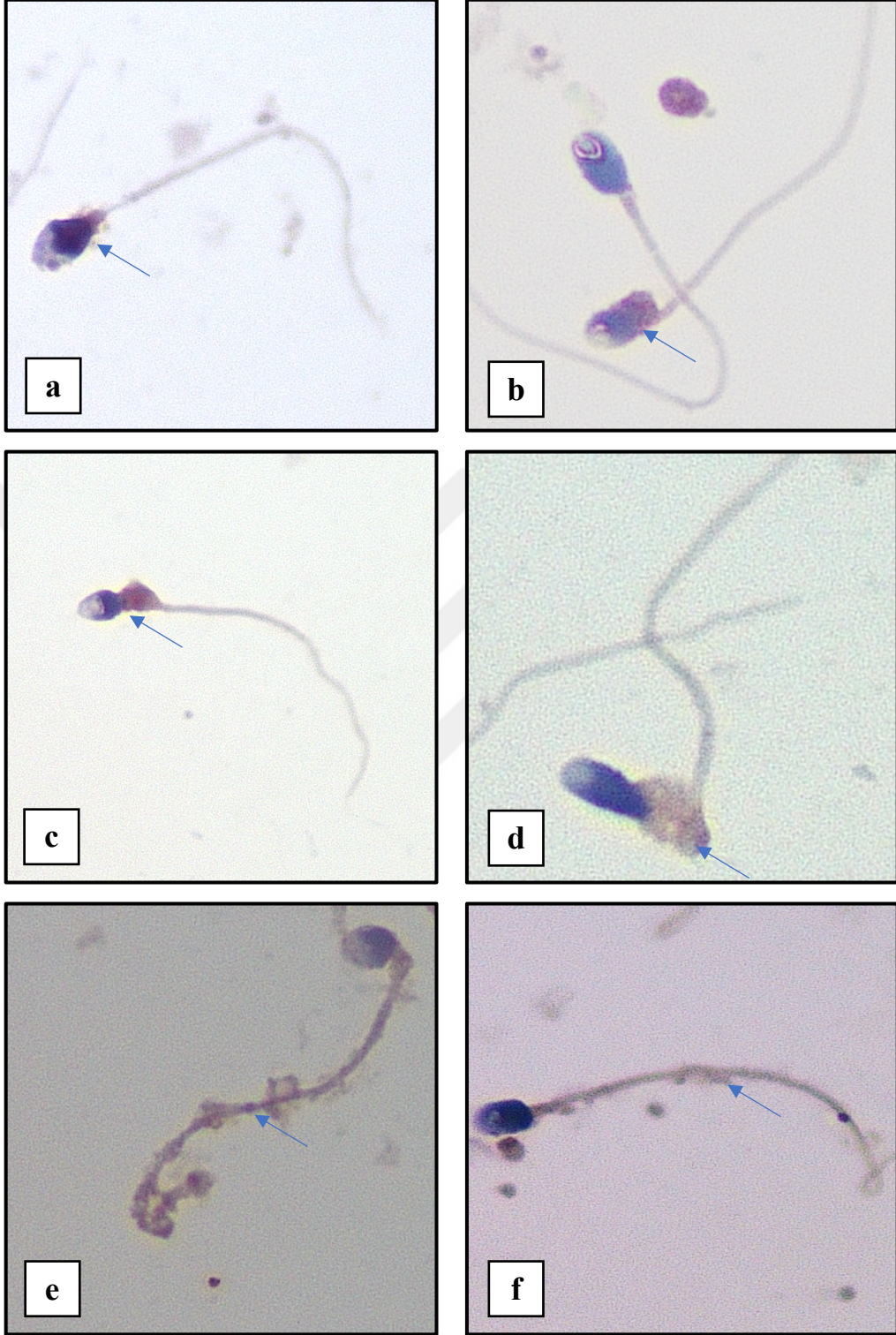


Resim 6.7 34 numaralı hastanın çözme işlemi sonrası sperm hücrelerindeki mTOR proteini ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüleri (X100). a. Kriyoprezervasyon işlemi sonrası sperm hücrelerinin baş ve boyun bölgesinde mTOR proteini ekspresyonu görülmektedir. b. Kriyoprezervasyon işlemi sonrası sperm hücrelerinin baş, boyun ve sitoplazmik droplet bölgesinde mTOR proteini ekspresyonu görülmektedir. Turuncu ok, mTOR proteini eksprese eden sperm hücrelerini; mavi ok ise mTOR ekspresyonu gözlemlenmeyen hücreleri göstermektedir.





Resim 6.8 3 numaralı hastanın kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerindeki mTOR proteini ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü (X100). a. Kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölgesinde mTOR proteini ekspresyonu görülmektedir. b. Kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerinin sitoplazmik droplet bölgesinde mTOR proteini ekspresyonu görülmektedir. c. Kriyoprezervasyon işlemi öncesi sperm hücrelerinin kuyruk bölgesinde mTOR proteini ekspresyonu görülmektedir. mTOR proteininin, spermin baş bölgesindeki ekspresyonu yıldız ile, sitoplazmik droplet bölgesindeki ekspresyonu turuncu ok ile, kuyruktaki ekspresyonu turuncu ok başı ile gösterilmekte, mTOR proteini ekspresyon etmeyen sperm hücreleri ile mavi ok ile gösterilmektedir.



Resim 6.9 Kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve sonrası sperm hücrelerindeki mTOR proteinini ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü (X100). mTOR proteininin spermin baş (a ve b), sitoplazmik droplet (b ve c) ve kuyruk (e ve f) bölgesindeki ekspresyonu (mavi ok) gösterilmektedir.

7. TARTIŞMA

Yapılan birçok çalışmada, sperm kriyoprezervasyon yönteminin sperm parametreleri (semen hacmi, sperm konsantrasyonu, morfoloji, motilite) üzerindeki etkileri araştırılmıştır (257, 258) ancak sperm kriyoprezervasyon işleminin moleküler etkileri (DNA fragmentasyonu, kromatin yapısı, mTOR proteini ekspresyon seviyeleri) tam olarak bilinmemektedir.

Kriyoprezervasyon işlemi, günümüzde sıkça kullanılan bir teknik olmasına rağmen yapılan çalışmalarda sperm hücrelerinin yapı ve fonksiyonuna zarar verdiği gösterilmiştir (259, 260). Bunun en temel nedeni kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası sperm hücresinin fiziksel olarak değişikliğe uğramasıdır. Bu değişiklikler sperm hücresini in vitro ve in vivo her türlü etkene karşı duyarlı hale getirir. Kriyoprezervasyonun hücre metabolizması, nükleus, organeller, hücre iskelet yapısı ve plazma membranı üzerindeki etkilerinin fertilitiyi de etkilediği iddia edilmektedir (261).

Bu çalışmada, semen parametreleri (konsantrasyon, hacim ve motilite), semende oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS, OSI), sperm hücrelerinde mTOR proteini ekspresyon seviyesi ve hücresel lokasyonu, DNA fragmentasyonu, kromatin bütünlüğü araştırılmış, kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası veriler karşılaştırılarak kriyoprezervasyonun belirtilen parametrelere olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın sonuçlarını etkileyebilecek parametrelerin etkisini en aza indirebilmek amacıyla 40 yaş üstü olan, ağır metaller veya kimyasallar gibi spermlere toksik olabilecek maddelere maruz kalınabilecek ya da radyasyonlu ortamlarda çalışan kişiler, sigara ve alkol kullananlar, testis ameliyatı geçirenler ve erkek genital sistem enfeksiyonu olan hastalar bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışma grupları, sperm kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Semen parametreleri DSÖ kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Sperm kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve sonrasında yapılacak analizler için yayma preparatlar hazırlanmıştır. OS parametrelerinin belirlenmesi amacıyla TAS ve TOS ölçülerek OSI belirlenmiştir. mTOR proteininin ekspresyon seviyesi immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Sperm DNA fragmentasyonu üzerine

etkisini araştırmak için DNA fragmantasyon analizi yapılmış ve floresan mikroskop ile değerlendirilmiştir. Kromatin yapısı ve DNA bütünlüğünün araştırılması için TB boyaması uygulanmış. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS programıyla yapılmış, bulgular ise tablo ve grafiklerle gösterilmiştir. Elde edilen tüm bulgular ile, kriyoprezervasyon işleminin sperm hücrelerindeki etkileri ve bu etkilerin sonuçları üzerine bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

7.1. Sperm Parametreleri

Kriyoprezervasyon ve çözme işlemlerinin hem sperm yapısına hem de işlevine zarar verdiği düşünöldüğünden, kriyoprezervasyonun sperm DNA içeriği, akrozomal bütünlük, motilite, canlılık gibi oosit fertilizasyonu için önemli olan özellikleri üzerinde de etkisi olduğu düşünölmektedir (262). Kriyoprezervasyonun sperm parametrelerini olumsuz etkilediği yönünde genel kanı bulunmasına rağmen bazı çalışmalar bunun aksini iddia etmiştir. Kriyoprezervasyonun progresif motilite, canlılık ve morfoloji dahil olmak üzere sperm parametrelerinde önemli düşüşlere neden olduğu farklı çalışmalarda bildirilmiştir (263-265). Nijs ve ark., kriyoprezervasyondan sonra hareketli sperm yüzdesinin %50,6'dan %30,3'e düştüğünü bildirmiştir (266). Kriyoprezervasyon sonucu sperm motilitesindeki bu düşüşün hangi mekanizma gerçekteştiği bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamıştır ancak yapılan bir çalışmada kriyoprezervasyon sonrasında çözölen semende hareketsiz sperm hücre yüzdesi ile mitokondriyal defektler arasında güçlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur (264). Ayrıca, kriyoprezervasyon işleminde ozmolarite ve hücre içi buz kristali oluşumundaki hızlı değişikliklerin membran proteinlerinde ve karbonhidrat bileşiminde değişikliklere yol açabileceği, bunun da membran yapılarını bozabileceği (267) ve sperm canlılığını azaltabileceği öne sürölmüştür. Di Santo ve ark., kriyoprezervasyon ve çözme sürecinin neden olduğu hasarın, donma sıcaklığı düşüş eğrisinin kontrol edilmesindeki zorluklar gibi metodolojik yetersizliklerle ilişkili olabileceğini belirtmiştir (66). Diğerleri, sperm parametrelerindeki bu düşüşün, kriyoprezervasyon ve çözme süreci sırasında hücre içi ve hücre dışı buz kristallerinin oluşumuna, hücre sel dehidrasyona ve ozmotik şoka neden olan termal şoktan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (268).

ROT üretimi ve spermdeki antioksidan enzim aktivitesinin düşmesi ile, sperm canlılığında azalmaya neden olan apoptotik yolların indüklediği öne sürülmüştür (66). Yapılan bir çalışmada kriyoprezervasyonun mitokondriyal membran özelliklerini kolayca değiştirdiği ve ROT üretimini artırdığı, bu da daha sonra DNA'nın oksidasyonu ile sonuçlanarak yüksek frekanslarda tek ve çift zincirli DNA kırılmalarına neden olduğu bildirilmiştir (234). Bu bulgular, kriyoprezervasyon işleminin DNA bütünlüğüne etkisi üzerinde daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Ayrıca, DNA onarım enzimlerinde meydana gelen kusurlar, kriyoprezervasyon sonrası DNA hasarının başka bir nedeni olarak bildirilmiştir (269). Yapılan çalışmalarda kriyoprezervasyondan etkilenen diğer bir parametrenin morfoloji olduğu belirtilmektedir (270). Sperm hücrelerine kontrolsüz sıvı akışının gerçekleşmesi hücrel osmolaliteyi değiştirebileceği ve membran yapısını deforme edebileceği, bunun sonucunda sperm morfolojisini değiştirebileceği bildirilmiştir (12, 264).

Bu çalışmada kriyoprezervasyon işleminin öncesi ve çözme sonrasında sperm parametrelerinde (konsantrasyon, motilite ve morfoloji) istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmemesine rağmen semen konsantrasyonunda %10, sperm motilitesinde %26, normal morfoloji oranında ise %50 oranında azalma gözlenmesi bize daha ileri ve yüksek sayıda hasta içeren çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir.

7.2. Oksidatif Stres Parametreleri

Sperm kriyoprezervasyon işleminin seminal sıvıdaki total antioksidan seviyesini azalttığı bildirilmektedir (271, 272). Bununla birlikte kriyoprezervasyon işleminin insan semen örneklerinde ROT oluşumuna neden olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir (33, 272-274). Bunun nedeni olarak, sperm kriyoprezervasyon işleminin plazma zarındaki NADPH oksidazda değişikliklere sebep olduğu ve mitokondrinin ETZ'de ROT oluşumunu artıran değişikliklere yol açtığı ileri sürülmüştür (275, 276). Bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak kriyoprezervasyon işlemi uygulanan semende ROT üretiminin, total seminal antioksidan seviyesindeki düşüşün arkasında yatan sebeplerden biri olabileceği iddia edilmiştir. Ayrıca ROT birikiminin OS'ye, oksidan ve antioksidan maddeler arasında bir dengesizliğe, lipid peroksidasyonuna ve

dolayısıyla spermin çözme sonrası geri kazanımında azalmaya yol açtığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (277, 278). Kriyoprezervasyon işlemi sırasında, seminal plazmanın çıkarılması ve dilüsyonu nedeniyle sperm antioksidan deposunda (askorbat, ürat, alfa tokoferol, hipotaurin, taurin, karotenoidler ve glutatyon) önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir. Spermi çevreleyen antioksidan savunma mekanizmasındaki bu bozulmanın, sperm membranında meydana gelen oksidatif hasarın nedenlerinden biri olabileceği iddia edilmektedir (271).

Bu çalışmada seminal plazma TOS ve TAS belirlenmiş bunların birbirine oranı alınarak oksidatif dengeyi ortaya koyan OSI değeri hesaplanmıştır. OSI değerleri kriyoprezervasyon öncesi ortalama 2,01 bulunurken, kriyoprezervasyon sonrası ise 15,19 olarak bulunmuştur. Sperm kriyoprezervasyonunun OSI üzerine etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır (276, 279, 280). Yapılan bu çalışmaların bulgularına göre, kriyoprezervasyon işlemi uygulanan semen numunelerinde TAS azalırken, seminal OS seviyesinin arttığı ileri sürülmüştür. Spermin organellerinde meydana gelen yapısal ve biyokimyasal hasarın da kriyoprezervasyon sırasında ROT üretimi kaynaklı olduğu bildirilmiştir (281). Bizim çalışmamızın sonuçları, sperm kriyoprezervasyon işlemi sonrası seminal plazmada OSI'nin arttığını göstermektedir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir. Bu artış tahmin edilebilir çünkü kriyoprezervasyon işleminin plazma membranındaki NADPH oksidazı değiştirdiği ve mitokondrinin ETZ'deki değişiklikleri indükleyerek ROT oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir (280, 282). Çalışmamızın bulgularına göre artan TOS ve OSI değerlerinin ROT oluşumunu indüklediğini düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalarda ROT'un sperm ve semende total antioksidan kapasiteyi azaltan ana unsur olduğu iddia edilmektedir (283, 284).

Çalışmamızın sonuçlarına göre OSI parametrelerinde istatistiksel anlam bulunmamıştır ancak yaklaşık 7 kat fark bize daha ileri çalışmaların yapılması gerektiğini düşündürmektedir. Aynı zamanda OSI'de belirlenen fark TAS'ın azalmasıyla açıklanabileceğini düşündürmektedir. Bu konuyla ilgili kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Seminal plazmada antioksidan seviyesini artıracak eklentilerin dondurma medyumlarına eklenmesi ya da hastaların antioksidan takviyesi kullanımını ile de seminal plazma TAS seviyesi artırılarak OSI'nin azaltılması düşünülebilir.

7.3. Sperm Kromatin Yapısı ve DNA Fragmantasyonu

Sperm hücrelerinin dondurulması esnasında DNA bütünlüğünün korunması önemli bir unsurdur çünkü kriyoprezervasyonun mitokondriyal membran özelliklerini kolayca değiştirdiği ve ROT üretimini artırdığı, bu durumun DNA'nın oksidasyonu ile sonuçlanarak yüksek frekanslarda tek ve çift zincirli DNA kırıkları ürettiği bildirilmiştir (285). Ayrıca, DNA onarım enzimlerindeki defektler, kriyoprezervasyon sonrası DNA hasarının başka bir nedeni olarak bildirilmiştir (119). Kriyoprezervasyon işlemi sonrası sperm motilite, morfoloji ve canlılığının azalması geniş çapta çalışılmış olmasına rağmen, sperm kromatin bütünlüğünün çeşitli kriyoprezervasyon yöntemlerinden nasıl etkilendiğine dair tartışmalar devam etmektedir (286).

Son zamanlarda yapılan kapsamlı araştırmalar, insan sperm kromatin bütünlüğünü, sperm DNA hasarının mekanizmalarını ve bunun YÜT sonuçları üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Normal DNA yapısına sahip spermin, embriyo gelişimi ve gebelik için büyük önem taşıdığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Aynı zamanda sperm kromatin bütünlüğünün hem fertilizasyonu hem de genetik bilginin aktarımını etkilediği; DNA fragmantasyonuna sahip spermin, fertilite sorunlarına ve gebelik kayıplarına sebep olduğu belirtilmiştir (287). DNA fragmantasyonuna sahip sperm ile fertilize olan embriyoların genellikle gelişim sırasında duraklama gösterdiği ve YÜT sikluslarının sonucunu olumsuz etkileyebileceği öne sürülmüştür (271).

Hammadeh ve ark. yaptıkları bir çalışmada, kriyoprezervasyonun hem fertil hem de infertil erkeklerin sperm kromatini, morfolojisi ve membran bütünlüğünde önemli hasara neden olduğunu göstermiştir (271). Spano ve ark. ise SCSA ile semendeki insan sperminin kromatin yapısını analiz etmiş ve kriyoprezervasyon sonrası genel kromatin yapısının bozulduğunu göstermiştir (288). Yapılan son çalışmalar kriyoprezervasyon işlemine bağlı olarak kromatin kondenzasyonunda problemler meydana gelebileceğini ileri sürmüştür (289, 290). Evenson ve ark. yaptığı çalışmada ise kriyoprezervasyonun sperm kromatin yapısını etkilemediği gösterilmiştir (291). Bizim çalışmamızda ise Hammadeh ve ark. ve Spano ve ark.'nın çalışmalarını destekler nitelikte olup sperm kriyoprezervasyonun işleminin sperm kromatin bütünlüğünü olumsuz etkilediğini göstermektedir. Bu konudaki çalışmaların

sonuçları arasındaki tutarsızlık, hem çalışma grubunun hem de çalışma yöntemlerinin farklılığından kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Yapılacak daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

DFI, semen kalitesini değerlendirmede çok önemli bir gösterge olarak kabul edilmekte ve spermin genetik materyali olan DNA'nın bütünlüğünü ve hasarını yansıttığı düşünülmektedir (292). DFI, fertilizasyon kapasitesini ölçmede sıklıkla kullanılmakta olup erkek üreme potansiyeli hakkında diğer parametrelerden daha fazla bilgi verdiği bildirilmiştir (293). Son yıllarda, sperm DNA hasarının nedenlerini belirlemeye yönelik yapılan araştırmalar giderek artmaktadır. Özellikle kriyoprezervasyon işlemi ile tetiklenen DNA hasarının tespit edilmesinde kullanılan güncel yöntemler ve sperm DNA hasarının klinik sonuçları büyük önem kazanmıştır. Kriyoprezervasyon prosedürü, önce numuneyi sıvı nitrojen buharında bekletme ve ardından -196°C sıcaklıkta sıvının içine daldırma aşamalarından oluşmaktadır (294). Literatürde kriyoprezervasyon prosedürlerinden sonra herhangi bir sperm DNA fragmentasyonuna neden olup olmadığı konusunda fikir birliği yoktur. Çalışmaların çoğu kriyoprezervasyonun DNA hasarına neden olduğunu öne sürerken (288, 295-297) araştırmacıların bir kısmı ise bu sonuçların eşlik eden farklı faktörlere bağlı olabileceğini iddia etmektedir (298, 299). Diğer çalışmalar kriyoprezervasyonun DNA bütünlüğünü etkilemediğini bildirmektedir (300, 301).

Çözme işleminden sonra ozmotik stres ve oksidatif dengenin bozulması, kriyoprezervasyon sırasında OS'ye neden olduğu bildirilmektedir (302). Zribi ve ark. (303) kriyoprezervasyonun hem DNA oksidatif hasarında hem de DNA fragmentasyonunda önemli bir artıştan sorumlu olduğunu bildirmiştir. Kaspaz aktivasyonu ve apoptozdan ziyade OS'nin artışı bu etkilerin primer nedeni olabileceğini düşündürmektedir (304). Kriyoprezervasyon sırasında sperm hücrendeki DNA değişikliklerinin OS ve apoptozu indükleyen faktörlerin neden olabileceği ve bunun nükleoprotein yapısının, disülfid bağlarının ve DNA-protamin kompleksinin bozulmasına yol açabileceği varsayılmıştır (305, 306). Ayrıca anormal morfolojiye sahip spermlerin, normal morfolojiye sahip olanlara kıyasla kriyoprezervasyon sırasında DNA hasarına daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (66). Bunun aksine, Lusignan ve ark. kriyoprezervasyonun sperm kromatin bütünlüğüne zarar vermediğini bildirmiştir (307). Literatürdeki bu ihtilaf, çalışılan hasta gruplarının

farklılığı, örneklem büyüklüğü, kriyoprezervasyon ve çözme teknikleri, TUNEL, SCSA, SCD, Comet nötr veya Comet alkalin gibi DNA hasarının değerlendirilmesi için kullanılan yöntemlerin farklılığından ya da kromatin yapının değerlendirilmesi için kullanılan tekniklerin çeşitliliğinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir (36, 38, 308).

Çalışmamızda, sperm kriyoprezervasyon işlemi öncesi ile çözme sonrası sperm DNA fragmentasyonu analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular karşılaştırıldığında kriyoprezervasyon sonrası sperm hücrelerinde DFI'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç, kriyoprezervasyon prosedürünün DNA bütünlüğüne zarar verebileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamıza benzer olarak Spano ve ark. (37) yaptıkları çalışmada, sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmiş ve çözme işlemi sonrasında DNA bütünlüğünün anlamlı derecede düştüğünü gözlemlemişlerdir. Yine çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde, başka bir çalışmada sperm hücrelerinde kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası TUNEL analizi ile DFI karşılaştırılmış ve kriyoprezervasyonun DNA bütünlüğünü olumsuz etkilediğini bildirmiştir (38). Carrel ve ark. (2003), sıvı nitrojen içinde kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası sekiz fertil hastadan alınan TUNEL reaktif spermleri analiz ettiklerinde, TUNEL pozitif hücre yüzdesi her hastada kriyoprezervasyon öncesine kıyasla önemli ölçüde arttığını bulmuştur (309). Buna benzer olarak Zribi ve ark. (2010), kriyoprezervasyondan sonra DNA hasarında bir artış gözlemlemiştir (303). Bu durum, dondurma yöntemlerinden bağımsız olarak, kriyoprezervasyon işleminin DNA kalitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak, yapılan bir başka çalışmada, Isachenko ve ark. (310) çözme sonrasında DNA fragmentasyonunun artmadığı sonucuna varmıştır. Duru ve ark. ise bizim çalışmamızdan farklı olarak, kriyoprezervasyonun mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ve kaspaz 3, 8 ve 9'un aktivasyonu ile ilişkili olduğunu, ancak DNA fragmentasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını belirtmiştir (311). Sonuçlarımızın uyuşmamasının nedeni çalışılan hasta gruplarının farklılığı ve DNA fragmentasyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklı olabilir. Çalışmamızda sperm kriyoprezervasyonunun DNA fragmentasyonunu artırdığını gözlemledik. Bunu engelleyecek stratejilerin ortaya konulması, bu hasarları en aza indirmek için araştırmacılara yardımcı olacaktır.

7.4. mTOR Protein Ekspresyonu

Kriyoprezervasyonun semen hacmi, sperm konsantrasyonu, morfoloji, motilite ve DNA fragmantasyonu gibi semen parametreleri üzerindeki etkiyi araştıran çalışmalar bulunmaktadır, ancak kriyoprezervasyon işleminin insan sperm sinyal yolaşları üzerindeki etkisi bilinmemektedir. mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki farklı tür olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (25). Kadın folikül hücrelerinde kriyoprezervasyonun mTOR sinyal yolaşına etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen (312) sperm kriyoprezervasyonunun olgun sperm hücresinde mTOR sinyal yolaşına etkisi hala bilinmemektedir ve bu çalışma, mTOR sinyalinin sperm hücrelerinde kriyoprezervasyon sonucu ile ilişkilendirilen ilk çalışmadır.

Otofaji, otofagozom oluşumuyla hücresel metabolitlerin ve organellerin güncellenmesini sağlayan evrimsel olarak korunan bir süreçtir ve mTOR, otofaji sinyal yolaşının kilit düzenleyicisi olarak bildirilmiştir. Rapamisinin, mTOR'u inhibe ederek hücrelerin otofajisini aktive edebileceği öne sürülmüştür. Liu ve ark. yaptığı çalışmada rapamisinin spermatogonyum proliferasyonunu inhibe ettiğini ve mTOR sinyal yolaşını baskılayarak ve otofaji aktivasyonunu değiştirerek seminifer tübülün yapısına zarar verdiğini ve böylece sperm sayısında azalmaya neden olduğunu göstermiştir (313). alışmalar, mTOR sinyal yolunun kanser, artrit, insülin direnci, osteoporoz ve diğer hastalıklarla da ilişkili olduğunu göstermiştir. Karaciğer kanserinde PI3K/PTEN/Akt/mTOR yolaşının aktive olduğu, matris metalopeptidaz 9'u (MMP-9) up-regüle ederek tümör invazyonu ve metastazında rol oynadığı da çalışmalarda belirtilmiştir (314). Benzer şekilde, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolaşının kolon kanseri kök hücrelerinin (CCSC) proliferasyonunu ve hayatta kalımı kontrol ettiği gösterilmiştir (315).

Bu çalışmada, kriyoprezervasyon sonrasında sperm hücrelerinde mTOR ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Yapılan alışmalar mTOR ekspresyonunun artmasının otofajinin aktivasyonun azalmasına neden olduğu, bu durumun ise, yüksek seviyelerde ROT üreten oksitlenmiş proteinler veya hasarlı mitokondrilerin birikmesine neden olduğunu göstermektedir (316). Bizim de çalışmamızın bulguları bu çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir. mTOR

sinyal yolağı üzerindeki diğer proteinlerle birlikte analiz edilmesine ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sperm hücresinde mTOR sinyal yolağının rolü hala tam olarak bilinmemektedir ve bu çalışma, sperm hücrelerinde kriyoprezervasyon işleminin mTOR sinyalleşmesinin ilişkilendirildiği ilk çalışmadır. Bizim alışmamızda PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı üzerinde yer alan mTOR proteininin kriyoprezervasyon işleminin uygulanmasıyla sperm hücrelerinde arttığı ve bu sinyal yolağının aktive olduğunu düşünmekteyiz. Sperm kriyoprezervasyonunun hem sperm parametrelerine hem de moleküler etkilerini incelediğimiz bu çalışmanın sonuçları bu sinyal yolağındaki diğer proteinlerin ekspresyonları incelenerek daha ileri çalışmalarla desteklenmelidir ve daha büyük hasta gruplarıyla yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. SONUÇ

Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde kriyoprezervasyon sonucunda sperm parametrelerinde anlamlı bir azalış gözlemlenmedi ancak gruplar arası farkın yüksek olmasından dolayı daha ileri çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz. Sperm kriyoprezervasyonu sonrası DNA fragmantasyonunda anlamlı bir artış, kromatin bütünlüğünde anlamlı bir bozulma gözlemlenmiştir. DNA fragmantasyonundaki artış bize kriyoprezervasyonun spermin DNA'sını etkilediğini göstermiştir. Kriyoprezervasyon sonrası kromatin bütünlüğünde tespit edilen bozulma da yine DNA fragmantasyonundaki artışı destekler niteliktedir. Bu bulgular kriyoprezervasyonun genetik yapıya olan olumsuz etkilerini göstermektedir. Ayrıca kriyoprezervasyon sonrası mTOR proteini ekspresyonundaki anlamlı artış bize sperm kriyoprezervasyonunda mTOR sinyal yolağının aktive olduğunu düşündürmektedir. OSI parametresine bakıldığında ise herhangi bir anlamlı farklılık belirlenmemiştir. Ancak bu parametrede de kriyoprezervasyon sonrası seminal sıvı OSI değerinin yaklaşık 7 kat artışı bize daha ileri çalışmaların yapılması gerektiğini düşündürmüştür.

9. KAYNAKLAR

1. Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
2. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.* 9(12);e1001356, 2012.
3. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction.* 22(6);1506-12, 2007.
4. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho C-L, Henkel R, Vij S, et al. Male infertility. *The Lancet.* 397(10271);319-33, 2021.
5. Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res.* 8, 2019.
6. Gassei K, Orwig KE. Experimental methods to preserve male fertility and treat male factor infertility. *Fertil Steril.* 105(2);256-66, 2016.
7. Delessard M, Saulnier J, Rives A, Dumont L, Rondanino C, Rives N. Exposure to Chemotherapy During Childhood or Adulthood and Consequences on Spermatogenesis and Male Fertility. *Int J Mol Sci.* 21(4), 2020.
8. Huleihel M, Lunenfeld E. Approaches and Technologies in Male Fertility Preservation. *Int J Mol Sci.* 21(15), 2020.
9. Dohle GR. Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *Int J Urol.* 17(4);327-31, 2010.
10. Tao Y, Sanger E, Saewu A, Leveille MC. Human sperm vitrification: the state of the art. *Reprod Biol Endocrinol.* 18(1);17, 2020.
11. AbdelHafez F, Bedaiwy M, El-Nashar SA, Sabanegh E, Desai N. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 15(2);153-64, 2009.
12. O'Connell M, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* 17(3);704-9, 2002.
13. Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl.* 18(4);461-8, 1997.

14. Loutradi KE, Tarlatzis BC, Goulis DG, Zepiridis L, Pagou T, Chatziioannou E, et al. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 23(2);69-74, 2006.
15. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online.* 37(3);327-39, 2018.
16. Riesco M, Robles V. Quantification of DNA damage by q-PCR in cryopreserved zebrafish P rimordial G erm C ells. *Journal of Applied Ichthyology.* 28(6);925-9, 2012.
17. Valcarce DG, Cartón-García F, Riesco MF, Herráez MP, Robles V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology.* 1(5);723-30, 2013.
18. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online.* 14(6);727-33, 2007.
19. Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 16(1);3-13, 2010.
20. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod.* 24(9);2061-70, 2009.
21. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl.* 24(4);621-8, 2003.
22. Box HC, Dawidzik JB, Budzinski EE. Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radic Biol Med.* 31(7);856-68, 2001.
23. Nazari H, Ahmadi E, Hosseini Fahraji H, Afzali A, Davoodian N. Cryopreservation and its effects on motility and gene expression patterns and fertilizing potential of bovine epididymal sperm. *Vet Med Sci.* 7(1);127-35, 2020.
24. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 149(2);274-93, 2012.
25. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 168(6);960-76, 2017.

26. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 110(2);163-75, 2002.
27. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 110(2);177-89, 2002.
28. Deng CY, Lv M, Luo BH, Zhao SZ, Mo ZC, Xie YJ. The Role of the PI3K/AKT/mTOR Signalling Pathway in Male Reproduction. *Curr Mol Med*. 21(7);539-48, 2021.
29. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res*. 18(21);5856-64, 2012.
30. Oliveira PF, Cheng CY, Alves MG. Emerging Role for Mammalian Target of Rapamycin in Male Fertility. *Trends Endocrinol Metab*. 28(3);165-7, 2017.
31. Moreira BP, Oliveira PF, Alves MG. Molecular Mechanisms Controlled by mTOR in Male Reproductive System. *Int J Mol Sci*. 20(7), 2019.
32. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;8416763, 2017.
33. Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, et al. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil*. 26(4);145-8, 1995.
34. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol*. 9(5);324-37, 2009.
35. Hamilton T, Assumpção M. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote*. 28(1);1-8, 2020.
36. Raad G, Lteif L, Lahoud R, Azoury J, Azoury J, Tanios J, et al. Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. *Andrology*. 6(6);836-45, 2018.
37. Spanò M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Reprod*. 5(1);29-37, 1999.

38. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril.* 86(3);597-600, 2006.
39. Kalthur G, Adiga SK, Upadhya D, Rao S, Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril.* 89(6);1723-7, 2008.
40. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril.* 76(5);892-900, 2001.
41. Rahiminia T, Hosseini A, Anvari M, Ghasemi-Esmailabad S, Talebi AR. Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 56(4);472-6, 2017.
42. World Health O. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
43. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril.* 108(3);393-406, 2017.
44. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 62;2-10, 2018.
45. Sun H, Gong TT, Jiang YT, Zhang S, Zhao YH, Wu QJ. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY).* 11(23);10952-91, 2019.
46. Bak CW, Seok HH, Song SH, Kim ES, Her YS, Yoon TK. Hormonal imbalances and psychological scars left behind in infertile men. *J Androl.* 33(2);181-9, 2012.
47. Wu AK, Elliott P, Katz PP, Smith JF. Time costs of fertility care: the hidden hardship of building a family. *Fertil Steril.* 99(7);2025-30, 2013.
48. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 25(2);271-85, 2011.
49. Salonia A, Rastrelli G, Hackett G, Seminara SB, Huhtaniemi IT, Rey RA, et al. Paediatric and adult-onset male hypogonadism. *Nat Rev Dis Primers.* 5(1);38, 2019.
50. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 14(8);470-85, 2017.

51. Chehab M, Madala A, Trussell JC. On-label and off-label drugs used in the treatment of male infertility. *Fertil Steril.* 103(3);595-604, 2015.
52. Ma Y, He X, Qi K, Wang T, Qi Y, Cui L, et al. Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. *J Environ Sci (China).* 77;210-7, 2019.
53. Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology.* 80(4);822-5, 2012.
54. Ricci E, Al Beitawi S, Cipriani S, Candiani M, Chiaffarino F, Viganò P, et al. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 34(1);38-47, 2017.
55. Gundersen TD, Jørgensen N, Andersson AM, Bang AK, Nordkap L, Skakkebaek NE, et al. Association Between Use of Marijuana and Male Reproductive Hormones and Semen Quality: A Study Among 1,215 Healthy Young Men. *Am J Epidemiol.* 182(6);473-81, 2015.
56. Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, Buck Louis GM. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Hum Reprod.* 29(2);193-200, 2014.
57. Nargund VH. Effects of psychological stress on male fertility. *Nat Rev Urol.* 12(7);373-82, 2015.
58. Salonia A, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, et al. European Association of Urology Guidelines on Sexual and Reproductive Health-2021 Update: Male Sexual Dysfunction. *Eur Urol.* 80(3);333-57, 2021.
59. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril.* 103(3);e18-25, 2015.
60. Agarwal A, Majzoub A, Parekh N, Henkel R. A Schematic Overview of the Current Status of Male Infertility Practice. *World J Mens Health.* 38(3);308-22, 2020.
61. Engel KM, Grunewald S, Schiller J, Paasch U. Automated semen analysis by SQA Vision® versus the manual approach—A prospective double-blind study. *Andrologia.* 51(1);e13149, 2019.
62. Dearing C, Jayasena C, Lindsay K. Can the Sperm Class Analyser (SCA) CASA-Mot system for human sperm motility analysis reduce imprecision and operator subjectivity and improve semen analysis? *Human Fertility.* 2019.

63. Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl.* 17(4);545-53, 2015.
64. Agarwal A, Ong C, Durairajanayagam D. Contemporary and future insights into fertility preservation in male cancer patients. *Translational andrology and urology.* 3(1);27, 2014.
65. Rousset-Jablonski C, Chevillon F, Dhedin N, Poirot C. Préservation de la fertilité chez les adolescents et jeunes adultes traités pour cancer. *Bulletin du Cancer.* 103(12);1019-34, 2016.
66. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol.* 2012;854837, 2012.
67. Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology.* 76(8);1450-64, 2011.
68. Masoudi R, Sharafi M, Zareh Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Esmaeili V, et al. Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology.* 73(1);69-72, 2016.
69. Luyet BJ, Hodapp EL. Revival of Frog's Spermatozoa Vitrified in Liquid Air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 39(3);433-4, 1938.
70. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature.* 164(4172);666-, 1949.
71. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature.* 172(4382);767-8, 1953.
72. Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK. CONCEPTION WITH HUMAN SPERMATOZOA FROZEN BY NITROGEN VAPOR TECHNIC. *Fertil Steril.* 15;501-4, 1964.
73. Szell AZ, Bierbaum RC, Hazelrigg WB, Chetkowski RJ. Live births from frozen human semen stored for 40 years. *J Assist Reprod Genet.* 30(6);743-4, 2013.
74. Schulz M, Risopatrón J, Uribe P, Isachenko E, Isachenko V, Sánchez R. Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology.* 8(6);1642-50, 2020.

- 75.Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 61(1);1-12, 2015.
- 76.Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina AM, Sanchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reprod Fertil Dev*. 24(2);323-6, 2012.
- 77.Sanchez R, Isachenko V, Petrunkina AM, Risopatron J, Schulz M, Isachenko E. Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. *J Androl*. 33(4);559-62, 2012.
- 78.Kuznyetsov V, Moskovtsev SI, Crowe M, Lulat AG, Librach CL. Vitrification of a small number of spermatozoa in normozoospermic and severely oligozoospermic samples. *Syst Biol Reprod Med*. 61(1);13-7, 2015.
- 79.Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, Nguyen VT, Nguyen TTA, Nguyen VQH, et al. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 234;14-20, 2019.
- 80.Pabón D, Meseguer M, Sevillano G, Cobo A, Romero JL, Remohí J, et al. A new system of sperm cryopreservation: evaluation of survival, motility, DNA oxidation, and mitochondrial activity. *Andrology*. 7(3);293-301, 2019.
- 81.Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, et al. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Letters*. 23(2);93-102, 2002.
- 82.Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 93(6);1921-8, 2010.
- 83.Zhu J, Jin RT, Wu LM, Johansson L, Guo TH, Liu YS, et al. Cryoprotectant-free ultra-rapid freezing of human spermatozoa in cryogenic vials. *Andrologia*. 46(6);642-9, 2014.
- 84.Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology*. 2012;854837, 2012.

85. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol.* 2012;854837-, 2012.
86. Gao D, Mazur P, Critser J, Karow A, Critser J. *Reproductive Tissue Banking.* 1997.
87. Bollwein H, Fuchs I, Koess C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 43(2);189-95, 2008.
88. Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, Sarasa J, Romero A, Fernández MA, et al. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Hum Reprod.* 32(10);2007-15, 2017.
89. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spanò M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tissue Bank.* 7(2);91-8, 2006.
90. Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum Reprod Update.* 2(6);553-9, 1996.
91. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum Reprod.* 12(1);112-8, 1997.
92. Emamverdi M, Zhandi M, Shahneh AZ, Sharafi M, Akhlaghi A, Motlagh MK, et al. Flow cytometric and microscopic evaluation of post-thawed ram semen cryopreserved in chemically defined home-made or commercial extenders. *Animal Production Science.* 55(4);551-8, 2014.
93. Chaudhari D, Dhami A, Hadiya K, Patel J. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196 C) of buffalo semen. *Veterinary world.* 8(2);239, 2015.
94. Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Yekta AA, Esmaili V, Sharbatoghli M, et al. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology.* 83(1);78-85, 2015.
95. Fabbri R, Ciotti P, Di Tommaso B, Magrini O, Notarangelo L, Porcu E, et al. Tecniche di crioconservazione riproduttiva. *Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia.* 3;33-41, 2004.

- 96.Sherman J. Cryopreservation of human semen: CRC Press, Boca Raton, Fla, USA; 1990.
- 97.Agarwal A, Durairajanayagam D, Du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12(1);1-19, 2014.
- 98.Zhang W, Yi K, Chen C, Hou X, Zhou X. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal reproduction science*. 132(3-4);123-8, 2012.
- 99.Zhandi M, Sharafi M. Negative effect of combined cysteine and glutathione in soy lecithin-based extender on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and tissue banking*. 16(3);443-8, 2015.
- 100.Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*. 17(4);745-56, 2016.
- 101.Moghbeli M, Kohram H, Zare-Shahaneh A, Zhandi M, Sharafi M, Nabi MM, et al. Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? *Cryobiology*. 72(3);264-8, 2016.
- 102.Sharafi M, Zhandi M, Akbari Sharif A. Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and tissue banking*. 16(2);261-9, 2015.
- 103.Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Di Nardo M, Adiga SK, Talevi R. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. *Antioxidants*. 10(3);337, 2021.
- 104.Bath ML. Inhibition of in vitro fertilizing capacity of cryopreserved mouse sperm by factors released by damaged sperm, and stimulation by glutathione. *PLoS One*. 5(2);e9387, 2010.
- 105.Zribi N, Chakroun NF, Abdallah FB, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, et al. Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. *Cryobiology*. 65(3);326-31, 2012.

106. Chi Fai Cheung R, Bun Ng T, Ho Wong J. Antifreeze proteins from diverse organisms and their applications: an overview. *Current Protein and Peptide Science*. 18(3);262-83, 2017.
107. Kim HJ, Lee JH, Hur YB, Lee CW, Park S-H, Koo B-W. Marine antifreeze proteins: structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine drugs*. 15(2);27, 2017.
108. Inglis SR, Turner JJ, Harding MM. Applications of type I antifreeze proteins: studies with model membranes & cryoprotectant properties. *Current Protein and Peptide Science*. 7(6);509-22, 2006.
109. Karanova M, Pronina N, Tsvetkova L. The effect of antifreeze glycoproteins on survival and quality of fish spermatozoa under the conditions of long-term storage at +4 degree C. *Izvestiia Akademii nauk Serii Biologicheskaja*. (1);88-92, 2002.
110. Zilli L, Beirão J, Schiavone R, Herraes MP, Gnoni A, Vilella S. Comparative proteome analysis of cryopreserved flagella and head plasma membrane proteins from sea bream spermatozoa: effect of antifreeze proteins. *PLoS One*. 9(6);e99992, 2014.
111. Prathalingam N, Holt W, Revell S, Mirczuk S, Fleck R, Watson P. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*. 66(8);1894-900, 2006.
112. Nishijima K, Tanaka M, Sakai Y, Koshimoto C, Morimoto M, Watanabe T, et al. Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. *Cryobiology*. 69(1);22-5, 2014.
113. Qadeer S, Khan M, Ansari M, Rakha B, Ejaz R, Husna A, et al. Evaluation of antifreeze protein III for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm. *Animal reproduction science*. 148(1-2);26-31, 2014.
114. Lee S-H, Park C-K. Effect of magnetized extender on sperm membrane integrity and development of oocytes in vitro fertilized with liquid storage boar semen. *Animal reproduction science*. 154;86-94, 2015.
115. Soares CA, Annes K, Dreyer TR, Magrini TD, Sonoda MT, da Silva Martinho HS, et al. Photobiological effect of low-level laser irradiation in bovine embryo production system. *Journal of Biomedical Optics*. 19(3);035006, 2014.

- 116.Iaffaldano N, Rosato MP, Paventi G, Pizzuto R, Gambacorta M, Manchisi A, et al. The irradiation of rabbit sperm cells with He–Ne laser prevents their in vitro liquid storage dependent damage. *Animal reproduction science*. 119(1-2);123-9, 2010.
- 117.Fernandes GHC, de Carvalho PdTC, Serra AJ, Crespilho AM, Peron JPS, Rossato C, et al. The effect of low-level laser irradiation on sperm motility, and integrity of the plasma membrane and acrosome in cryopreserved bovine sperm. *PLoS One*. 10(3);e0121487, 2015.
- 118.Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive biomedicine online*. 37(3);327-39, 2018.
- 119.Bogle O, Kumar K, Attardo-Parrinello C, Lewis S, Estanyol J, Ballescà J, et al. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology*. 5(1);10-22, 2017.
- 120.Kao S-H, Chao H-T, Chen H-W, Hwang TI, Liao T-L, Wei Y-H. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and sterility*. 89(5);1183-90, 2008.
- 121.Vatannejad A, Tavilani H, Sadeghi M, Karimi M, Lakpour N, Amanpour S, et al. Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men. *Journal of Endocrinological Investigation*. 42(10);1181-9, 2019.
- 122.LASSO JL, NOILES EE, ALVAREZ JG, STOREY BT. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology*. 15(3);255-65, 1994.
- 123.Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ, Jr, et al. Cryopreservation and Thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*. 71(6);1828-37, 2004.
- 124.Wang S, Wang W, Xu Y, Tang M, Fang J, Sun H, et al. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. *Proteomics*. 14(2-3);298-310, 2014.
- 125.Desrosiers P, Légaré C, Leclerc P, Sullivan R. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertil Steril*. 85(6);1744-52, 2006.

126. Alshawa E, Laqqan M, Montenarh M, Hammadeh ME. Influence of cryopreservation on the CATSPER2 and TEKT2 expression levels and protein levels in human spermatozoa. *Toxicol Rep.* 6;819-24, 2019.
127. Faraji S, Rashki Ghaleno L, Sharafi M, Hezavehei M, Totonchi M, Shahverdi A, et al. Gene Expression Alteration of Sperm-Associated Antigens in Human Cryopreserved Sperm. *Biopreserv Biobank.* 19(6);503-10, 2021.
128. Marchiani S, Tamburrino L, Ricci B, Nosi D, Cambi M, Piomboni P, et al. SUMO1 in human sperm: new targets, role in motility and morphology and relationship with DNA damage. *Reproduction.* 148(5);453-67, 2014.
129. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril.* 102(6);1502-7, 2014.
130. Majzoub A, Agarwal A, Esteves SC. Clinical utility of sperm DNA damage in male infertility. *Panminerva Med.* 61(2);118-27, 2019.
131. Esteves SC, Sharma RK, Gosálvez J, Agarwal A. A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility. *Int Urol Nephrol.* 46(6);1037-52, 2014.
132. Conwell CC, Vilfan ID, Hud NV. Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(16);9296-301, 2003.
133. Baskaran S, Agarwal A, Panner Selvam MK, Finelli R, Robert KA, Iovine C, et al. Tracking research trends and hotspots in sperm DNA fragmentation testing for the evaluation of male infertility: a scientometric analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 17(1);110, 2019.
134. Cho CL, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab J Urol.* 16(1);21-34, 2018.
135. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.* 27(2);176-88, 2006.
136. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 284(6);696-704, 1999.

137. Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I, Cambi M, et al. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl.* 14(1);24-31, 2012.
138. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod.* 29(11);2402-12, 2014.
139. Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biol.* 15(2);94-100, 2015.
140. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod.* 17(1);184-9, 2002.
141. Bui AD, Sharma R, Henkel R, Agarwal A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia.* 50(8);e13012, 2018.
142. Elbardisi H, Finelli R, Agarwal A, Majzoub A, Henkel R, Arafa M. Predictive value of oxidative stress testing in semen for sperm DNA fragmentation assessed by sperm chromatin dispersion test. *Andrology.* 8(3);610-7, 2020.
143. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 14(4);1039-49, 1999.
144. Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril.* 84(1);130-40, 2005.
145. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril.* 78(2);313-8, 2002.
146. O'Donnell L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis.* 4(2);e979623, 2014.
147. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem.* 37(2);109-28, 1993.

148. Rousseaux S, Boussouar F, Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Curtet S, et al. Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Syst Biol Reprod Med.* 57(1-2);50-3, 2011.
149. Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 322(1);33-41, 2005.
150. Oliva R. Protamines and male infertility. *Human reproduction update.* 12(4);417-35, 2006.
151. Kumaresan A, Das Gupta M, Datta TK, Morrell JM. Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. *Frontiers in Veterinary Science.* 7, 2020.
152. Sharma R, Agarwal A. Spermatogenesis: an overview. *Sperm chromatin.* 19-44, 2011.
153. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* 44(4);569-74, 1991.
154. Ren X, Chen X, Wang Z, Wang D. Is transcription in sperm stationary or dynamic? *J Reprod Dev.* 63(5);439-43, 2017.
155. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update.* 13(3);313-27, 2007.
156. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8(9);227, 2007.
157. Vilfan ID, Conwell CC, Hud NV. Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem.* 279(19);20088-95, 2004.
158. Maier WM, Nussbaum G, Domenjoud L, Klemm U, Engel W. The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene. *Nucleic Acids Res.* 18(5);1249-54, 1990.
159. Hamilton TRS, Simões R, Mendes CM, Goissis MD, Nakajima E, Martins EAL, et al. Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. *Andrology.* 7(3);373-81, 2019.
160. Schlüter G, Engel W. The rat Prm3 gene is an intronless member of the protamine gene cluster and is expressed in haploid male germ cells. *Cytogenet Cell Genet.* 71(4);352-5, 1995.
161. McLay DW, Clarke HJ. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction.* 125(5);625-33, 2003.

- 162.Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 12(4);417-35, 2006.
- 163.Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holt WV. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev.* 78(12);951-61, 2011.
- 164.Andrabi SM. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet.* 24(12);561-9, 2007.
- 165.Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol.* 93(2);298-305, 1982.
- 166.Ménézo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote.* 18(4);357-65, 2010.
- 167.Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 80(4);895-902, 2003.
- 168.Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA(®)) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci.* 169;56-75, 2016.
- 169.Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl.* 27(6);890-8, 2006.
- 170.Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod.* 20(11);3101-8, 2005.
- 171.Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed).* 4(2);746-54, 2012.
- 172.Ribas-Maynou J, Benet J. Single and Double Strand Sperm DNA Damage: Different Reproductive Effects on Male Fertility. *Genes (Basel).* 10(2), 2019.
- 173.Hamilton TR, de Castro LS, Delgado Jde C, de Assis PM, Siqueira AF, Mendes CM, et al. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. *Reproduction.* 151(4);379-90, 2016.
- 174.Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 79(4);829-43, 2003.

175. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 23(1);25-43, 2002.
176. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 24(1);59-66, 2003.
177. Gajski G, Ravlić S, Godschalk R, Collins A, Dusinska M, Brunborg G. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 788;108398, 2021.
178. Cortés-Gutiérrez EI, López-Fernández C, Fernández JL, Dávila-Rodríguez MI, Johnston SD, Gosálvez J. Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay. *Front Genet.* 5;404-, 2014.
179. Zini A, Agarwal A. Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction: Springer; 2011.
180. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online.* 14(6);746-57, 2007.
181. Sun J-G, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of reproduction.* 56(3);602-7, 1997.
182. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *Journal of reproduction & infertility.* 15(1);2, 2014.
183. Güleş Ö, Ülker E. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 19(2);73-8, 2008.
184. Erenpreisa J, Erenpreiss J, Freivalds T, Slaidina M, Krampe R, Butikova J, et al. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology.* 52(1);19-27, 2003.
185. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertility and sterility.* 84(4);850-3, 2005.

- 186.Sharif K, Lewis E. Sperm DNA fragmentation testing: To do or not to do? Middle East Fertility Society Journal. 18(2);78-, 2013.
- 187.Güneş S, Kulaç T. The role of epigenetics in spermatogenesis. Turkish journal of urology. 39(3);181, 2013.
- 188.Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. Human reproduction. 20(11);3101-8, 2005.
- 189.Deyebra L, Oliva R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. Analytical Biochemistry. 209(1);201-3, 1993.
- 190.Seligman J, Kosower N, Weissenberg R, Shalgi R. Thiol–disulfide status of human sperm proteins. Reproduction. 101(2);435-43, 1994.
- 191.Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 8416763. Obtenido de Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative ...; 2017.
- 192.Finkel T, Holbrook N. Oxidative stress and aging: Catalase is a longevity determinant enzyme. Nature. 408;239, 2000.
- 193.Asma B, Ranajoy C, Shankar M. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal disease. Physiological Review. 94(2);329-54, 2014.
- 194.Qin J, Kosten T, Yang X. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry. 46;200-6, 2013.
- 195.Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of botany. 2012, 2012.
- 196.Padureanu R, Albu CV, Mititelu RR, Bacanoiu MV, Docea AO, Calina D, et al. Oxidative stress and inflammation interdependence in multiple sclerosis. Journal of clinical medicine. 8(11);1815, 2019.
- 197.Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. Biochemical pharmacology. 92(1);90-101, 2014.

198. Halliwell B. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology and medicine*. 187-267, 2007.
199. Wagner H, Cheng JW, Ko EY. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab journal of urology*. 16(1);35-43, 2018.
200. Condorelli R, Russo GI, Calogero A, Morgia G, La Vignera S. Chronic prostatitis and its detrimental impact on sperm parameters: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Endocrinological Investigation*. 40(11);1209-18, 2017.
201. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Mascha E, Sikka SC, Thomas Jr AJ. Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. *Fertility and Sterility*. 82(4);871-7, 2004.
202. Golas A, Malek P, Piasecka M, Styrna J. Sperm mitochondria diaphorase activity—a gene mapping study of recombinant inbred strains of mice. *International Journal of Developmental Biology*. 54(4);667-73, 2010.
203. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive Biomedicine*. 14(4);231, 2016.
204. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker H, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update*. 16(3);231-45, 2010.
205. Agarwal A, Rana M, Qiu E, AlBunni H, Bui AD, Henkel R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia*. 50(11);e13126, 2018.
206. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian Journal of Medical Research*. 129(4);357, 2009.
207. Brand JS, Chan M-F, Dowsett M, Folkerd E, Wareham NJ, Luben RN, et al. Cigarette smoking and endogenous sex hormones in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 96(10);3184-92, 2011.
208. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *International journal of environmental research and public health*. 6(2);445-62, 2009.
209. Kesari KK, Kumar S, Behari J. 900-MHz microwave radiation promotes oxidation in rat brain. *Electromagnetic biology and medicine*. 30(4);219-34, 2011.

210. Storgaard L, Bonde JP, Ernst E, Andersen CY, Spanò M, Christensen K, et al. Genetic and environmental correlates of semen quality: a twin study. *Epidemiology*. 17(6);674-81, 2006.
211. Holland R, Fishbein JC. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxid Redox Signal*. 13(11);1749-61, 2010.
212. Chyra-Jach D, Kaletka Z, Dobrakowski M, Machoń-Grecka A, Kasperczyk S, Birkner E, et al. The Associations between Infertility and Antioxidants, Proinflammatory Cytokines, and Chemokines. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;8354747, 2018.
213. Faure C, Leveille P, Dupont C, Julia C, Chavatte-Palmer P, Sutton A, et al. Are superoxide dismutase 2 and nitric oxide synthase polymorphisms associated with idiopathic infertility? *Antioxid Redox Signal*. 21(4);565-9, 2014.
214. Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DS. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radic Biol Med*. 21(4);495-504, 1996.
215. Sabouhi S, Salehi Z, Bahadori MH, Mahdavi M. Human catalase gene polymorphism (CAT C-262T) and risk of male infertility. *Andrologia*. 47(1);97-101, 2015.
216. Salimi S, Keshavarzi F, Mohammadpour-Gharehbagh A, Moodi M, Mousavi M, Karimian M, et al. Polymorphisms of the folate metabolizing enzymes: Association with SLE susceptibility and in silico analysis. *Gene*. 637;161-72, 2017.
217. Karimian M, Aftabi Y, Mazoochi T, Babaei F, Khamechian T, Boojari H, et al. Survivin polymorphisms and susceptibility to prostate cancer: A genetic association study and an in silico analysis. *Excli j*. 17;479-91, 2018.
218. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertil Steril*. 99(3);607-15, 2013.
219. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol*. 12(5);389-98, 2002.
220. Morrell CN. Reactive oxygen species: finding the right balance. *Circ Res*. 103(6);571-2, 2008.
221. Aitken RJ, Smith TB, Lord T, Kuczera L, Koppers AJ, Naumovski N, et al. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human

- spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology*. 1(2);192-205, 2013.
222. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 32(1);1-17, 2014.
223. Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 28(1-2);1-10, 2016.
224. Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, et al. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med*. 65;719-23, 2013.
225. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, et al. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med*. 21(1);109-22, 2015.
226. Bauer NC, Corbett AH, Doetsch PW. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res*. 43(21);10083-101, 2015.
227. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 49(10), 2017.
228. Wagner H, Cheng JW, Ko EY. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab J Urol*. 16(1);35-43, 2018.
229. Matapurkar A, Lazebnik Y. Requirement of cytochrome c for apoptosis in human cells. *Cell Death Differ*. 13(12);2062-7, 2006.
230. Fariello RM, Del Giudice PT, Spaine DM, Fraietta R, Bertolla RP, Cedenho AP. Effect of leukocytospermia and processing by discontinuous density gradient on sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity. *J Assist Reprod Genet*. 26(2-3);151-7, 2009.
231. Subramanian V, Ravichandran A, Thiagarajan N, Govindarajan M, Dhandayuthapani S, Suresh S. Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility. *Clin Exp Reprod Med*. 45(2);88-93, 2018.
232. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev*. 59(4);451-8, 2001.

233. Tiwari S, Mohanty TK, Bhakat M, Kumar N, Baithalu RK, Nath S, et al. Comparative evidence support better antioxidant efficacy of mitochondrial-targeted (Mitoquinone) than cytosolic (Resveratrol) antioxidant in improving in-vitro sperm functions of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Cryobiology*. 101;125-34, 2021.
234. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online*. 21(4);456-62, 2010.
235. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 7(4);871-91, 1995.
236. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30(1);32-44, 1993.
237. Dussutour A, Latty T, Beekman M, Simpson SJ. Amoeboid organism solves complex nutritional challenges. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(10);4607-11, 2010.
238. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 13(22);2905-27, 1999.
239. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 441(7092);424-30, 2006.
240. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology*. 4, 2014.
241. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*. 67;481-507, 1998.
242. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(20);10983-5, 2001.
243. Pawson T, Nash P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev*. 14(9);1027-47, 2000.
244. Mahran AM, Mosad E, Abdel-Raheem MA, Ahmed EH, Abdel Motaleb AA, Hofny ER. The correlation between mammalian target of rapamycin (mTOR) gene expression and sperm DNA damage among infertile patients with and without varicocele. *Andrologia*. 51(9);e13341, 2019.

245. Jesus TT, Oliveira PF, Sousa M, Cheng CY, Alves MG. Mammalian target of rapamycin (mTOR): a central regulator of male fertility? *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 52(3);235-53, 2017.
246. Correia B, Sousa MI, Ramalho-Santos J. The mTOR pathway in reproduction: from gonadal function to developmental coordination. *Reproduction.* 159(4);R173-r88, 2020.
247. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol.* 1;107, 2003.
248. Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev.* 64(1);16-64, 2012.
249. Mok KW, Mruk DD, Cheng CY. Regulation of blood–testis barrier (BTB) dynamics during spermatogenesis via the “Yin” and “Yang” effects of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and mTORC2. *International review of cell and molecular biology.* 301;291-358, 2013.
250. Nogueira V, Hay N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clinical Cancer Research.* 19(16);4309-14, 2013.
251. Jesus TT, Oliveira PF, Silva J, Barros A, Ferreira R, Sousa M, et al. Mammalian target of rapamycin controls glucose consumption and redox balance in human Sertoli cells. *Fertility and sterility.* 105(3);825-33. e3, 2016.
252. G Alves M, R Dias T, M Silva B, F Oliveira P. Metabolic cooperation in testis as a pharmacological target: from disease to contraception. *Current Molecular Pharmacology.* 7(2);83-95, 2014.
253. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 4(2);a011593, 2012.
254. Karabulut S, Demiroğlu-Zergeroğlu A, Yılmaz E, Sağır F, Delikara N. p53 and mitogen-activated protein kinase pathway protein profiles in fresh and frozen spermatozoa. *Andrologia.* 46(10);1113-7, 2014.
255. Karabulut S. Sperm Kriyoprezervasyonu'nun Sinyal Yolakları, Apoptoz Ve Sperm Parametreleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi (Doktora Tezi). Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Ve Fen Bilimleri Enstitüsü. 49-51, 2014.

256. Altun CE. Erkek İnfertilitesinde Oksidatif Stresin Camp Aracılı Pka Yolağı Proteinlerine Ve İcisi Parametrelerine Etkisinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, . 58-9, 2020.
257. O'Neill HC, Nikoloska M, Ho H, Doshi A, Maalouf W. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *J Assist Reprod Genet.* 36(8);1713-20, 2019.
258. Hossen S, Sharker MR, Cho Y, Sukhan ZP, Kho KH. Effects of Antifreeze Protein III on Sperm Cryopreservation of Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Int J Mol Sci.* 22(8), 2021.
259. Bailey J, Morrier A, Cormier N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian journal of animal science.* 83(3);393-401, 2003.
260. Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology.* 21(1);1-7, 2000.
261. Larsson B, Rodríguez-Martínez H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science.* 60-61;327-36, 2000.
262. Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, Nguyen TV, Nguyen TAT, Nguyen QHV, et al. Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? *Clin Exp Reprod Med.* 46(2);67-75, 2019.
263. Karabulut S, Demiroğlu-Zergeroğlu A, Yılmaz E, Kutlu P, Keskin İ. Effects of human sperm cryopreservation on apoptotic markers in normozoospermic and non-normozoospermic patients. *Zygote.* 26(4);308-13, 2018.
264. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 25(8);403-11, 2008.
265. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl.* 22(3);155-62, 1999.
266. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y, et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 19(2);202-6, 2009.

267. Pedersen H, Lebech PE. Ultrastructural changes in the human spermatozoon after freezing for artificial insemination. *Fertil Steril*. 22(2);125-33, 1971.
268. Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 91(1);65-70, 2000.
269. Bogle OA, Kumar K, Attardo-Parrinello C, Lewis SE, Estanyol JM, Ballescà JL, et al. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology*. 5(1);10-22, 2017.
270. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod*. 16(6);1191-9, 2001.
271. Banihani SA, Alawneh RF. Human semen samples with high antioxidant reservoir may exhibit lower post-cryopreservation recovery of sperm motility. *Biomolecules*. 9(3);111, 2019.
272. Wen F, Li Y, Feng T, Du Y, Ren F, Zhang L, et al. Grape Seed Procyanidin Extract (GSPE) Improves Goat Sperm Quality When Preserved at 4 °C. *Animals (Basel)*. 9(10), 2019.
273. Falchi L, Galleri G, Zedda MT, Pau S, Bogliolo L, Ariu F, et al. Liquid storage of ram semen for 96h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science*. 207;1-6, 2018.
274. Liu T, Han Y, Zhou T, Zhang R, Chen H, Chen S, et al. Mechanisms of ROS-induced mitochondria-dependent apoptosis underlying liquid storage of goat spermatozoa. *Aging (Albany NY)*. 11(18);7880-98, 2019.
275. Brouwers JF, Gadella BM. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radic Biol Med*. 35(11);1382-91, 2003.
276. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl*. 26(6);654-60, 2005.
277. Záková J, Lousová E, Ventruba P, Crha I, Pochopová H, Vinklárková J, et al. Sperm cryopreservation before testicular cancer treatment and its subsequent utilization for the treatment of infertility. *ScientificWorldJournal*. 2014;575978, 2014.
278. Sibert L, Rives N, Rey D, Mac EB, Grise P. Semen cryopreservation after orchidectomy in men with testicular cancer. *BJU Int*. 84(9);1038-42, 1999.

- 279.Sharafi M, Zhandi M, Shahverdi A, Shakeri M. Beneficial Effects of Nitric Oxide Induced Mild Oxidative Stress on Post-Thawed Bull Semen Quality. *Int J Fertil Steril.* 9(2);230-7, 2015.
- 280.Banihani SA, Alawneh RF, Abu-Awad A. Human semen cryopreservation reduces the seminal antioxidant reservoir. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science.* 70(1);3-6, 2016.
- 281.Sharafi M, Zhandi M, Shahverdi A, Shakeri M. Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality. *International journal of fertility & sterility.* 9(2);230, 2015.
- 282.Quilter C, Karcanias A, Bagga M, Duncan S, Murray A, Conway G, et al. Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF). *Human reproduction.* 25(8);2139-50, 2010.
- 283.Žáková J, Lousová E, Ventruba P, Crha I, Pochopová H, Vinklárková J, et al. Sperm cryopreservation before testicular cancer treatment and its subsequent utilization for the treatment of infertility. *The Scientific World Journal.* 2014, 2014.
- 284.Sibert L, Rives N, Rey D, Mace B, Grise P. Semen cryopreservation after orchidectomy in men with testicular cancer. *BJU international.* 84(9);1038-42, 1999.
- 285.Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online.* 21(4);456-62, 2010.
- 286.Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, Nguyen TTA, Nguyen VQH, Cao NT. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 234;14-20, 2019.
- 287.Tandara M, Bajić A, Tandara L, Bilić-Zulle L, Šunj M, Kozina V, et al. Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology.* 2(5);678-86, 2014.
- 288.Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Molecular human reproduction.* 5(1);29-37, 1999.
- 289.Royère D, Hamamah S, Nicolle J, Barthelemy C, Lansac J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: Fluorescence acridine

- orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete research*. 21(1);51-7, 1988.
290. Royère D, Hamamah S, Nicolle J, Lansac J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *International Journal of Andrology*. 14(5);328-32, 1991.
291. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in cell science*. 22(2);169-89, 2000.
292. Yang H, Li G, Jin H, Guo Y, Sun Y. The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Translational andrology and urology*. 8(4);356, 2019.
293. Kara M, Türktekin N, Aydın T. Halosperm Tekniği ile Bakılan DNA Fragmentasyon Oranının IVF-ICSI Sonuçları Üzerine Olan Etkisi. *Kafkas Tıp Bilimleri Dergisi*. 1(3);92-6, 2011.
294. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol*. 2012, 2011.
295. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and sterility*. 86(3);597-600, 2006.
296. Hosseini A, Khalili MA, Talebi AR, Agha-Rahimi A, Ghasemi-Esmailabad S, Woodward B, et al. Cryopreservation of low number of human spermatozoa; which is better: vapor phase or direct submerging in liquid nitrogen? *Human Fertility*. 2018.
297. Chohan K, Griffin J, Carrell D. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*. 36(5);321-6, 2004.
298. Kalthur G, Adiga SK, Upadhyaya D, Rao S, Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertility and Sterility*. 89(6);1723-7, 2008.
299. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertility and sterility*. 76(5);892-900, 2001.

300. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction*. 19(4);932-9, 2004.
301. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas Jr AJ, et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology of reproduction*. 71(6);1828-37, 2004.
302. Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci*. 107(3-4);257-67, 2008.
303. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*. 93(1);159-66, 2010.
304. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 1863(12);2977-92, 2016.
305. Johnston SD, Satake N, Zee Y, López-Fernández C, Holt WV, Gosálvez J. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. *Reproduction*. 143(6);787-97, 2012.
306. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 85(1);47-64, 2016.
307. Lusignan MF, Li X, Herrero B, Delbes G, Chan PTK. Effects of different cryopreservation methods on DNA integrity and sperm chromatin quality in men. *Andrology*. 6(6);829-35, 2018.
308. Satirapod C, Treetampinich C, Weerakiet S, Wongkularb A, Rattanasiri S, Choktanasiri W. Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Andrologia*. 44 Suppl 1;786-90, 2012.
309. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl*. 49(1);49-55, 2003.
310. Isachenko E, Isachenko V, Katkov, II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod*. 19(4);932-9, 2004.

311. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril*. 75(2);263-8, 2001.
312. Terren C, Nisolle M, Munaut C. Pharmacological inhibition of the PI3K/PTEN/Akt and mTOR signalling pathways limits follicle activation induced by ovarian cryopreservation and in vitro culture. *Journal of ovarian research*. 14(1);95-, 2021.
313. Liu S, Huang L, Geng Y, He J, Chen X, Xu H, et al. Rapamycin inhibits spermatogenesis by changing the autophagy status through suppressing mechanistic target of rapamycin-p70S6 kinase in male rats. *Mol Med Rep*. 16(4);4029-37, 2017.
314. Chen JS, Wang Q, Fu XH, Huang XH, Chen XL, Cao LQ, et al. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatol Res*. 39(2);177-86, 2009.
315. Xia P, Xu X-Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am J Cancer Res*. 5(5);1602-9, 2015.
316. Silva JV, Cabral M, Correia BR, Carvalho P, Sousa M, Oliveira PF, et al. mTOR Signaling Pathway Regulates Sperm Quality in Older Men. *Cells*. 8(6), 2019.

10. ETİK KURUL ONAYI

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Sayı : E-10840098-772.02-2374
Konu: Etik Kurulu Kararı

25/05/2021

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sperm Kriyoprezervasyonunun Oksidatif Stres, DNA Fragmantasyonu, Kromatin Yapı ve mTOR Sinyal Yolağında Meydana Getirdiği Değişiklikler ile Sperm Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi SEDA KARABULUT			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji A.D			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakımızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden B62CC354XA kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Sa:



İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No:511	Tarih: 20/05/2021				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna “ oybirliği ” ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ	Tıp Tarihi ve Etik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Doç. Dr. Mehmet Kemal ÖZDEMİR	Elektrik ve Elektronik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Doç. Dr. İknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Dr. Öğr. Üyesi Neziha HACIHASANOĞLU ÇAKMAK	Biyokimya	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	Tıbbi Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur

* :Toplantıda Bulunma

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden B62CC354XA kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

COVID-19 (Pandemi) nedeniyle etik kurulumuz sanal olarak toplanmış olup kurul üyelerimizden uygunluk kararı sanal ortamda alınmıştır. Araştırmacı tarafından talep edilirse, COVID-19 (Pandemi) sonrası ıslak imzalı karar formu ayrıca hazırlanabilir.

Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Sekreteri
Bilge KAYA

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden B62CC354XA kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Sayfa 3

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-10840098-772.02-3677
Konu: Etik Kurulu Kararı

24/06/2022

Sayın Dr. Öğr. Üyesi SEDA KARABULUT

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 20/05/2021 tarihli 511 karar no ile onay verilen "Sperm Kriyoprezervasyonunun Oksidatif Stres, DNA Fragmentasyonu, Kromatin Yapı ve mTOR Sinyal Yoluğında Meydana Getirdiği Değişiklikler ile Sperm Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli çalışmanız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

*Yukarıda verilen araştırma açık adı yerine "*Sperm Kriyoprezervasyonunun Oksidatif Stres, DNA Fragmentasyonu, Kromatin Yapı ve mTOR Ekspresyonunda Meydana Getirdiği Değişiklikler ile Sperm Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi*" olarak değiştirilmesi isteği.

Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 65DB2427XB kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi (Ana Yerleşke Rektörlük)
Kavacık Mah. Ekinçiler Cad. No: 19, Kavacık Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul
T: [Redacted]
E-Posta: bilgi@medipol.edu.tr İnternet Adresi: www.medipol.edu.tr
Kep Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kep.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilge KAYA

T: [Redacted]

