



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN SPERM  
MOTİLİTESİ VE DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT (DNA)  
FRAGMENTASYONUNA ETKİSİNİN LEPTİN MOLEKÜLÜ İLE  
İLİŞKİSİ**

TUĞÇE ÖNEL

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. ŞULE AYLA

İSTANBUL - 2016



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN SPERM  
MOTİLİTESİ VE DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT (DNA)  
FRAGMENTASYONUNA ETKİSİNİN LEPTİN MOLEKÜLÜ İLE  
İLİŞKİSİ**

TUĞÇE ÖNEL

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. ŞULE AYLA

İSTANBUL - 2016

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim aşamasında her türlü ilgisini ve desteğini gördüğüm, gerek akademik gerekse hayat tecrübelerini benimle paylaşan, her koşulda yanımda olan çok kıymetli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Şule Ayla'ya,

Eğitim ve tez hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Tangül Müdok'a, Yrd. Doç. Dr. İlknur Keskin'e, Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersan Kerman'a,

Tüm yoğunluğuna rağmen tezimin istatistiksel değerlendirmelerinde desteğini esirgemeyen hocalarım Yrd. Doç. Dr. Cüneyd Parlayan'a ve Yrd. Doç. Dr. Yalçın Günal'a,

Tezimin biyokimyasal analiz aşamalarında her türlü yardımda bulunan Doç. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na,

Tez dönemim boyunca her zaman yanımda olan, yardımla üreme teknikleri laboratuvarındaki tüm bildiklerimi bana öğreten, beni her koşulda teşvik ve motive eden değerli hocalarım embriyolog Tuğba Varlı Yelke'ye, Tuğba Şenel Ustabaş'a ve Şebnem Yazıcı'ya,

Her zaman ve her konuda desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Bircan Kolbaşı, Arş. Gör. Mehmet Şerif Aydın, Arş. Gör. Olgu Enis Tok, Arş. Gör. Nilüfer Ulaş, Öğr. Gör. Hilal Eren, Yüksek Lisans öğrencileri Ecem Yıldırım, Özge Biçeroğlu, Berna Yıldırım, Eşref Çelik, Volkan Bülbul ve Nejda Bedri'ye,

Sevgi, ilgi, manevi destek ve varlıklarıyla bana güç veren canım ailem, gücüme güç katan canım; babam Fevzi Önel, meleğim; annem Şermin Önel, miniğim; kardeşim Buse Önel ve benden desteğini hiçbir koşulda esirgemeyen arkadaşım Can Polat'a,

Sonsuz teşekkürler.

# İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAY FORMU</b> .....	i
<b>BEYAN</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	viii
<b>1.ÖZET</b> .....	1
<b>2.ABSTRACT</b> .....	2
<b>3.GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>4.GENEL BİLGİLER</b> .....	5
4.1.Erkek Genital Sistemi .....	5
4.1.1.Spermatogenez .....	6
4.2.Dondurma-Çözme (Kriyoprezervasyon).....	9
4.3.Apoptozis .....	11
4.4.Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	13
4.5.Leptin .....	14
4.5.1.Leptinin tarihçesi.....	14
4.5.2.Leptinin yapısı ve salınımı .....	15
4.5.3.Leptinin etki mekanizması .....	17
4.5.4.Leptin ve üreme.....	19
4.5.5.Testiste Ob-R ve leptin ekspresyonu .....	20
<b>5. METOT VE MATERYAL</b> .....	21
5.1.Denekler .....	21
5.2.Motilite ve Konsantrasyon .....	21
5.3.Sperm Dondurma-Çözme İşlemi .....	22

5.4.İşık Mikroskobu İncelemesi .....	23
5.5.DNA Fragmantasyonu Tayini .....	24
5.6.Geçirimli Elektron Mikroskobu İncelemesi .....	24
5.7.ELISA ile Leptin Analizi .....	25
5.8.Semende Total Oksidan Tayini .....	26
5.9.İstatistiksel Analiz .....	27
<b>6.BULGULAR</b> .....	<b>28</b>
6.1.Motilite ve Konsantrasyon .....	28
6.2.İşık Mikroskobik Bulgular .....	28
6.3.İşık Mikroskobik Değerlendirmenin İstatistiksel Analizi .....	31
6.4.DNA Fragmantasyonu Bulguları .....	32
6.5.DNA Fragmantasyonu Bulgularının İstatistiksel Analizi .....	34
6.6.Geçirimli Elektron Mikroskobi Bulguları .....	34
6.7.ELISA ile Leptin Analizi .....	41
6.8.ELISA ile Leptin Analizi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi .....	41
6.9.Reaktif Oksijen Türleri(ROT) Analizi .....	42
6.10.Reaktif Oksijen Türleri(ROT) Analizi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi .....	43
<b>7.TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>44</b>
<b>8.KAYNAKLAR</b> .....	<b>48</b>
<b>9.ETİK KURUL ONAYI</b> .....	<b>53</b>
<b>10.ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>56</b>

## KISALTMALAR

AGRP:	Agouti-Related Protein
ARC:	Arcuate Nucleus
DMSO :	Dimetil Sülfoksit
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
FSH:	Follicle-Stimulating Hormone
GnRH:	Gonadotropin-Releasing Hormone
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen Peroksit
LH:	Luteinizan Hormon
MAP-K:	Mitogen-Activated Protein Kinase
NPY:	Neuropeptide Y
OsO <sub>4</sub> :	Osmium Tetraoksit
PBS:	Phosphate-buffered Saline
PFA:	Paraformaldehit Asit
POMC:	Pro-opiomelanocortin
ProH:	Propilen Oksit
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
WHO:	World Health Organisation

## TABLO LİSTESİ

Tablo 5.7. Standart solüsyon dilüsyonları.....	25
Tablo 5.8. Reaktiflerin hazırlanması.....	27
Tablo 6.1. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası motilite oranı karşılaştırılması.....	28
Tablo 6.3. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası çoklu morfoloji oranı karşılaştırılması. .....	32
Tablo 6.5. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası DNA fragmentasyon oranı karşılaştırılması. ....	34
Tablo 6.8.1. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası semen leptin seviyelerinin karşılaştırılması. ....	41
Tablo 6.8.2. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası motilite oranı ve semen leptin seviyeleri ilişkisi. ....	42
Tablo 6.8.3. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası DNA fragmentasyonu ve semen leptin seviyeleri ilişkisi. ....	42
Tablo 6.8.10. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası ROT seviyelerinin karşılaştırılması. .....	43

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1. Erkek genital sisteminin bileşenleri .....	5
Şekil 4.1.1. Spermatogoniyal kök hücrelerin farklılaşması ve kendini yenilemesi .....	7
Şekil 4.1.2. Spermatogenik hücre serisinin şematik gösterimi .....	7
Şekil 4.1.3. İnsan spermının şematik gösterimi .....	9
Şekil 4.3.1. Kırık kromatin yapısının TUNEL metodu ile işaretlenmesi.....	12
Şekil 4.5.2. Leptinin yapısı .....	17
Şekil 4.5.3.1. Leptinin ana etki mekanizması .....	18
Şekil 4.5.3.2. Leptinin etki mekanizması.....	19
Şekil 6.2.1 Dondurma işlemi öncesi sperm morfolojik inceleme .....	29
Şekil 6.2.2. Dondurma işlemi öncesi sperm morfolojik inceleme .....	29
Şekil 6.2.3. Dondurma-çözme işlemi sonrası sperm morfolojik inceleme .....	30
Şekil 6.2.4. Dondurma-çözme işlemi sonrası sperm morfolojik inceleme .....	31
Şekil 6.4.1. Dondurma işlemi öncesi DNA fragmentasyonu analizi .....	33
Şekil 6.4.2. Dondurma işlemi öncesi DNA fragmentasyonu analizi .....	33
Şekil 6.6.1. Dondurma işlemi öncesi geçirimli elektron mikroskopi incelemesi .....	35
Şekil 6.6.2. Dondurma işlemi öncesi geçirimli elektron mikroskopi incelemesi.....	36
Şekil 6.6.3. Dondurma-çözme işlemi sonrası geçirimli elektron mikroskopi incelemesi.....	37
Şekil 6.6.4. Dondurma-çözme işlemi sonrası geçirimli elektron mikroskopi incelemesi.....	38
Şekil 6.6.5. Dondurma-çözme işlemi sonrası geçirimli elektron mikroskopi incelemesi.....	39
Şekil 6.6.6. Dondurma-çözme işlemi sonrası geçirimli elektron mikroskopi incelemesi.....	40



## 1. ÖZET

### İNSAN SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN SPERM MOTİLİTESİ VE DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT (DNA) FRAGMENTASYONUNA ETKİSİNİN LEPTİN MOLEKÜLÜ İLE İLİŞKİSİ

Radyoterapi, kemoterapi ve bazı maligniteler sonucu ejakülatuar disfonksiyon ve testiküler yetmezlik oluşabilir. Bu gibi durumlar için çiftlere çocuk sahibi olma konusunda yardımcı olabilecek metod sperm kriyoprezervasyonudur. Kriyoprezervasyon; hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki sıcaklığa kadar soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasını ifade eder. Leptin molekülü; yenilenme, üreme, anjiyogenez, enerji harcanması, nöroendokrin sistemlere ilişkin düzenleme tokluk da dahil çoğu biyolojik süreçte rol oynamaktadır ve leptinin çeşitli çalışmalarda spermatogenez ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma ile kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası parametrelerde leptin molekülünün sperm motilitesi ve DNA fragmentasyonu parametrelerinde bir marker (belirleyici) olarak kullanılabilmesi amaçlanmaktadır. Çalışmada Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) laboratuvar kılavuzuna göre normozoospermik olan 30 insandan alınan semen örnekleri kullanıldı. Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası; sperm motilitesi DSÖ kriterlerine göre, morfolojik sperm analizi Spermac Stain boyaması ile, DNA fragmentasyon analizi TUNEL ile, spermatozoa ultrastrüktüel yapı incelemesi geçirimli elektron mikroskobu ile, semen leptin seviyesi ölçümü ELISA yöntemi ile, ROT (Reaktif Oksijen Türleri) seviyeleri ise kalorimetrik yöntemlerle analiz edildi. Kriyoprezervasyon sonrasında öncesine oranla, sperm motilitesinde düşüş, morfolojik yapıda defektler, DNA fragmentasyonunda ise artış olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde semen ROT ve leptin seviyelerinde anlamlı ölçüde artış olduğu bulunmuştur. Bu çalışmamızın sonuçlarına göre; kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası, normozoospermik hasta semen örneklerinde sperm motilitesi, DNA fragmentasyonu gibi parametrelerde, leptin molekülünün bir marker olarak kullanılabileceğini ve bu çalışmanın sonuçlarının klinik yönden erkek (in)fertilitesi üzerine yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** sperm, DNA fragmentasyonu, kriyoprezervasyon, leptin, motilite

Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No:38659)

## **2.ABSTRACT**

### **HUMAN SPERM CRYOPRESERVATION EFFECTS OF SPERM MOTILITY AND DNA FRAGMENTATION; TO INVESTIGATE RELATIONSHIP OF THIS WITH THE EFFECT OF LEPTIN MOLECULE**

Radiotherapy, chemotherapy, some malignancies and even invasive surgery can result in ejaculatory dysfunction and testicular insufficiency. For a couples who are about to have a child can help stop the only proven method of sperm cryopreservation. Cryopreservation: accounts for, freezing the cells and tissues to below zero, stopping all the biological activities and keeping them for future use. Cryopreservation can cause some harmful changes in the structure and function of the sperm. Leptin molecule; plays a lot of roles in most biological processes including the satiety and renewal, proliferation, angiogenesis, energy expenditure, regulation of the neuroendocrine system and leptin was reported to be associated with spermatogenesis in several studies. This study aims leptin molecule to be used as a marker for sperm motility and DNA fragmentation parameters before and after the cryopreservation. In this study, according to the world health organization laboratory guide semen samples were taken from 30 normozoospermia group is used. Each semen sample is examined for the same parameters before and after a cryopreservation process. Cryopreservation after and before; according to the sperm motility is going to be analysis based on WHO laboratory criteria, morphological sperm analysis with spermac stain dye, DNA fragmentation analysis by TUNEL, spermatozoa ultrastructure analysis with transmission electron microscopy(TEM), seminal leptin levels is measured with ELISA method and ROS levels is analysed by the calorimetric method. After cryopreservation than before, there is a decrease in sperm motility, distribution of sperm morphology and there is an increase in DNA fragmentation. Similarly, semen in ROT levels are also found to be increased significantly. According to results of this study; after and before cryopreservation, in normozoospermia patient semen samples in parameters sperm motility and such as DNA fragmentation; leptin molecule can be used as a marker and it can contribute to further studies on man (in)fertility.

**Key Words:** cryopreservation, DNA fragmentation, leptin, motility, sperm.

### 3.GİRİŞ ve AMAÇ

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama), hücrelerin çok düşük sıcaklıklarda canlılık kapasitesini ve işlevselliğini kaybetmeden saklanmasını amaçlayan bir tekniktir. Kriyoprezervasyon işlemindeki amaç çok düşük ısıda canlı bir hücre veya dokunun, minimum hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (1). Sperm kriyoprezervasyonu, infertiliteye neden olabilecek cerrahi operasyonların varlığında , radyoterapi/kemoterapi gibi sitotoksik tedavi öncesinde, testis hasarına neden olabilecek otoimmün hastalıklar veya diyabet gibi malign olmayan bazı hastalıklarda spermilerin saklanarak fertilitenin korunması amacı ile kullanılabilir. Kriyoprezervasyon sırasında spermier fiziksel ve kimyasal strese maruz kalırlar, plazma membranı lipid yapısı değişir ve fosfolipidlerin çıkışı gerçekleşir (2).

Apoptoz, kaspaz olarak adlandırılan sistein proteaz grubu aktivasyonunu ve hücrelerin ölümü için uyarılara bağlı karmaşık kaskadları içeren son derece koordineli ve genellikle enerji bağımlı bir süreçtir (3). İlk olarak gerçekleşen hücre büzüşmesinden sonra, kromatin parçalanması, membran kabarcıklanması, nüklear yoğunlaşma ve son olarak fagosite edilen apoptotik cisimlere bölünme gerçekleştiği görölmektedir. Sperm hücrelerinde meydana gelen apoptozun özellikleri ise; kromatin, mitokondri, nukleus ve plazma membranı anormalliklerinin ultrastrüktüel olarak görölmesi, stoplazmik vakuol ve apoptotik cisimlerin oluşumudur (4).

ROT (Reaktif Oksijen Türleri) yüksek derecede reaktif oksijenlenmiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır. Metabolik ve fizyolojik süreçlerde, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif mekanizmalar aracılığıyla organizmalarda zararlı oksidatif reaksiyonlar sonucu meydana gelir (5). Semendeki ROT kaynağı, lökositler ve spermatozoon hücreleridir. ROT sitotoksitesisi, üretilme ve yokedilme oranları arasındaki hassas denge sonucu belirlenmektedir. Bu dengedeki herhangi bir bozukluk hücresel zarara neden olmaktadır. Spermatozoon ROT'a diğer hücrelere göre daha hassastır. Çünkü plazma membranları büyük oranda doymamış yağ asitleri ve sitoplazmaları da düşük konsantrasyonlarda antioksidan enzimleri içerirler (6). Yüksek konsantrasyonda ROT üretimi, lipid peroksidasyonu ve bozulmuş membran fonksiyonlarına neden olarak sperm metabolizmasını dolayısıyla morfoloji, motilite

ve fertilitiyi olumsuz yönde etkileyerek erkek infertilitesinde önemli rol oynamaktadır (7).

Leptin 167 aminoasit içeren, 16 kD molekül ağırlığında yağ hresi ve birçok dokudan salgılandığı saptanan, plazmada belirli bir kan düzeyi oluşturan, kanda serbest ve proteine bağlı olarak taşıman bir polipeptiddir (8). Leptinin ana etki mekanizması; birçok hipofizer organın regülasyonunda görev alan ve asıl etkisi iştahu arttırmak olan nöropeptid-Y'nin arkuat nukleustan salınımı ve ekspresyonunu inhibe etmektir (9). Leptin her iki cinste de üreme sistemi hormonlarının (strojen, progesteron ve testosteron gibi) salgılanmasını stimüle eder. Leptinin plasenta tarafından da sentezlendiğinin ve leptin reseptörlerinin plasenta ve yumurtalıklarda da eksprese edildiğinin anlaşılması (10, 11), leptinin üreme sistemi üzerinde de önemli etkilere sahip olabileceğini düşündürmüştür. Leptin ekspresyonu, fare germ hrelerinde hre tipi ve aşamalarına spesifik olarak immünohistokimya teknikleri tarafından belirlenmiş ve farelerin Leydig hrelerinde tespit edilmemiştir. Gelişim aşamaları boyunca testiküler kök hrelerde üretilen leptinin yenilenmeye aracılık etmek için otokrin bir şekilde hreleri etkilediği görülmüştür (12).

Spermde leptin molekül çalışmasını içeren yayın sayısının az olduğu grlmektedir. Bu çalışmanın amacı, kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası semen örneklerimizde sperm motilite, morfoloji ve DNA fragmentasyonlarının analizi ve karşılaştırılmalarını yaparak, bu parametrelerin leptin molekül seviyeleri ile ilişkisini araştırmaktır. Bu şekilde sperm motilite ve DNA fragmentasyonlarında leptin molekül seviyelerinin belirleyici olarak kullanılmasını hedeflemekteyiz. Bu çalışmanın sonuçlarının klinik yönden erkek infertilitesi üzerine yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

## 4.GENEL BİLGİLER

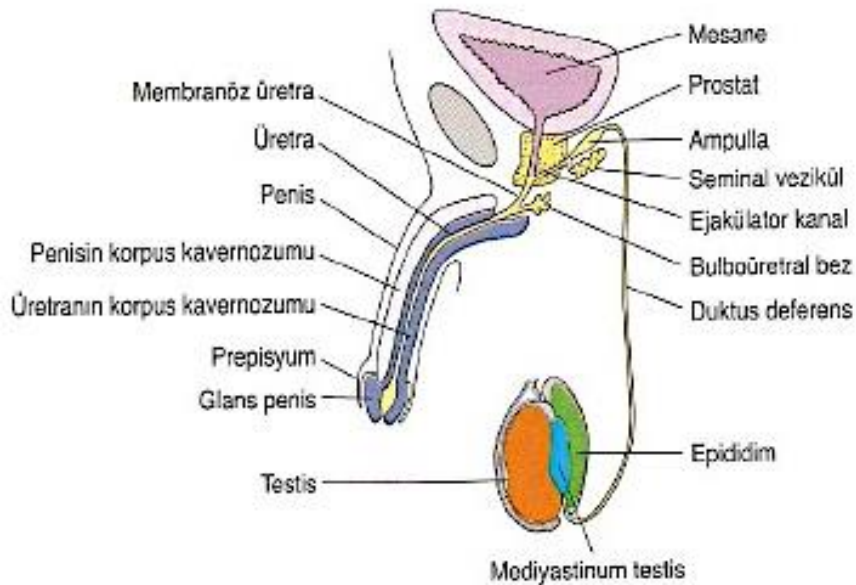
### 4.1.Erkek Genital Sistemi

Erkek üreme sistemi;

- 1) Haploid erkek gametin (spermatozoa veya sperm) devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından;
- 2) Erkek seks hormonlarının (androjenler) sentezi ve sekresyonundan sorumludur.

Erkek üreme sistemi dört birimden oluşmaktadır (Şekil 4.1);

- 1) Sperm üreten, sentezleyen ve androjenleri salgılayan testislerden;
- 2) Dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, vaza deferens, ejakülatuar kanal ve erkek uretrasının bir parçasından;
- 3) Salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besinler sağlayan aksesuar bezler seminal vezikül, prostat bezi ve bulbo üretral bezlerden;
- 4) Erektile dokudan oluşan çiftleşme organı penisten oluşur (13).

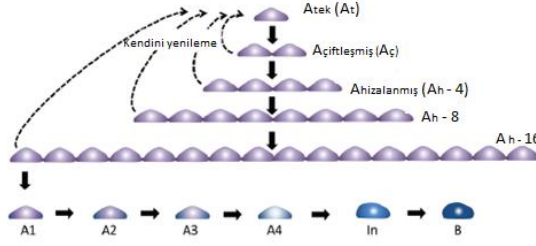


Şekil 4.1: Erkek genital sisteminin bileşenleri (14)

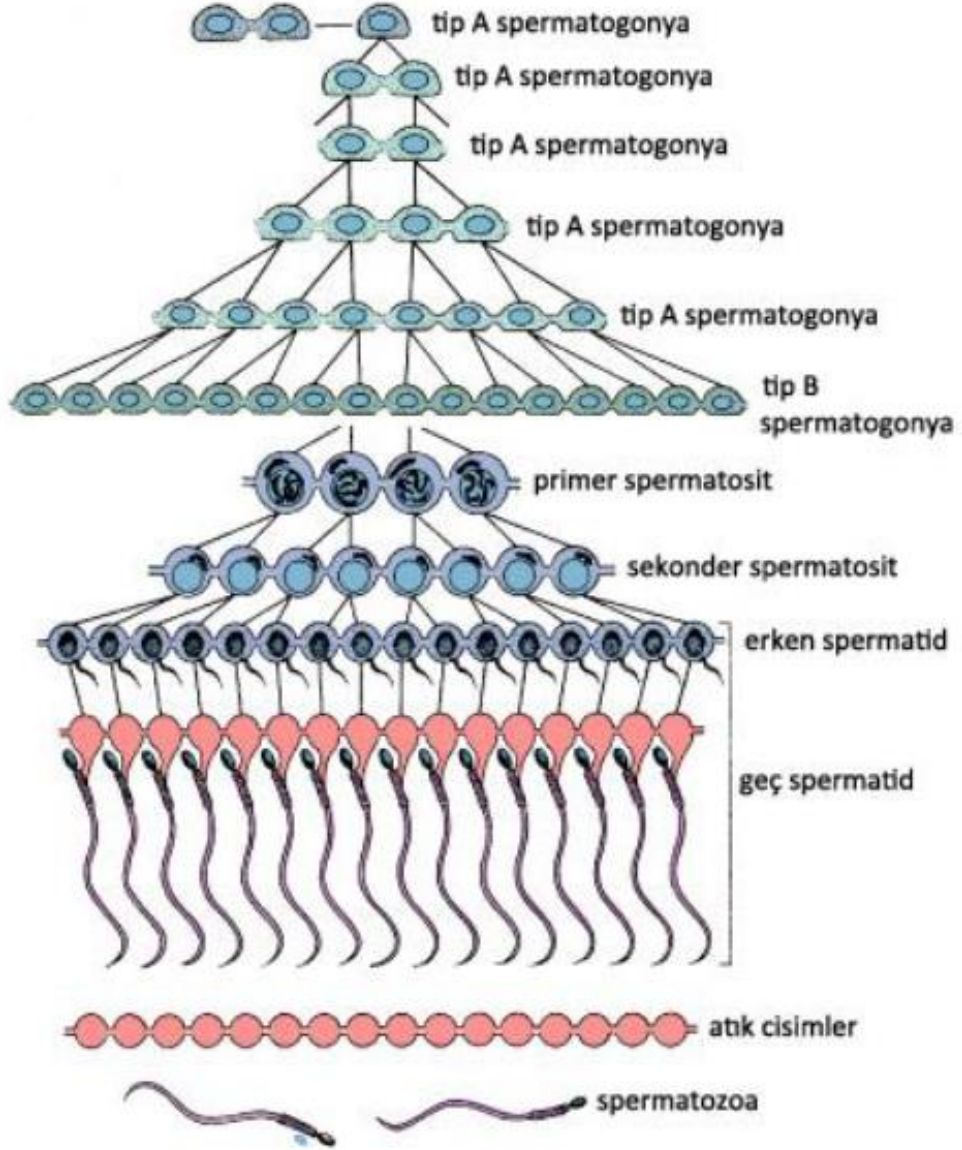
#### 4.1.1.Spermatogenez

Spermatogenez, erkek üreme organında spermatogonyumun birincil spermatosit, ikincil spermatosit ve spermatid evrelerini geçirmesiyle spermatozoanın meydana gelmesi sürecine denir. Karmaşık ve yüksek organizasyonlu bir süreç olup, germ hücrelerinin gelişimine ilişkin üç aşama içermektedir; mitoz (spermatogonyumların çoğalması), mayoz (spermatosit oluşumu ve DNA rekombinasyonu) ve spermiyogenez (spermatid farklılaşması) şeklinde olup, farklılaşmamış spermatogonyumların yüksek özellikteki sperme dönüşmesiyle sonuçlanmaktadır.

İnsanlarda, spermatogonyal kök hücreler tip A farklılaşmamış spermatogonyumlar olan A koyu ve A açık olmak üzere iki popülasyonu içerirler (Şekil 4.1.1). Tip A açık spermatogonyumlar mitoz bölünmeler geçirerek tip B1 spermatogonyumları oluştururlar. Tüm memelilerde tip B/B1 spermatogonyumlar mitoz bölünmeler geçirerek, mayoz bölünmenin başlangıcını temsil eden preleptoten spermatositleri oluştururlar. Preleptoten spermatositler mayozun profaz evresine girerler, leptoten, zigoten, pakiten ve diptoten spermatositlere dönüşürler. Mayozun en uzun süren evresi olan profazda kromozom kondensasyonu, genetik eşleme (rekombinasyon), primer spermatositlerin (44+XY) seminifer tübül bazalinden adlüminal kompartmana göçü gibi çeşitli değişiklikler gerçekleşir. Profaz evresini takiben mayoz bölünme hızlı bir şekilde tamamlanır ve 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren sekonder spermatositler oluşur. İkinci mayoz bölünme sonucunda spermatidlerin oluşumu gerçekleşir (15). Tip A spermatogonyumların kök hücre topluluğundan ayrılmalarını takiben çoğalıp farklılaşarak spermatidleri oluşturmalarıyla sitokinez tamamlanmış olur (Şekil 4.1.2). Hücreler bu farklılaşma süreci boyunca Sertoli hücrelerinin sitoplazma duvarına gömülü olarak bulunurlar. Sertoli hücreleri, seminifer tübüller boyunca gelişmekte olan germ hücrelerini besleme, koruma ve desteklemede görev alırlar (16).



Şekil 4.1.1: Spermatogonyal kök hücrelerin farklılaşması ve kendini yenilemesi (17).



Şekil 4.1.2: Spermatogonyal hücre serisinin şematik gösterimi (18).

Spermatidler spermiyogenez adı verilen oldukça farklılaşmış bir hücre işlemine uğrarlar. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır. Bu süreç üç aşamada gerçekleşmektedir;

- a. Golgi Fazı: bu aşamadaki spermatid sitoplazması; nukleus, Golgi kompleksi, mitokondriler, ribozom ve düz yüzlü endoplazmik retikulum içerirler. Hidrolitik enzimler Golgi aygıtından akrozomal veziküle aktarılır. İleride sperm hareketini sağlayacak olan flagellum bu aşamada oluşmaya başlar.
- b. Akrozomal Faz: oluşan akrozomal granül nukleusu kaplayacak şekilde yayılarak akrozomu meydana getirir. Distal sentriyol, mikrotübül çiftlerinden oluşan flagellumu meydana getirir. Sperm hareketi için gerekli olan mitokondriler, oluşan flagellumun proksimal kısmında toplanırlar ve sperm orta kısmını meydana getirirler.
- c. Olgunlaşma Fazı: tüm organellerin belirli bir düzen almasından sonra geriye kalan artık cisimcikler spermleşme aşamasında bırakılır ve sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Olgunlaşmış sperm semifer tübül lümeni boyunca salınırlar.

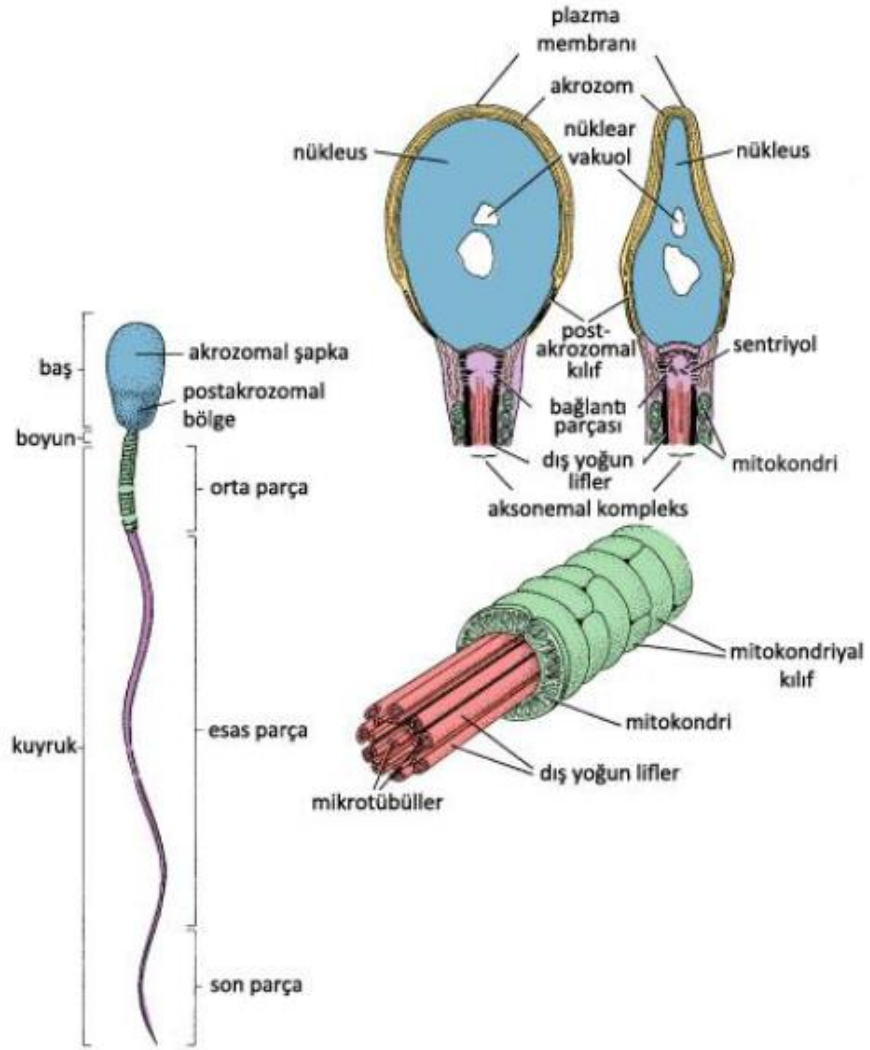
Sperm semifer tübül lümeninden pasif taşıma yoluyla, depolanıp işlev kazanacakları epididimise taşınırlar. Buradan da vas deferens yoluyla üretraya ulaşırlar. Spermatogonyumun olgun sperm haline dönüşebilmesi için gerekli olan süre yaklaşık 64 gündür.

Şekil 4.1.3'te gösterildiği gibi, olgun sperm baş ve kuyruk olmak üzere iki elemandan oluşur. Baş akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yassılaştırılmış yoğun bir yapıdır. Çekirdeğin anterior (ön) yarısını akrozom örter. Akrozomal enzimler sperm girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır. Kuyruk orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç parçaya bölünmüştür. Orta parçada hareket için gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondriler bulunur.

Spermiyogenez sırasında nukleusta meydana gelen ana değişimlerden birisi de somatik histonların arjinin ve lizin-zengin protoaminlerle yer değiştirdiğinde nuklear



yoğunlaşma oluşmasıdır. Meydana gelen bu olaylar sonucunda nukleusta transkripsiyon sona erer, sperm genomik DNA yapısını stabilize eder ve korur (19).



Şekil 4.1.3: İnsan sperminin şematik gösterimi (18).

#### 4.2.Dondurma (Kriyoprezervasyon)

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama); hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısıya kadar soğutulmuş, bütün biyolojik aktivitelerin durdurulması ve gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasını ifade eder.

Kriyoprezervasyon işlemindeki amaç, çok düşük ısıda canlı bir hücre veya dokunun, minimum hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır. Kriyoprezervasyon prosedüründe beş önemli aşama vardır: su kristalizasyonundan kaynaklanabilecek hücresel hasarı azaltan kriyoprotektanlarla ilk etkileşim, sıfır derecenin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma, saklama, çözme, dilüsyon ve kriyoprotektanların ortamdaki uzaklaştırılması, fizyolojik mikroçevreye geri dönüş ve ileri gelişim aşamalarıdır.

1940'larda gliserolün spermleri dondurmanın zararlı etkilerinden koruyabildiğinin tesadüfen keşfi, -79 °C' de kuru buz üzerinde saklanmış insan spermlerinin kullanılmasının yolunu açmış ve ilk kez insan spermi dondurma işlevi 1949' da Polge ve arkadaşları tarafından gliserol kullanılarak başarılmıştır (20).

Kriyoprotektan maddeler hücreyi dondurulma hasarından korurlar ve yüksek oranda H<sub>2</sub> (Hidrojen) bağlama özelliğine sahiptirler. Kriyoprotektanların koruyucu etkilerini göstermeleri için her zaman hücre içerisine alınmalarına gerek yoktur. Çünkü hücrede hasarın en yoğun ve hızlı gerçekleştiği yer, hücre zarıdır. Hücre içerisine giren ve hücre dışında kalarak etkinliğini gösteren iki tür kriyoprotektan sınıfı bulunmaktadır. Hücre içine girebilen koruyucu maddeler; gliserol, DMSO (Dimetil sülfoksit), ProH (Propilen glikol) dur. Hücrelerde meydana gelen buz kristalleri oluşumunu -40 °C' ye kadar düşürürler. Hücre dışında kalan koruyucu maddeler ise; monosakkaritler (glukoz, heksoz), disakkaritler (sükroz) ve trisakkaritler (raffinöz)' dir. Bu koruyucu maddeler hücre zarını osmotik basınç değişimlerine karşı korurlar ve hücrenin aşırı şişmesini önlerler.

Sperm kriyoprezervasyonu, infertileye neden olabilecek cerrahi operasyonların varlığında, testis hasarına neden olabilecek otoimmün hastalıklar, radyoterapi/kemoterapi gibi sitotoksik tedavi öncesinde spermlerin saklanarak fertilitenin korunması amacı ile kullanılabilir (21). İnsanlarda sperm kriyoprezervasyonu, fertilitite kliniklerinde ve yardımla üreme teknikleri merkezinde yaygın ve güncel bir uygulama olarak tedavide yerini almıştır.

Sperm kriyoprezervasyonu sperm yapısında ve işlevinde bir takım zararlı değişikliklere neden olmaktadır (22). Bunlar; motilitenin azalması, morfolojik

değişimler (23), membran bütünlüğü ve akışkanlığının kaybı (24), DNA fragmentasyonu (25) şeklindedir.

#### **4.3.Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)**

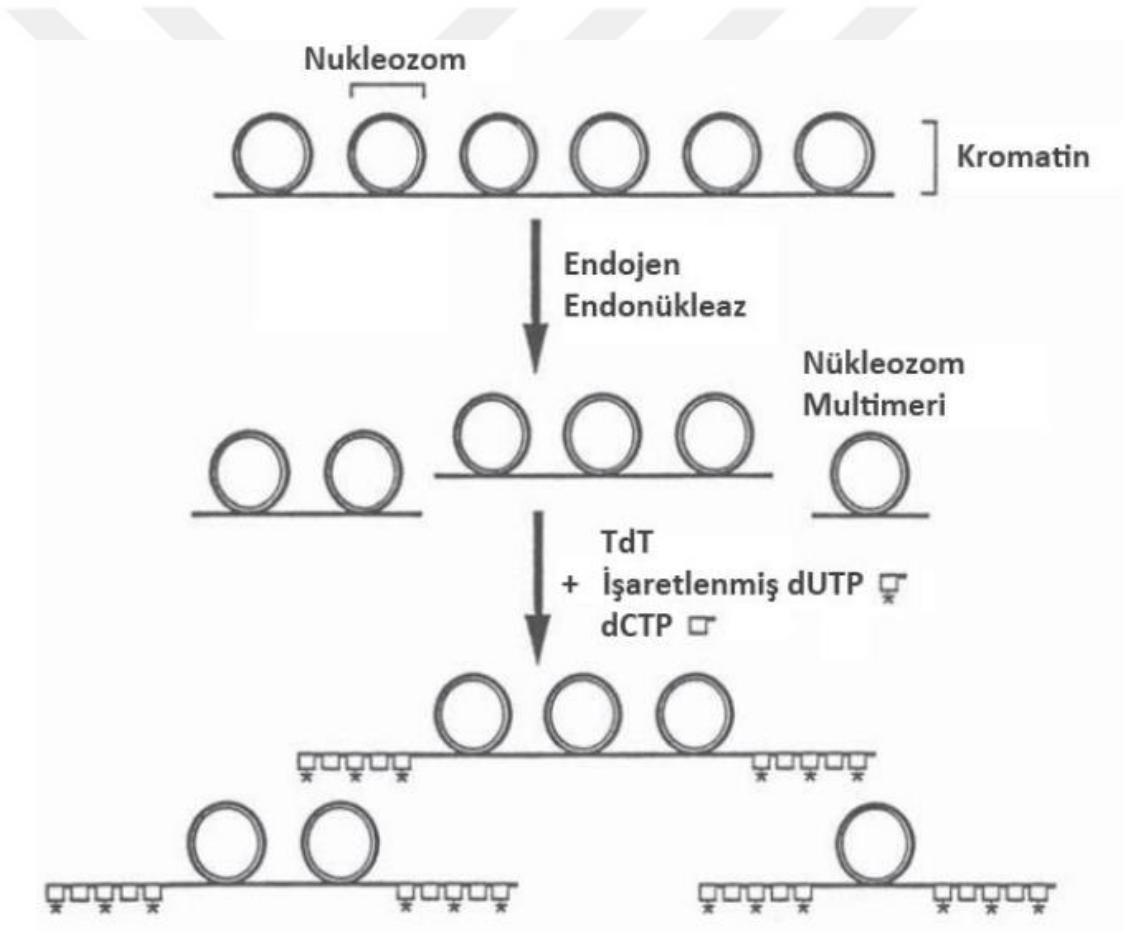
Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J. F. K. Kerr tarafından (26) nekrozdan (27), farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Apoptoz, kaspaz olarak adlandırılan sistein proteaz grubu aktivasyonunu ve hücrelerin ölümü için uyarılara bağlı karmaşık kaskadları içeren son derece koordineli ve genellikle enerji bağımlı bir süreçtir (3). Apoptozu tetikleyen fizyolojik ve patolojik uyarı ve durumlar çok çeşitli olmasına rağmen bütün hücreler aynı uyarıya cevap olarak ölürler. İlk olarak gerçekleşen hücre büzülmesinden sonra, kromatin parçalanması, membran kabarcıklaşması, nüklear yoğunlaşma ve son olarak fagosite edilen apoptotik cisimlere bölünmenin gerçekleştiği görülmektedir (28).

Apoptoz ve nekroz ardışık fakat birbirinden bağımsız meydana gelen süreçlerdir (28, 29). Nekroz genellikle hücrelere ilişkin geniş alanları etkileyen pasif ve kontrolsüz bir süreçtir, oysa ki apoptoz hücreleri kümeler halinde veya bireysel olarak etkileyen enerji bağımlı ve kontrollü bir süreçtir (3). Nekroza neden olan olaylar, hücre ve organel parçalanmasına neden olan membran geçirgenliğinin artmasında ve bunun sonucunda da sitoplazma ve çekirdek içeriğinin hücreler arasındaki boşluğa salınmasında ol oynar (30-32). Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması yangı olayına sebep olur. Apoptozda ise sitoplazmanın parçalanma sürecinde oluşan kabarcıklar plazma zarı ile korunmuş durumdadırlar. Bu kabarcıklar makrofajlar tarafından fagosite edilirler ancak nekrozda gerçekleşen yangısal olay gerçekleşmez.

Apoptoz sürecinde meydana gelen değişiklikler; fosfatidilserin çıkışı ve DNA fragmentasyonu ve apoptotik maddelerin oluşumudur (33). DNA fragmentasyonunun belirlenmesine ilişkin deneyler, apoptozla ilişkin endonükleaz parçalanma ürünlerini görselleştirmek için kullanılır (34). Sperm hücrelerinde meydana gelen apoptozun özellikleri; kromatin, mitokondri, nükleus ve plazma membranı anormalliklerinin

ultrastrüktüel olarak görülmesi, sitoplazmik vakuol ve apoptotik cisimlerin oluşumudur (4).

Apoptoz sürecinde meydana gelen DNA fragmentasyonunu göstermek için kullanılan yöntemlerden birisi TUNEL (Terminal deoxynucleotidly transpherase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) metodudur (Şekil 4.3.2). DNA parçalarının serbest 3'OH kısmı, biotin, digoxigenin ya da flourescein gibi nükleotidler vasıtasıyla modifiye edilmiş enzimatik işaretleyiciler ile belirlenebilir. Çeşitli problarla işaretlenen DNA fragmentleri ışık mikroskobu, floresan mikroskobu ve flow sitometri tarafından belirlenebilir. Bu yöntemle apoptotik hücrelerin yüzdelerini ölçmek mümkündür (35).



Şekil 4.3.1: Kırık kromatin yapısının TUNEL metodu ile işaretlenmesi (36).

#### 4.4.Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Serbest radikal bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip atom ya da molekül olarak tanımlanmıştır. ROT yüksek derecede oksijenlemiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır (37). Metabolik ve fizyolojik süreçlerde, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif mekanizmalar aracılığıyla organizmalarda zararlı oksidatif reaksiyonlar sonucu meydana gelir (5).

ROT, doymamış yağ asitleri, sülfhidril proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerle reaksiyona girerler, birçok hastalıkta örneğin; arterit, arteroskleroz ve çeşitli dejeneratif hastalıklarda etkili olurlar. Yüksek seviyelerdeki oksidatif strese karşı antioksidan proteinlerin düzenlenmesi başta olmak üzere gen ekspresyonlarını düzenlerler. Örneğin; karotid cisimlerde ‘oksijen sensörler’ mekanizmasına katılırlar. Apoptoz için zorunlu olmamakla birlikte, apoptoz öncesi etkileri bulunmaktadır (38).

Semende bulunan ROT kaynağı, lökositler ve spermatozoondur. Lökositler erkek genital sisteminde sürmekte olan enfeksiyon için bir gösterge olarak kabul edilir ve semendeki lökositleri epididim ve prostat oluşturmaktadır. Lökositler mikroorganizmalara karşı mücadele verirken ortama süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) salarlar ki bundan dolayı diğer ROS ve oksidanlarla reaksiyona girerek ya da dismutasyon ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali (OH) veya hipoklorid gibi diğer toksik maddelerin oluşmasına neden olurlar. ROT’un ikinci kaynağını spermatozoonun kendisi oluşturmaktadır. İnsan spermatozoonu endojen ROT’un az bir kısmını kontrollü bir şekilde oluşturma özelliğine sahiptir (39, 40).

ROT sitotoksitesi, üretilme ve yokedilme oranları arasındaki hassas denge sonucu belirlenmektedir. Bu dengedeki herhangi bir bozukluk hüresel zarara neden olmaktadır. Hücre ve hücre dışı koruma sistemleri (antioksidanlar) bu amaçla hizmet eden ve serbest radikallerin potansiyel toksik etkilerine karşı hücreyi koruyan mekanizmalardır (41, 42). Antioksidan koruma mekanizmaları primer ve sekonder koruma mekanizmaları olarak gruplandırılmaktadır. Primer koruma mekanizmaları antioksidan bileşikleri (E, A ve C vitamini, glutatyon ve ürik asit) ve antioksidan enzimleri içermektedir. Sekonder koruma mekanizmaları ise; lipolitik enzimler,

fosfolipazlar, proteolitik enzimler, DNA onarım enzimleri şeklinde sıralanmaktadır (43).

Spermatozoon ROT diğer hücrelere göre daha hassastır. Çünkü plazma membranları büyük oranda doymamış yağ asitlerini ve sitoplazmaları da düşük konsantrasyonlarda antioksidan enzimleri içerirler (6, 40). Spermatozoonda ROT toksisite mekanizması lipit peroksidasyonu ile başlar, motilitenin bozulmasıyla devam eder ve nükleer DNA hasarı oluşturur (6). Yüksek konsantrasyonda ROT üretimi lipit peroksidasyonu ve bozulmuş membran fonksiyonlarına neden olarak sperm metabolizmasını dolayısıyla morfoloji, motilite ve fertilitiyi olumsuz yönde etkileyerek erkek infertilitesinde önemli rol oynamaktadır (7, 44, 45).

#### **4.5.Leptin**

Leptin sözcüğü, Yunanca 'leptos' dan köken alır ve ince ya da zayıf anlamına gelmektedir (46). Kökeni yağ doku olup, ob geninin bir ürünüdür. Zhang ve ark. tarafından 1994 yılında tanımlanmış bir moleküldür (8). Leptin 167 aminoasit içeren, 16 kD molekül ağırlığında yağ hücresi olup birçok dokudan salgılandığı saptanan, plazmada belirli bir kan düzeyi oluşturan, kanda serbest veya proteine bağlı olarak taşınan bir polipeptiddir (8, 47).

##### **4.5.1.Leptinin tarihçesi**

1950' lerde Kennedy tarafından adipoz dokudan salgılanan ve vücut ağırlığını kontrol eden bir hormonun üretildiği ve bu hormonun vücuttaki adipoz dokunun yoğunluğuna bağlı olarak dolaşımda bulunduğu teorisi öne sürüldü (8). 1994 yılında J Fridman ve Y Zhang uzun süren yağ hücresi kültürü çalışmaları sonucunda ob-genini izole ettiler. Leptinin ob geni tarafından yağ hücrelerinde üretildiği ve plazmada belirli bir kan seviyesi oluşturduğu ilk defa aynı ekip tarafından bildirildi (47).

#### 4.5.2. Leptinin yapısı ve salınımı

İnsanlarda bulunan ob geni 7.kromozomun uzun kolunun 3. bölgesinde (7q31) bulunmakta, sıçanlarda ise 6 numaralı kromozomda bulunmaktadır (Şekil 4.5.2). ob/ob mutant farelerde mutajenik bir gen ürünü olarak tanımlanmıştır (48).

Leptin hormonu, reseptörleri (LEPR ya da OBR) yoluyla etki eder. OBR geni 1.kromozom üzerinde yer alır ve 1162 aminoasitten oluşan bir proteini kodlar (49, 50). Leptin reseptörleri Klas-1 sitokin ailesine mensup, hipotalamus başta olmak üzere diğer dokularda da bulunmaktadır. Leptin reseptörleri (ob/Ra, ob/Rb, ob/Rc, ob/Rf) ekstrasellüler, transmembran ve intrasellüler zincirden oluşmuştur (51). Toplam 6 reseptör tanımlanmıştır. Bunlar; OB Ra-b-c-d-e-f'dir. OB Re reseptörü hariç diğer 5 tanesi transmembranöz alana sahip olup sadece OB Rb (uzun leptin reseptörü) intrasellüler desenler içerir. OB Re ise çözünen bir reseptör şeklinde dolaşımda bulunur (52). OB Rb (uzun form) reseptörler sinyal iletme özelliğine sahiptirler ve en çok hipotalamusta, az miktarda akciğer, böbrekler, karaciğer, iskelet kası, kalp, pankreas, ince barsaklar, overler, testisler, yağ doku gibi daha birçok hücre ve dokuda bulunurlar (53). OB Ra (kısa form) reseptörler ise intrasellüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde görevleri çok az veya yoktur. Beyin kapillerleri ve plexus koroideusta OB Ra reseptörlerinin bol olarak bulunması, kısa form reseptörlerinin leptinin merkezi sinir sistemine taşınmasında önemli görevleri olduğunu düşündürmektedir (54). Leptin reseptörüne bağlandıktan sonra diğer sitokinler gibi JAK-STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) sinyal yolağını aktive eder ve daha sonra STAT ve MAP kinaz aktivasyonu yaparak etkisini gösterir (55).

Leptin hormonu yağ dokusu hücreleri tarafından üretilip, dolaşım sistemi içerisine iletilir (56, 57); ağırlıklı olarak beyaz yağ dokudan çok az miktarda da kahverengi yağ dokudan salgılanmaktadır. Etki merkezi hipotalamus olup, iştahı (besin alımı) azaltıcı yönde etki etmektedir (58). Leptin hormonu başlıca yağ dokudan salınmakla beraber plasenta, mide epitelyumu ve hipofiz bezinde de az miktarda üretildiği gösterilmiştir (59, 60).

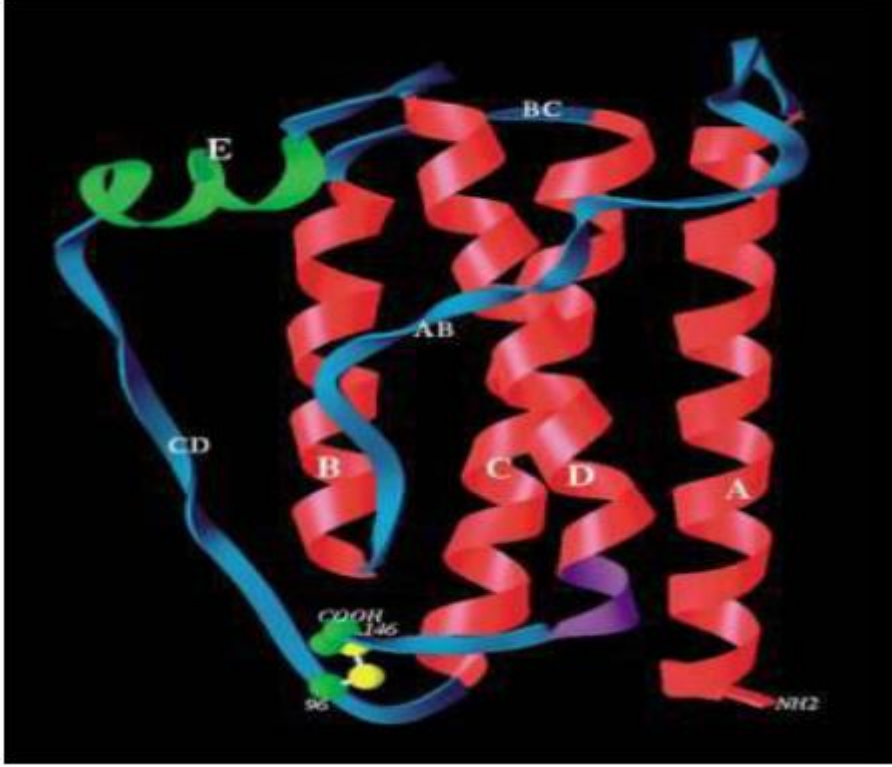
Leptin, kanda serbest ve proteine bağlı olarak yer almaktadır. Obez bireylerde yapılan bir çalışmada kandaki leptin seviyelerinin yüksek oranda serbest leptine ait olduğu gösterilmiştir (61, 62).

Leptin pulsatif olarak salınan bir hormondur ve dolaşım sistemindeki yarı ömrü yaklaşık 30 dakikadır. İnsanlarda diurnal bir ritme sahip olan leptin öğleden sonraları düşük düzeylerde seyrederken, sabah erken saatlerde yüksek düzeyde bulunur (63).

Leptin hormonu vücutta birçok sistemin düzenlenmesinde görev alır (8). İlk olarak tokluk faktörü olarak bilinen leptinin; hipotalamus, kalp, plasenta, kas, pankreas, karaciğer, akciğerler, testisler, overler, ince bağırsak ve dalakta reseptörlerinin bulunmasıyla da sadece enerji düzenlemesinde görevli olmadığı gösterilmiştir (64-66).

Leptin düzeyi vücut kitle indeksi (VKİ) veya vücut yağ indeksi tarafından belirlenmektedir (67, 68), fakat serum leptin seviyesini etkileyen birçok değişken bulunmaktadır. İnsülin (69), glukokortikoidler (70) ve prolaktin (71) leptin salınımını uyarırken; troid hormonları (72), büyüme hormonu (73), somatostain (74), serbest yağ asitleri (75), uzun süreli soğuğa maruz kalma (76) ve katekolaminler (77) leptin salınımını baskılayan faktörlerdir.



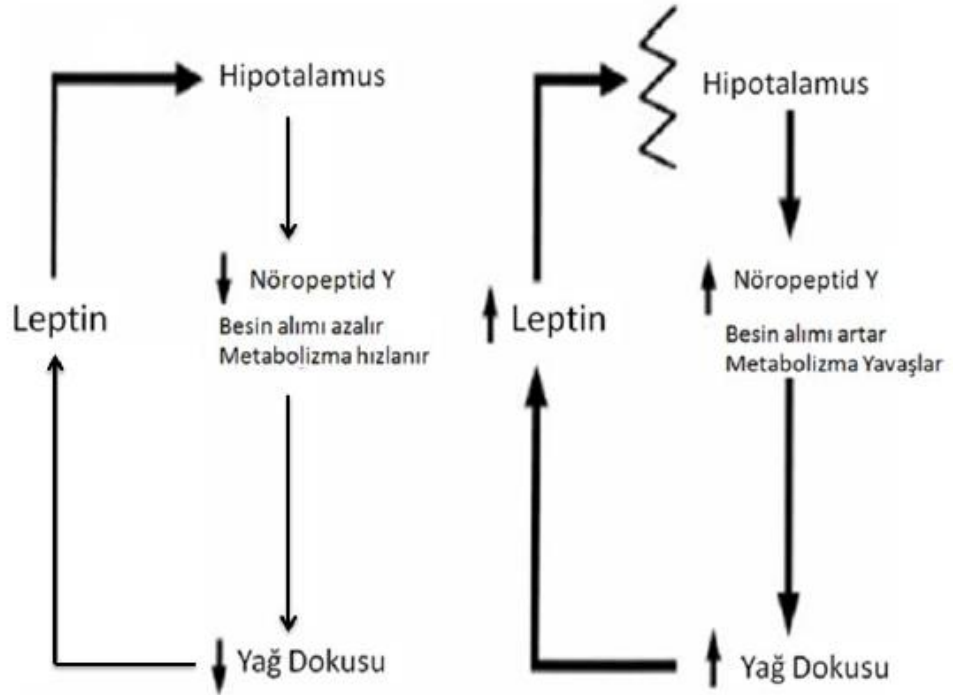


Şekil 4.5.2: Leptinin yapısı (78)

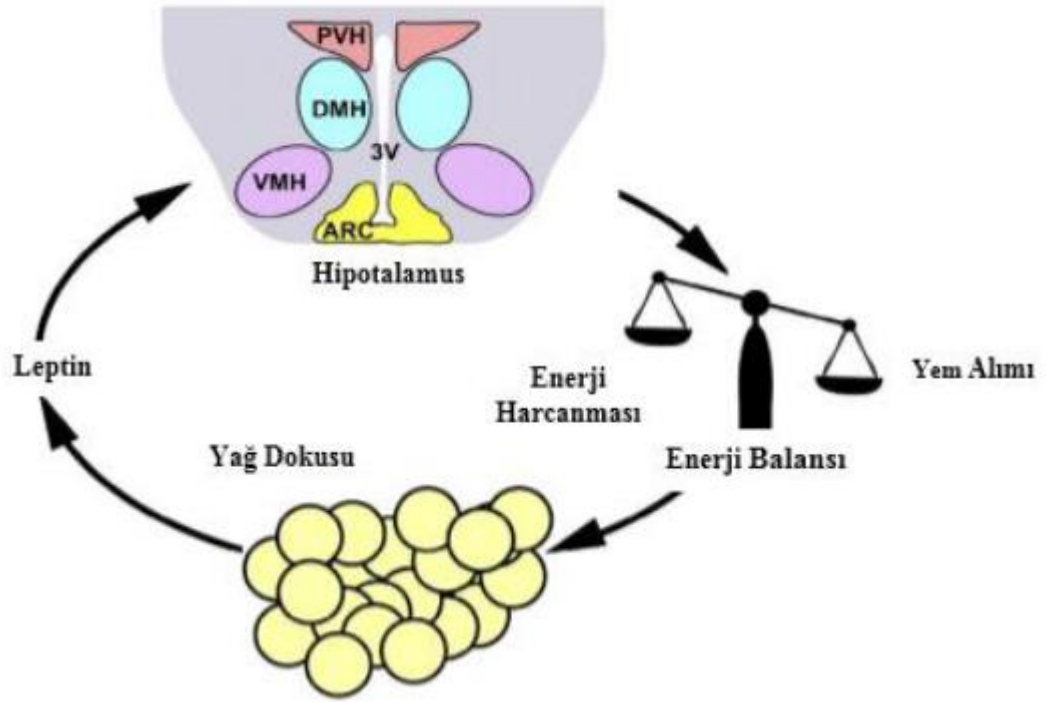
#### 4.5.3. Leptin etki mekanizması

Leptinin ana etki mekanizması (Şekil 4.5.3.1) birçok hipofizer organın düzenlenmesinde rol alan ve asıl etkisi iştahı arttırmak olan nöropeptid-Y'nin arkuat nükleustan salınımı ve ekspresyonunu inhibe etmektir (9). Leptin, metabolik etkilerini, santral sinir sistemi ve periferik dokularda bulunan kendine özgü reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir (79). Leptin eksikliği ile leptin reseptör eksikliği benzer gibi görülse de yapılan çalışmalarda leptin reseptör eksikliğinin konjenital olduğu bildirilmiştir (80). Leptin reseptör eksikliğine leptin eksikliğinden daha sık rastlanır ve erken yaştaki obezitenin en az % 3'ünden sorumludur. Leptin reseptörlerinin ObRa ve ObRc formları, leptinin kan-beyin bariyerini geçmesine yardım ederler. Bu reseptörlerin eksik olması durumunda, leptin taşınımı önemli derecede zarar görür. Leptin rezistansı, obez bireylerin çoğunda görülen leptin etkisine zıt bir durumdur. Leptin rezistansı: i)leptinin kan-beyin bariyerinden geçişinin bozulması ve ii)leptin reseptör bozulması olarak sınıflandırılabilir. Leptin

rezistansı sonucunda daha fazla leptin ihtiyacı karşılığında daha fazla yağ birikmesi gibi kötü bir döngü başlayabilir (81). Hipotalamusta bulunan ARC (arcuate nucleus), leptin sinyalleri için birincil merkezdir. Bu merkezde iki nöron sınıfı bulunur: i) POMC (Pro-opiomelanocortin), kokain, amfetamin gibi maddeler, bunlar yiyecek alımını inhibe eder, ii) NPY (Neuropeptide Y), AGRP (Agouti-Related Protein) gibi maddeler, bunlar iştahı açarak yemek alımını düzenler. Leptin reseptörleri bu kısımlarda yerleşik halde yer alırlar. Leptin reseptörünün sinyal yolağında stoplazmik protein kinaz (JAK-2) ile sinyal aktarıcı ve transkripsiyon aktive edici (STAT) gibi protein yapıları görev alır. Reseptörün ObRb hücre içi uzantısı, sinyalin başlamasına direkt olarak etki eder. Leptin reseptöre bağlanınca, reseptörün hücre içi uzantısı JAK2 tarafından fosforlanarak STAT proteinlerinin ilgisini çeker. Daha sonra reseptörün fosforlanmış iç kısmı, STAT proteini ile birleşip hücre duvarından ayrılarak nukleusa girer. Bu yapı nukleusta hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (82).



Şekil 4.5.3.1: Leptinin Ana Etki Mekanizması (83)



Şekil 4.5.3.2: Leptinin Etki Mekanizması (83)

#### 4.5.4. Leptin ve üreme

Leptin her iki cinstede üreme sistemi hormonlarının (östrojen, progesteron ve testosteron gibi) salgılanmasını aktive eder. Kadınlarda ilk östrojen siklusu, bölünmenin hızlanması, lüteinizan hormon (LH) ve östrojen seviyelerinde değişiklikler leptin tarafından düzenlenir (84). Leptinin plasenta tarafından da üretildiğinin ve leptin reseptörlerinin plasenta ve yumurtalıklarda da eksprese edildiğinin anlaşılması (10, 11), leptinin üreme sistemi üzerinde de önemli etkilere sahip olabileceğini düşündürmüştür. İnsanlarda düşük leptin düzeylerinin veya diüurnal ritminin bozulmasının hipotalamik hipogonadizm ve amenore ile sonuçlandığı görülmüştür (85). Hipotalamustan GnRH, hipofizden FSH, LH ve prolaktin salınımını aktive ettiği gösterilen (86) leptinin bu etkisini nöropeptid Y üzerinden gösterdiği düşünülmektedir.

#### **4.5.5. Testiste Ob-R ve leptin ekspresyonu**

1997 yılında sıçan testisinde Ob-R ekspresyonu ilk kez tanımlanmıştır. Araştırmacılar, in situ hibridizasyon yöntemiyle Leydig hücre ve spermelerde Ob-R mRNA seviyelerini göstermişlerdir. Ob-Ra ve Ob-Rb ekspresyonları ileri yaşlarda artan benzer ekspresyon göstermişlerdir. Araştırmacılar, Ob-R mRNA seviyelerinin erken embriyonik testislere karşılık yetişkin embriyo testislerinde daha yüksek düzeylerde olduğunu bulmuşlardır.

Leptin ekspresyonu, fare germ hücrelerinde hücre tipi ve aşamalarına spesifik olarak immünohistokimya teknikleri tarafından gösterilmiş ve farelerin Leydig hücrelerinde tespit edilememiştir. Gelişim aşamaları boyunca testiküler kök hücrelerde üretilen leptinin yenilenmeye aracılık etmek için otokrin bir şekilde hücreleri etkilediği görülmüştür (12).

## **5.METOT VE MATERYAL**

### **5.1.Denekler**

Çalışmamız için, aktif üreme döneminde olup, 20-50 yaş arası, herhangi bir sistemik hastalık, çocuk yaşlarda ateşli hastalık, testis travması ve kriptorşidizm gibi üreme fonksiyonlarını etkileyen bir hastalık geçirmemiş, kronik ilaç-madde kullanımı olmayan (antidepresan, böbrek, tansiyon ilaçları, sigara, alkol), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) laboratuvar kılavuzuna göre (World Health Organisation 2010) normozoospermik olan 30 kişiden örnek alınmıştır. Semen örnekleri, dondurma işlemi öncesi ve dondurma-çözme sonrası olmak üzere iki şekilde değerlendirilmiştir.

Normozoospermi hastalarından alınan semen örnekleri 37 °C’ de 30 dk. inkübe edilerek örneklerin likefiye olmaları sağlanmıştır. Likefikasyon işleminden sonra her bir semen örneği üç hacme ayrılmıştır; hacimlerden biri leptin, ikincisi; ROT değerlendirmesi için kullanılmıştır, son hacim ise dondurma-çözme işlemi sonrası yapılacak olan incelemeler için kullanılmıştır.

Semen örnekleri 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında steril kaplara mastürbasyon yöntemiyle alınmıştır. Deneklerden semen örneği alınmadan önce ‘Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu’ ile imzalı onayları alınmıştır. Çalışma için İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan etik kurul onayı (10840098-604.01.01-E.2304) alınmıştır.

### **5.2.Motilite ve Konsantrasyon**

Sperm motilitesi Makler sayma kamarası (Sefi Medical Instr.) kullanılarak dondurma işlemi öncesi ve sonrası işlemler ışık mikroskobu düzeyinde değerlendirilmiştir. Her bir spermin hareketi ileri hareket (Progresif Motilite;PR), yerinde hareket (Nonprogresif Motilite;NP), hareketsizlik (İmmotilite;IM) şeklinde DSÖ laboratuvar kılavuzuna uygun olarak değerlendirilmiştir (WHO 2010). Sperm konsantrasyonu belirlenmesi de Makler sayma kamarası kullanılarak yapılmış, 20-200 milyon/ml. aralığında sperm sayısına sahip bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.



Steril idrar kabı



Makler kamarası



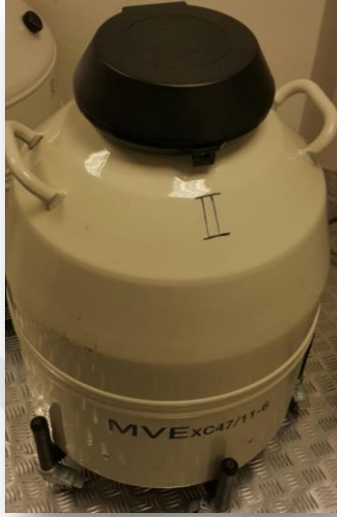
Faz-Kontrast mikroskobu

### 5.3.Sperm Dondurma-Çözme İşlemi

Dondurma işlemi için semen örneği ve kriyoprotektan (90128- Irvine Scientific Freezing Medium) 1:1 oranında (2 dk içerisinde) karıştırılmıştır ve steril tüpler (Cryo Vial, T3082A) içerisine toplam hacim 1 ml. olacak şekilde alınmıştır. Üzerlerine hasta isimleri ve numaraları yazılan tüpler, sırasıyla, oda sıcaklığında 8 dk ve sıvı azot seviyesinden 15 cm yükseklikteki azot buharında 20 dk tutulduktan sonra sıvı azot tankı içerisine (-196 C ) yerleştirilmiştir.

Çözme işlemi, tüpler sıvı nitrojenden çıkartılıp oda sıcaklığında ve sıcak su muamelesi ile yapılmıştır. Örnek tamamen çözüldükten sonra üzerine yıkama

solüsyonu (HTF/HEPES ART-1023) eklenip, 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak kriyoprotektan uzaklaştırılmıştır. Çözme işlemi sonrası elde edilen sperm örnekleri motilite, morfoloji, DNA fragmantasyonu, leptin ve ROT değerlendirmeleri için kullanılmıştır.



Sıvı azot tankı



Cryo Vial

#### 5.4. Işık Mikroskopi İncelemesi

Işık mikroskopik morfolojik inceleme, Spermac Stain kit (FertiPro N.V., Belgium) ile boyama sonrası yapılmıştır. Sperm örneğinden lam üzerine 10 µl damlatılmış, lamelle yayılıp havada kurutulmuştur. Kurutulan lam, kit içerisinde bulunan sırasıyla fiksatifin, katyonik ve anyonik boyaların içinde birer dakika bekletildikten sonra tekrar havada kurumaya bırakılmıştır. Spermac boyası ile boyanan preparatlar Olympus BX51 faz kontrast mikroskobu kullanılarak 1000x büyütmede Kruger strick kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Her bir örnek için 100 sperm hücresi sayılmış; baş, boyun, stoplazma, kuyruk bölgelerindeki bozukluklar kaydedilmiş ve ışık mikroskobu (AxioZoom V16) ile fotoğraflanmıştır.

### 5.5.DNA Fragmantasyonu Tayini

DNA fragmantasyonu TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak incelenmiştir. Semen örneği üzerine 4-5 ml sperm yıkama mediumu eklenmiş ve 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra pellet ve süpernatant olmak üzere iki faz elde edilmiş, süpernatant kısım atılmıştır. Geriye kalan pellet sperm yıkama mediumu ile konsantre edilmiştir. Konsantre örnek iki lam üzerine yayma preparat yapılarak kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan lamlar 1 saat Paraformaldehit Asit (PFA) içerisinde fikse edildikten sonra 3x5 dk. Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkama işlemi yapılmıştır. TUNEL kitindeki enzim solüsyonundan 5 µl, etiketleme solüsyonundan 45 µl karıştırıldıktan sonra her lam üzerine 25'er µl damlatılıp lamelle kapatılmıştır. Işık almayacak şekilde 37 °C'de 1 saat tutulan lamlar üzerindeki lameller kaldırıldıktan sonra PBS ile yıkanmıştır. Lamalar nükleusların görünmesi amacıyla 5 dk. DAPI nükleus boyası ile boyanmış ve lamel ile kapatılmıştır. Konfokal mikroskop (Zeiss LSM 780 NLO) ile 40x büyütmede 100 sperm hücresi sayılarak DNA fragmantasyonu olan hücreler 'TUNEL pozitif' olarak kaydedilmiş ve fotoğraflanmıştır.

### 5.6.Geçirimli Elektron Mikroskobu İncelemesi

Elektron mikroskobik incelemeler için alınan semen örneklerine likefaksiyondan sonra yıkama solüsyonu eklenerek 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve pelletin üzerinde kalan süpernatant kısmı atılmıştır. Oluşan pellete % 2,5' luk 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) gluteraldehit (Merck Millipore, 354400) fiksasyonu içerisinde 4 °C'de 4 saat süreyle immersiyon fiksasyonu yapılmış, tamponda yıkamadan sonra, % 0.1' lik Osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) (EMS Diasum, 19160) ile 1 saat postfiksasyon yapılmıştır. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidre edilmiş ve propilen oksitten geçirilerek sırasıyla 1:1, 1:2 ve 60 °C'deki etüvde saf epona gömülmüştür. Doku takibi aşaması, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Medipol Üniversitesi REMER bünyesinde bulunan ultramikrotom cihazında (Leica EM UC7) alınan yarı ince



kesitler (1 mikron) toluidin mavisi ile boyanmıştır. 60 nm. kalınlığında alınan ince kesitler, bakır gridler üzerine alınarak uranil asetat, kurşun sitrat ile kontrastlama yapılmıştır. Kontrastlama işlemi, Marmara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Kontrastlanan gridler, baş, boyun ve kuyruk değişiklikleri açısından Cerrahpaşa Tıp Fakültesi bünyesinde bulunan elektron mikroskopunda (JEOL SX TEM) incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### 5.7.ELISA ile Leptin Analizi

ELISA deneyi, Human Leptin (LEP) ELISA Kit (Shangai Yehua Biological Technology Co.) kullanılarak yapılmıştır. Standart solüsyon dilüsyonları 5.7'deki gibi konsantrasyonları kademeli olarak azalan 5 tüp şeklinde hazırlanmıştır.

Tablo 5.7: Standart solüsyon dilüsyonları

800ng/ml	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard diluents
400ng/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard diluents
200ng/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard diluent
100ng/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard diluent
50ng/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard diluent

Boş kuyucuklara, örnek, streptavidin-HRP ve biotin ile işaretli anti LEP antikorunu ile A&B kromojen bileşikler ve stop solüsyonu eklenir. Herbir basamak uygulaması aynıdır. Standart solüsyon kuyularına, 50 µl standart solüsyon ve 50 µl streptomisin-HRP eklenir (standartlar içerisinde biotin antikorları birleştirilmiş bu yüzden biotinsiz antikorlar eklenmiştir). Örnek kuyucukları test edilmiş; 40 µl örnek ve sonra 10 µl LEP antikorunu ile 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir. Sonra kuyucuklar sızdırmaz kapak membranları ile kaplanmış, yavaşça sallanarak karıştırılmıştır. Örnekler 37 ° C de 1 saat inkübe edilmişlerdir. Yıkama işlemi için, sızdırmaz kapak membranı dikkatlice uzaklaştırılıp, sıvı akıtılmış ve geri kalanı distile su ile çalkalanmıştır. Yıkama solüsyonu ile dolu diğer kuyular 30 saniye bekletilip sonra silkelenmiştir. Bu prosedür 5 kere tekrarlanmış sonra blotlama yapılmıştır. Renk

oluşumu için; önce herbir kuyuya 50 µl kromojen bileşik A ve sonra herbir kuyucuğa 50 µl kromojen bileşik B eklenmiştir. Yavaşça sallanarak karıştırılmıştır. Işık oluşumu için ışıksız bir ortamda 37 ° C de 10 dk. inkübe edilmiştir. Stop reaksiyonu için herbir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir (anında hızlı bir şekilde maviden sarıya renk değişimi olur). Son olarak, absorbans değerleriyle uyumlu ve standart konsantrasyonlara göre, standart eğri doğrusal regresyon dengesi hesaplanmıştır. Örneklerin absorbans değerlerine göre denk (uyumlu) örneklerin konsantrasyonları hesaplanıp, istatistiksel yöntem ile veriler elde edilmiştir.

### **5.8.Semende Total Oksidan Tayini:**

Total antioksidan tayini serumda kolorimetrik olarak Erel tarafından geliştirilen metodla ölçülmüştür (92).

**Prensip:** Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suda çözünür ve Fe<sup>2+</sup> açığa çıkar. Serumda bulunan oksidanlar Fe<sup>2+</sup>'nin Fe<sup>3+</sup> e yükseltgenmesini sağlar. Kullanılan X-orange reaktifi Fe<sup>3+</sup> ile renkli bir kompleks verir. Oluşan rengin şiddeti; total oksidan miktarı ile orantılıdır. 658 nm'de absorbans ölçülür. Standart olarak kullandığımız çözeltinin absorbans molarite verileri kullanılarak, numunenin total oksidan molaritesi hesaplanır.

### **Kullanılan Reaktifler**

Hazırlanan Fox solüsyonun 225 ml'si reaktif 1'in hazırlanması için 25 ml'si ise reaktif 2'nin hazırlanması için kullanılır. Reaktif 1'in hazırlanması için 225 ml Fox solüsyonunun içine 150 mM D-Sorbitol+25µM X-orange ilave edilir.

**Reaktif 1:** Fox solüsyonu: 140 mM NaCl ve 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerir.

**Reaktif 2:** 25 ml Fox solüsyonu içine 10 mM 4-Hidroksibenzoik asit + 5 mM Amonyum Fe<sup>2+</sup>SO<sub>4</sub> ilave edilir.

**Standart:** 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart olarak hazırlanır.

Reaktiflerin hazırlanmasından sonra tablodaki deney prosedürü takip edilir.

Tablo 5.8: Reaktiflerin hazırlanması.

	<b>Reaktif I (µL)</b>	<b>Reaktif II (µL)</b>	<b>Standart (µL)</b>	<b>Serum (µL)</b>
<b>Numune</b>	112,5 µL	5 µL	-	17,5 µL
<b>Standart</b>	112,5 µL	5 µL	17,5 µL	-
<b>Kör</b>	112,5 µL	5 µL	-	-

5.8'de belirtilen miktarlarda çözelti ve örnekler 96'lık platelere pipetlendi ve SpektraMax Mikroplate Spektrofluorometre cihazında spektrofotometrik olarak 658 nm'de ölçüm yapıldı. Numunelerin Total Oksidan Molariteleri ise aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Numunelerin Total Oksidan Molaritesi} = \left( \frac{\text{Numunenin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \right) \times \text{Standartın Molaritesi}$$

### 5.9.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı kullanılarak yapılmıştır. Dondurma öncesi ve sonrası motilite, morfoloji, DNA fragmentasyonu, ROT ve leptin seviyelerinin karşılaştırmaları One Simple Test kullanılarak yapılmıştır. Seminal leptin seviyeleri ve semen parametreleri (motilite ve DNA fragmentasyonu) arasındaki korelasyon ise Pearson ve Linear regresyon testi kullanılarak yapılmıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 6.BULGULAR

### 6.1.Motilite ve Konsantrasyon

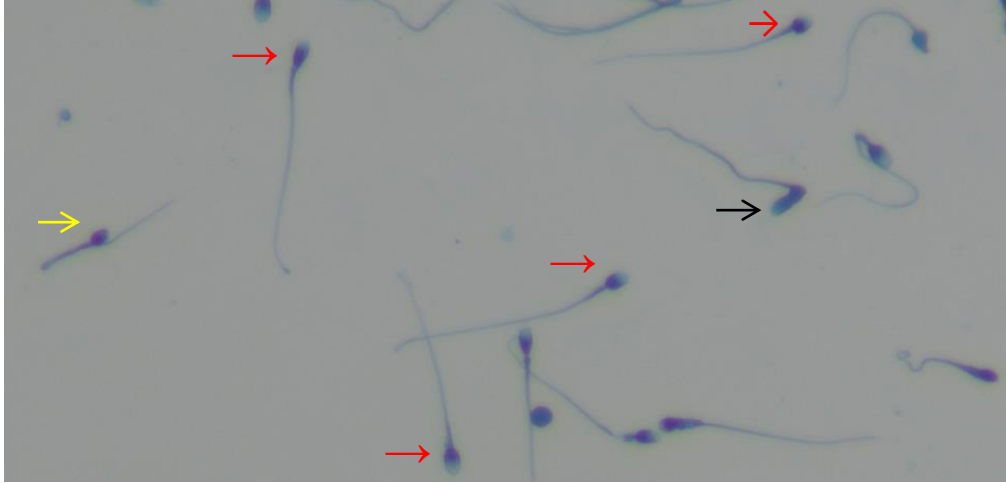
DSÖ laboratuvar kılavuzuna göre yapılan motilite değerlendirmesinde, dondurma işlemi öncesi 'a+b' toplam motilite oranı %54,83 ± 8,89 iken dondurma-çözme işlemi sonrası 'a+b' toplam motilite oranı %42,90 ± 12,59 olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında dondurma öncesi ve dondurma-çözme sonrası olmak üzere motilite oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) bir azalma olduğu görülmüştür (Tablo 6.1).

Tablo 6.1: Dondurma işlemi öncesi ve sonrası motilite oranı.

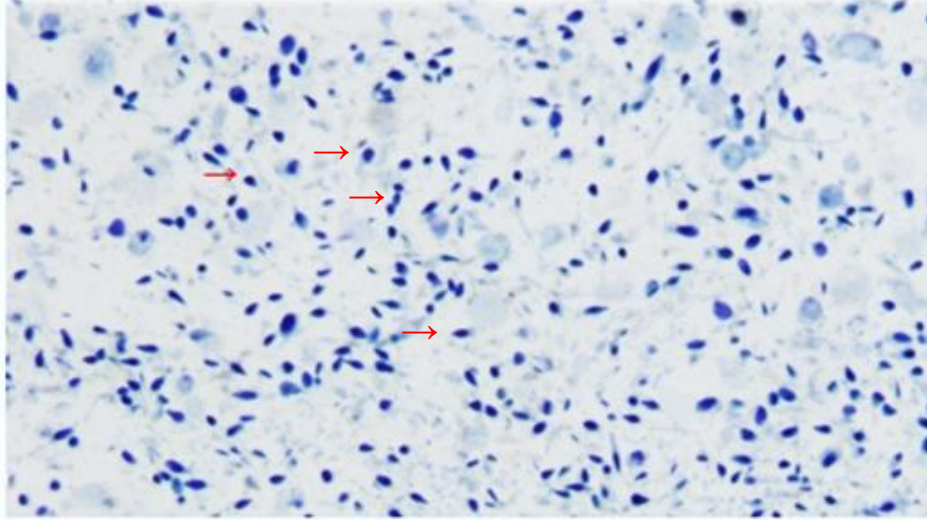
	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p
Dondurma işlemi öncesi motilite oranı	30	54,83	8,894	1,624	<b>,000</b>
Dondurma-çözme sonrası motilite oranı	30	42,90	12,590	2,299	<b>,000</b>

### 6.2.Işık Mikroskopik Bulgular

Morfolojik değerlendirme Spermac ile boyama yapıldıktan sonra yapılmıştır. Dondurma işlemi öncesi spermelerde çok sayıda normal morfolojili spermin yanı sıra, az sayıda akrozomal bozukluğu, boyun kırığı ve kuyruk anomalisi olan spermeler de gözlenmiştir (Şekil 6.2.1 ve 6.2.2).

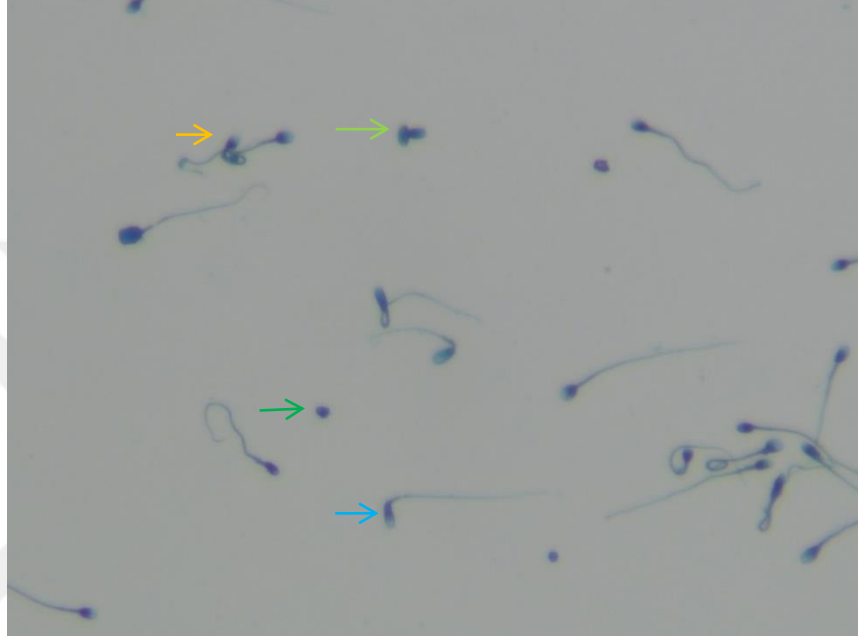


Şekil 6.2.1: Dondurma işlemi öncesi normozoospermik hastalarda normal morfolojide olan sperm ve morfolojik bozuklukları olan az sayıda sperm görülmektedir. Normal morfolojideki sperm (→), baş ve boyun hasarı olan sperm (→), kuyruk hasarı olan sperm (→). Spermac-stain boyası. (x320)

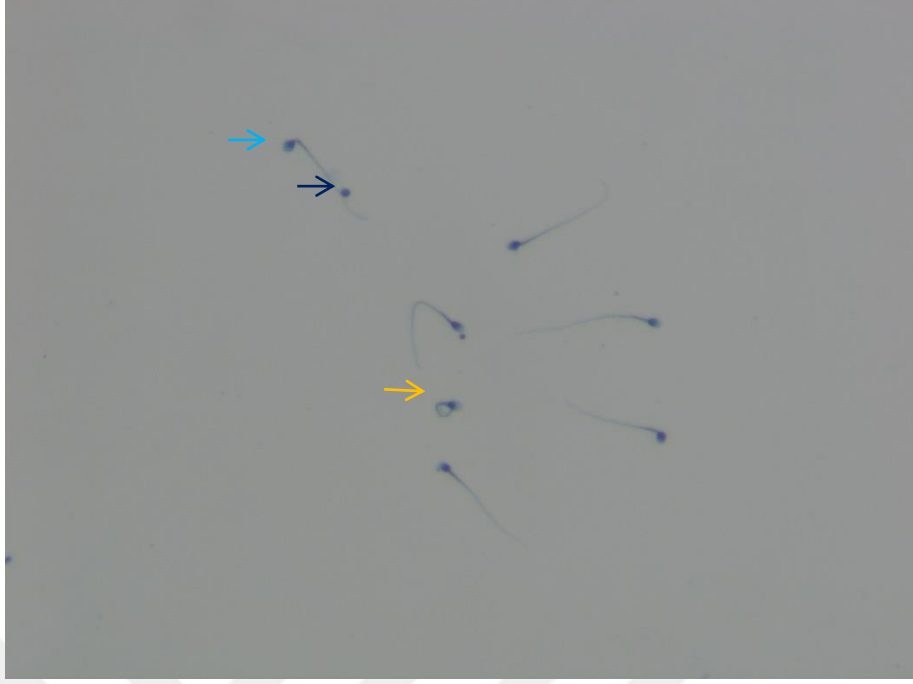


Şekil 6.2.2: Dondurma işlemi öncesi normozoospermik hastaların yarı-ince kesitlerdeki normal morfolojideki spermeleri görülmektedir. Normal morfolojideki sperm (→). Toluidin mavisi boyası. (x410)

Dondurma işlemi sonrası çözölen spermelerde normal morfolojiye sahip spermelerin sayılarında önemli ölçüde azalma gözlenirken, çok sayıda baş anomali olan spermeler, kuyruğu kopmuş ya da kıvrılmış spermeler ve sitoplazmik damlacıklara sahip olan spermeler gözlenmiştir (Şekil 6.2.3 ve 6.2.4).



Şekil 6.2.3: Dondurma işlemi sonrası normozoospermik hastaların az sayıda normal morfolojili olan spermeleri bulunmaktadır. Kuyruğu kopmuş olan sperm (→), kıvrılmış kuyruğu olan sperm (→), boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren sperm (→), boyun kırığı olan sperm (→). Spermac-stain boyası. (x320)



Şekil 6.2.4:Dondurma işlemi sonrası normozoospermik hastaların az sayıda normal morfolojili olan spermeleri bulunmaktadır. Boyun kırığı olan sperm ( → ), baş anomalisi olan sperm ( → ), kıvrılmış kuyruğu olan sperm ( → ). Spermac-stain boyası. (x410)

### 6.3.Işık Mikroskopik Değerlendirmenin İstatistiksel Analizi

Dondurma öncesi normal morfolojili sperm oranları ile dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen normal morfolojideki sperm oranları karşılaştırıldığında düşüş olduğu görülmüştür. Dondurma işlemi öncesi normal morfolojili spermelerin oranı %48,50 ± 22,08 iken dondurma-çözme sonrası normal morfolojideki spermelerin oranı % 16,93 ±14,04 olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında dondurma öncesi ve dondurma-çözme sonrası olmak üzere morfolojik hasar oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bir azalma olduğu görülmüştür (Tablo 6.3).

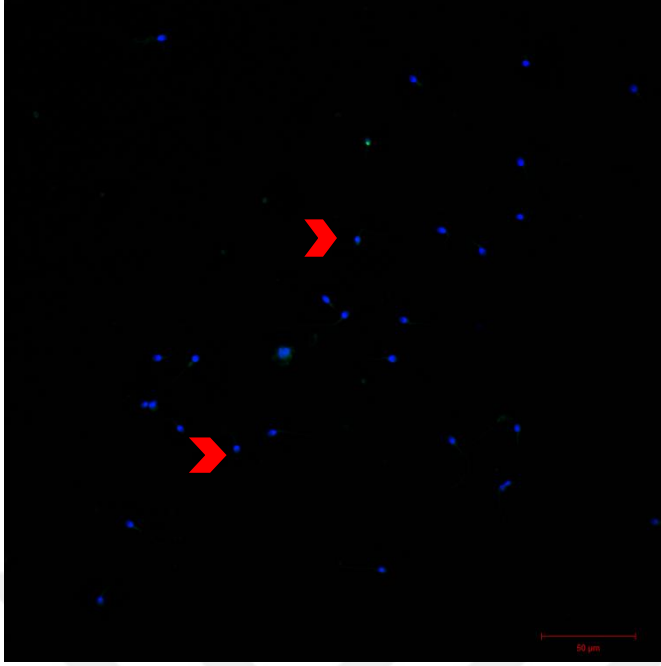
Tablo 6.3: Dondurma işlemleri öncesi ve sonrası normal morfolojide bulunan sperm oranı.

	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p
Dondurma işlemleri öncesi normal morfolojili sperm oranı	30	48,50	22,083	4,032	<b>,000</b>
Dondurma-çözme sonrası normal morfolojili sperm oranı	30	16,93	14,042	2,564	<b>,000</b>

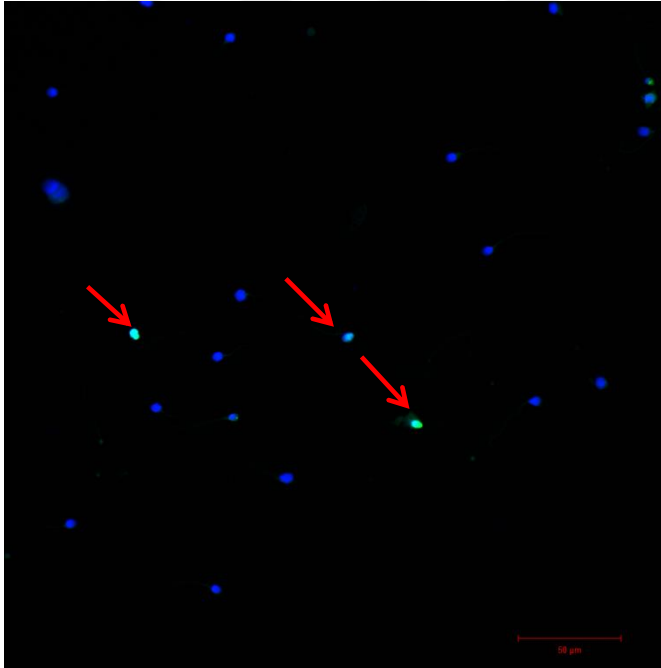
#### 6.4.DNA Fragmantasyonu Bulguları

Dondurma işlemleri öncesinde az sayıda spermde TUNEL pozitif hücreler yeşil floresan olarak görülmüştür. TUNEL negatif olanlar DAPI ile mavi floresan olarak görülmüşlerdir (Şekil 6.4.1 ve 6.4.2). 1 aylık dondurma işlemleri sonrası çözölen spermelerde, dondurma işlemleri öncesine oranla TUNEL pozitif sperm oranında bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 6.4.3 ve 6.4.4).





Şekil 6.4.1: Dondurma işlemi öncesi spermelerde çok sayıda TUNEL negatif ( ➤ ) spermeler mavi floresanla gözlemlenmiştir. DAPI boyası, TUNEL kiti. (x40)



Şekil 6.4.2: Dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermelerde çok sayıda TUNEL pozitif ( ➤ ) spermeler yeşil floresanla gözlemlenmiştir. DAPI boyası, TUNEL kiti. (x40)

### 6.5.DNA Fragmantasyonu Bulgularının İstatistiksel Analizi

Dondurma işlemi öncesi TUNEL pozitif sperm oranı  $21,00 \pm 8,22$  iken dondurma işleminden 1 ay sonra sonra çözülen spermelerde  $47,00 \pm 9,01$  olmuştur. Gruplar arasında dondurma öncesi ve dondurma-çözme sonrası olmak üzere DNA fragmantasyon (TUNEL pozitif sperm) oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir artış olduğu görülmüştür (Tablo 6.5).

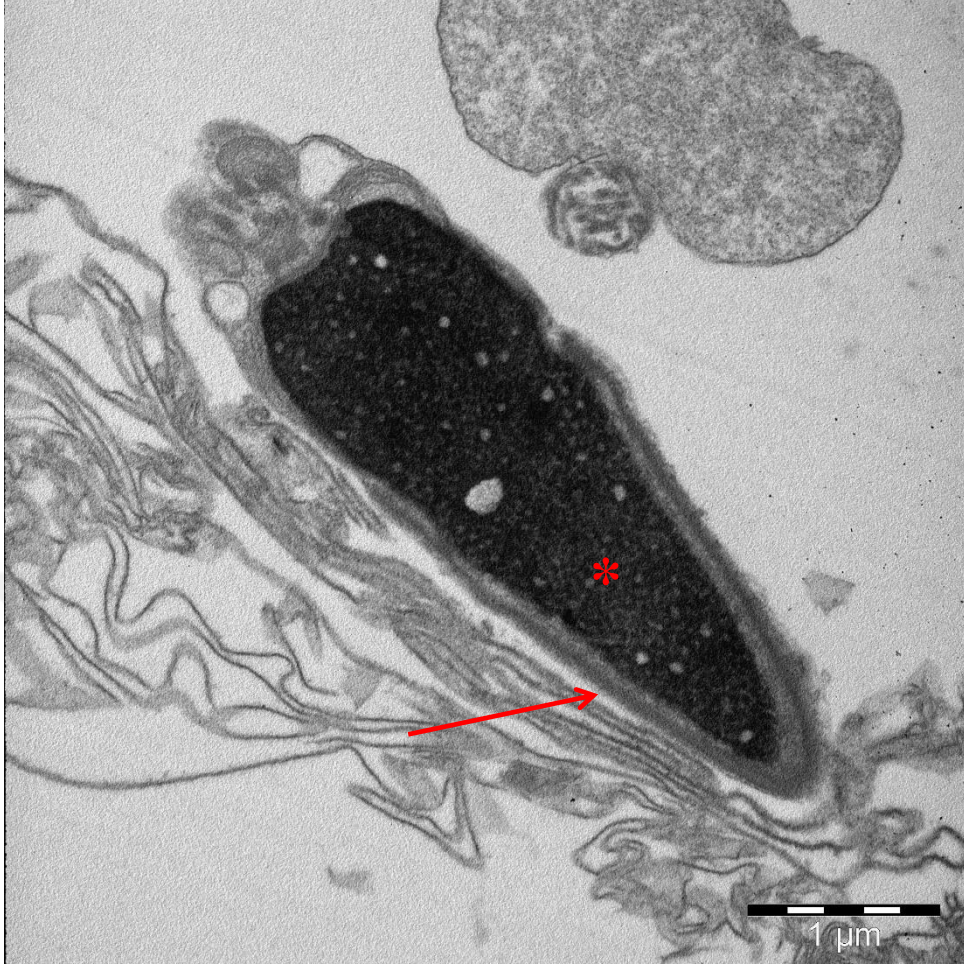
Tablo 6.5: Dondurma işlemi öncesi ve sonrası TUNEL pozitif sperm oranı.

	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p
Dondurma işlemi öncesi TUNEL pozitif sperm oranı	30	21,00	8,225	1,502	,000
Dondurma-çözme sonrası TUNEL pozitif sperm oranı	30	47,00	9,017	1,646	,000

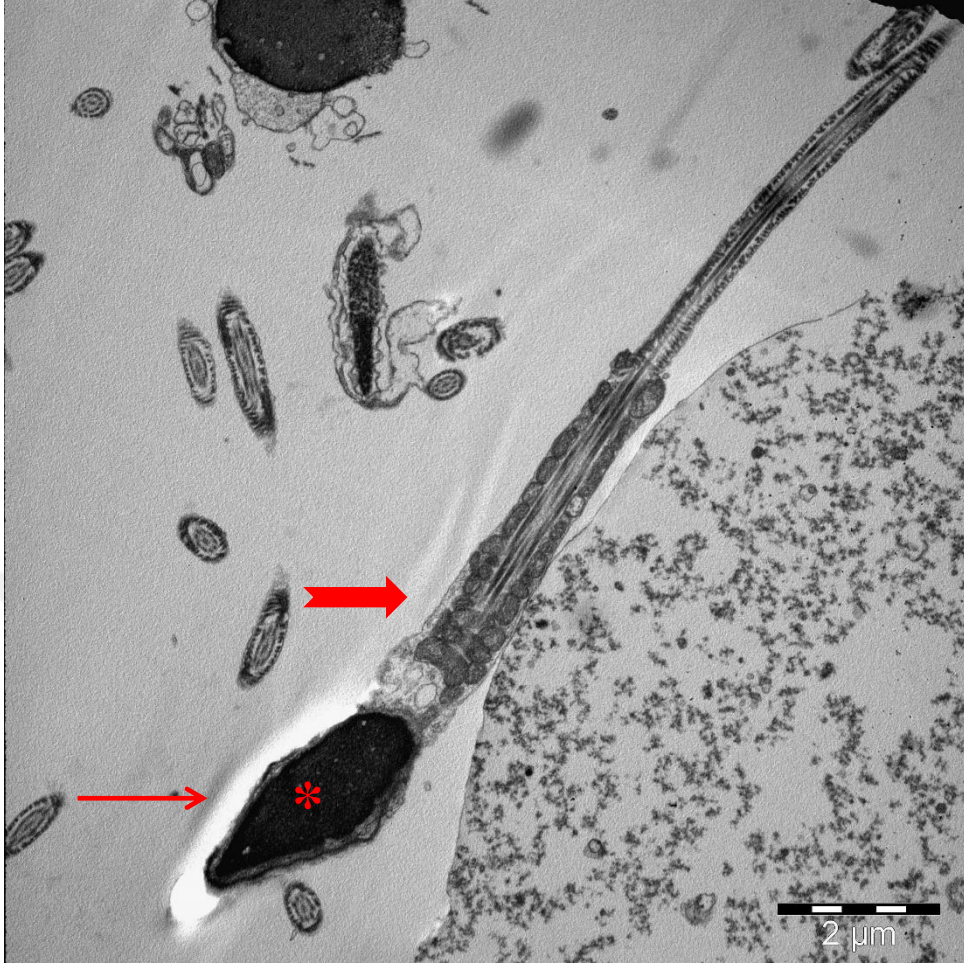
### 6.6.Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları

Dondurma işlemi öncesi ve dondurma-çözme işlemi sonrasında spermler baş, boyun ve kuyruk ince yapısı açısından incelenmiştir.

Dondurma işlemi öncesinde çoğunlukla tipik baş şekli, bozulmamış akrozom ve hücre membran yapıları, homojen nukleusa sahip normal morfolojide olan spermler gözlenmiştir (Şekil 6.6.1 ve 6.6.2).

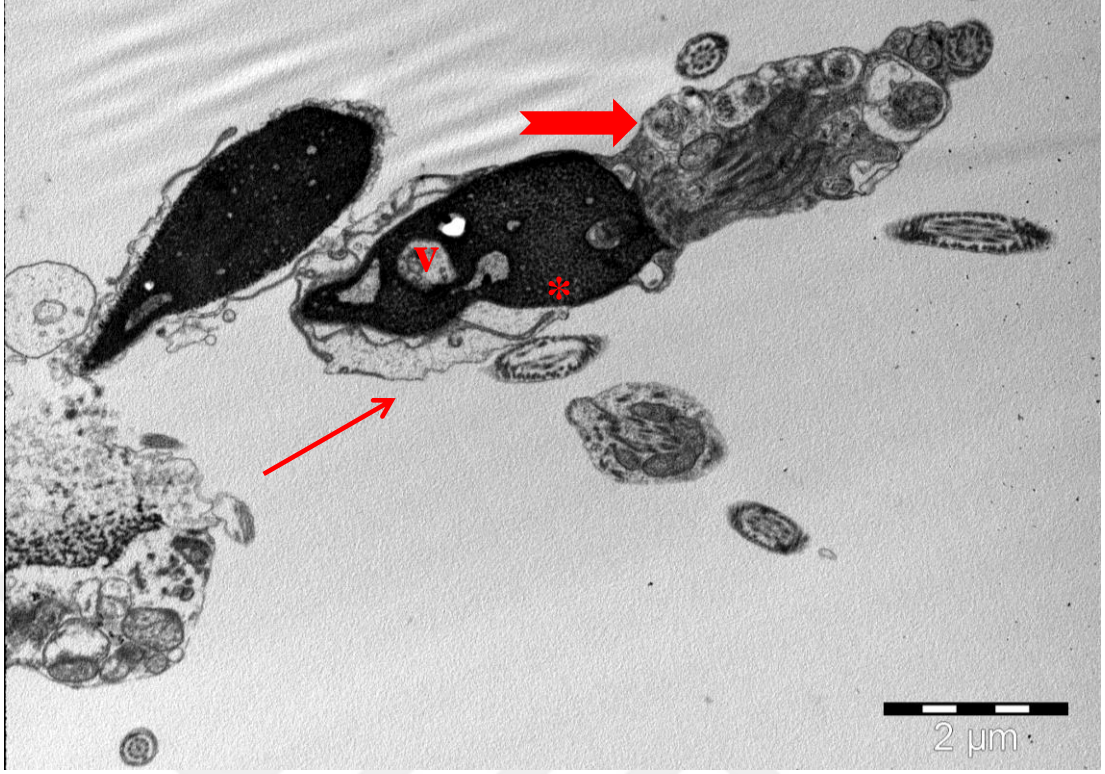


Şekil 6.6.1: Dondurma işlemi öncesi düzgün şekilli baş, sağlam yapıda akrozom membranları ve plazma membranı ( →), kromatin kondensasyonu normal (\*) olan sperm görülmektedir. (x30k)



Şekil 6.6.2: Dondurma işlemi öncesi sağlam yapıda baş, akrozom ve plazma membranı (→), kromatin kondensasyonu normal (\*), düzgün dizilim gösteren mitokondriler ve sağlam boyun yapısına sahip (→) sperm görülmektedir. (x12k)

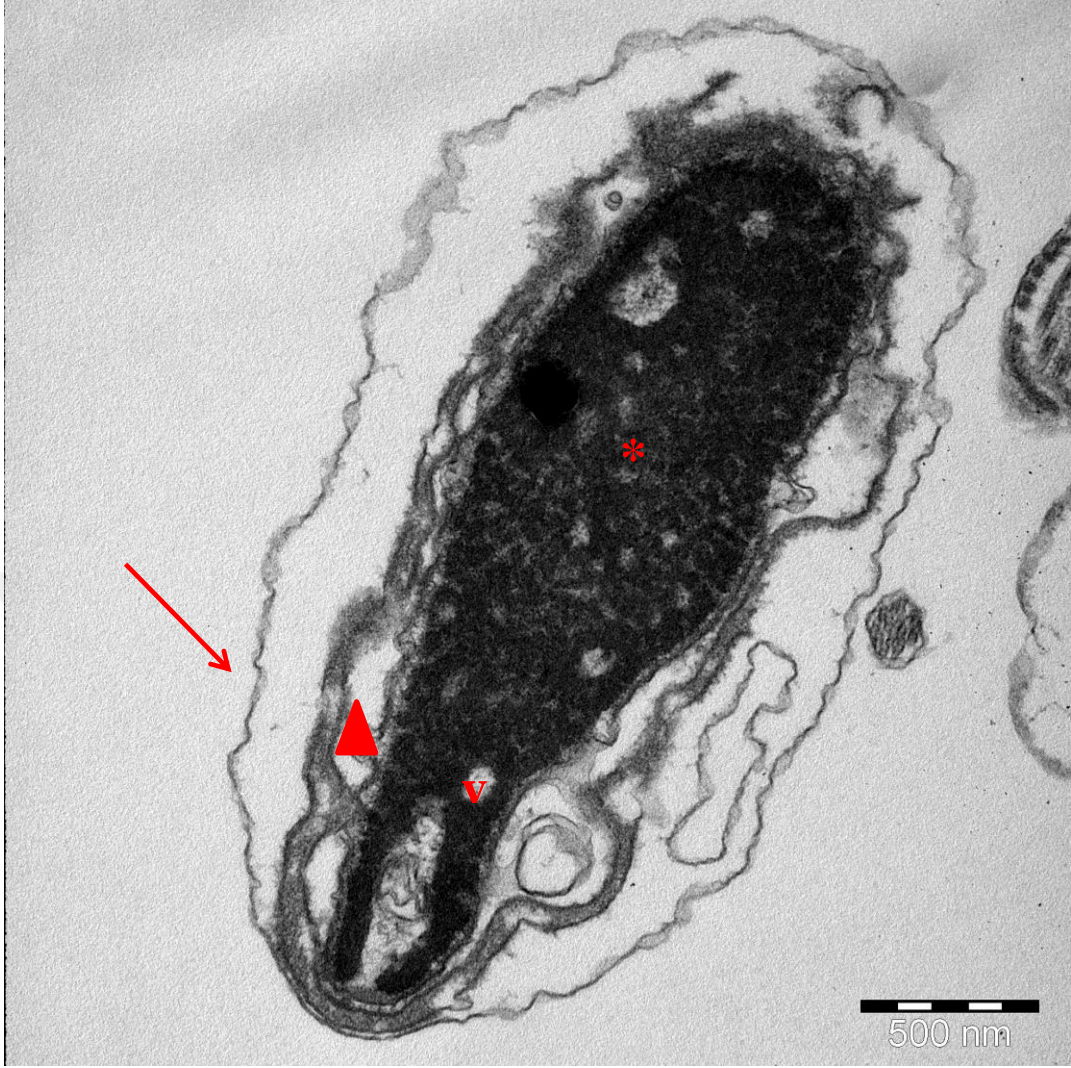
Dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermlerde, az sayıda normal morfolojili spermin yanı sıra çok sayıda spermde akrozom yapısında bozulma, vezikül oluşumu, plazma membranında ayrılma ve kayıp, kromatin kondensasyon bozukluğu gözlenmiştir (Şekil 6.6.3, 4, 5 ve 6).



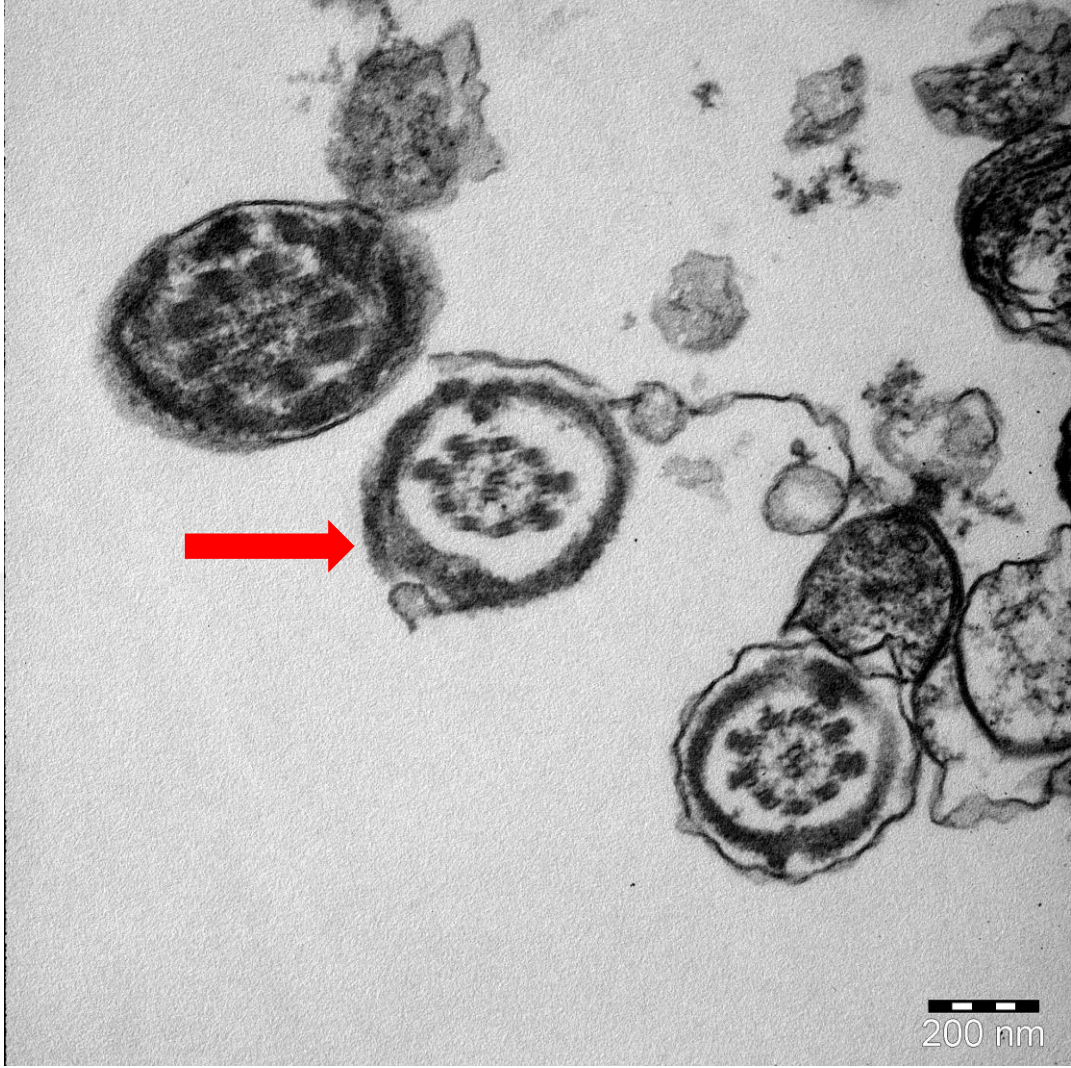
Şekil 6.6.3: Dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde akrozomal irregülasyon ve plazma membranı bütünlüğünde bozulma (→), nüklear vakuol artışı (▽), kromatin kondensasyon bozukluğu, granüler kromatin oluşumu (\*), boyun yapısında ve mitokondri diziliminde hasar (→) görülmektedir. (x12k)



Şekil 6.6.4: Dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermlerde akrozomal irregölasyon, plazma membranında kayıplar (→), kromatin kondensasyon bozukluğu (\*), boyun kısmında defektler (→) görölmektedir. (x15k)



Şekil 6.6.5: Dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermlerde akrozom yapısında bozulma (▲), plazma membranında şişme ve vezikül oluşumu (→), nükleer kısımda büyük vakuoller (▼), kromatin kondensasyonunda bozulma (\*) görülmektedir. (x50k)



Şekil 6.6.6: Dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermlerde dynein yapılarında hasar (→) bulunan kuyruk enine kesiti görölmektedir. (x75k)



## 6.7.ELISA ile Leptin Analizi

Donduma işlemi öncesi ve dondurma-çözme işlemi sonrası semen örnekleri leptin düzeyleri açısından ELISA yöntemi ile incelenmiştir.

## 6.8.ELISA ile Leptin Analizi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Dondurma-çözme işlemi sonrası semen örneklerinde dondurma öncesine göre daha yüksek seviyelerde leptin düzeyi bulunmuştur. Dondurma öncesi seminal leptin düzeyi  $347,58 \pm 111,12$  iken dondurma-çözme sonrası seminal leptin düzeyi  $505,58 \pm 62,43$  olmuştur. Gruplar arasında dondurma öncesi ve dondurma-çözme sonrası olmak üzere leptin seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir artış olduğu görülmüştür (Tablo 6.8.1).

Tablo 6.8.1: Dondurma işlemi öncesi ve dondurma-çözme işlemi sonrası semen leptin seviyelerinin karşılaştırılması.

	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	P
Dondurma işlemi öncesi leptin seviyeleri	30	347,58	111,129	20,289	,000
Dondurma-çözme sonrası leptin seviyeleri	30	505,58	62,432	11,399	,000

Motilite oranı ve leptin seviyeleri arasındaki korelasyon tablo 6.8.2’de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.01$ ) negatif korelasyon görülmüştür (Tablo 6.8.2).

Tablo 6.8.2: Motilite oranı ve leptin seviyelerinin korelasyonu

		Leptin
Motilite	Pearson Correlation	-,358**
	Sig. (2-tailed)	,005
	N	60

DNA fragmantasyonu (TUNEL pozitif sperm) oranı ve leptin seviyeleri arasındaki korelasyon tablo 6.8.3’te gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.01$ ) pozitif korelasyon görülmüştür. (Tablo 6.8.3).

Tablo 6.8.3: DNA fragmantasyonu (TUNEL pozitif sperm) ve leptin seviyelerinin korelasyonu

		Leptin
TUNEL	Pearson Correlation	,572**
	Sig. (2-tailed)	,000
	N	60

### 6.9.Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Analizi

Donduma işlemi öncesi ve dondurma-çözme işlemi sonrası semen örnekleri Reaktif Oksijen Türleri (ROT) düzeyinde kalorimetrik yöntemler ile incelenmiştir.

### 6.10.Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Analizi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Dondurma öncesi ve dondurma-çözme işlemi sonrası semen örnekleri ROT açısından karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. Dondurma işlemi öncesi ROT seviyesi  $15,61 \pm 4,07$  iken dondurma.çözme işlemi sonrası ROT seviyesi  $18,29 \pm 3,70$  olduğu görülmüştür. Gruplar arasında dondurma öncesi ve dondurma-çözme sonrası olmak üzere ROT seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bir artış olduğu görülmüştür (Tablo 6.10).

Tablo 6.10: Dondurma işlemi öncesi ve dondurma-çözme işlemi sonrası ROT seviyelerinin karşılaştırılması

	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p
Dondurma işlemi öncesi ROT seviyeleri	30	15,61	4,072	,743	<b>,000</b>
Dondurma-çözme sonrası ROT seviyeleri	30	18,29	3,703	,676	<b>,000</b>

## 7.TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda dondurma işlemi öncesi ve dondurma-çözme işlemi sonrasında sperm, karşılaştırmalı olarak sperm parametreleri, DNA fragmentasyonu, sperm ince yapısı, ROT ve leptin düzeyleri açısından incelenmiştir. Dondurma-çözme işlemi sonrasında sperm motilitesinde azalma olduğu; morfolojik hasar, DNA fragmentasyonu, ROT ve leptin seviyelerinde ise artış olduğu gözlenmiştir.

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama), hücrelerin çok düşük sıcaklıklarda canlılık kapasitesini ve işlevselliğini kaybetmeden saklanmasını amaçlayan tekniktir. Kriyoprezervasyon işleminin sperm parametreleri üzerine zararlı etkileri birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Kriyoprezervasyonun sperm yapısında ve işlevinde bir takım zararlı değişikliklere yol açtığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (22). Bu değişimler temel olarak, motilitenin azalması, morfolojik değişimlerin olması, membran bütünlüğü ve akışkanlığının kaybı (24) ve DNA fragmentasyonu (25) şeklinde özetlenebilir. Çalışmamızda dondurma-çözme işlemi sonrasında sperm motilitesi, morfolojisi, DNA fragmentasyonu ve leptin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmüştür.

Kriyoprezervasyon sonrası spermelerde buz kristalleri kaynaklı yapısal hasarlar, membran hasarı, organel hasarı ve DNA bütünlüğünün bozulması (DNA fragmentasyonu) gözlenmektedir. Kontrolsüz soğutma ve de uygun olmayan çözme ısılarında meydana gelen hücre içi ve hücre dışı buz kristalleri, mekanik etki ile hücre ve organel membranlarında yapısal hasara neden olarak işlev bozukluğuna yol açmaktadır (87). Bu durum spermin canlılık ve fertilizasyon kapasitesinin azalmasına ve hareketlilik oranında düşüşe neden olmaktadır (25). Dondurma hasarının, plazma membran yapısı ve bütünlüğünü değiştirebileceği gösterilmiştir. Buz kristalleri plazma membranlarının yanısıra organel membranlarında da hasara neden olabilmektedir. Mitokondriyel membranda bu tip bir mekanik hasar meydana geldiğinde oksidatif fosforilasyon olumsuz etkilenmekte ve ROT' un hücre içerisine salınımı gerçekleşmektedir. Biz de çalışmamızda dondurma-çözme işlemi sonrası ROT seviyelerinin donduma işlemi öncesi ROT seviyelerine göre anlamlı ölçüde artmış olduğunu gösterdik.

Kriyoprezervasyon sonrasında sperm motilitesi, canlılığı ve normal morfolojili sperm oranlarında düşüş olduğu, DNA fragmentasyon oranlarında ise artış olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (88, 89). Biz de çalışmamızda, 1 ay süreyle uyguladığımız dondurma işlemi sonrasında spermleri çözdüğümüzde, dondurma öncesine kıyasla çoklu morfolojik hasar oranında artış olduğunu gördük. Dondurma işlemi öncesinde normal morfolojiye yakın spermler gözlemlenirken, dondurma-çözme işlemi sonrasında baş, boyun ve kuyruk hasarı gözlenmiş ve bu durum çoklu morfolojik hasar olarak değerlendirilmiştir.

Sperm DNA bütünlüğü sadece genetik materyalin gelecek nesillere başarılı olarak aktarılmasında değil, fertilizasyonun düzgün bir şekilde gerçekleşmesi, kaliteli embriyo gelişimi ve gebeliğin sağlanması açısından da önem taşımaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, sperm DNA hasarının fertilizasyon potansiyeli (90), gebelik oranları ve canlı doğum oranları ile ters ilişkili olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres, spermde DNA fragmentasyonunu potansiyel olarak etkileyen temel mekanizmalardan birisidir. Yakın zamanda yapılan araştırmalarda kriyoprezervasyon ve takiben çözme işleminin kaspaz aktivasyonuna neden olduğu ve bu mekanizma aracılığıyla apoptozun uyarıldığı belirlenmiştir (91).

Çalışmamızda dondurma işlemi öncesi ve dondurma işleminden 1 ay sonra çözme işlemi uygulandıktan sonra TUNEL yöntemiyle DNA fragmentasyonu ve apoptoz oranlarını belirledik. Dondurma işlemi öncesinde düşük oranlarda DNA fragmentasyonu görülmüştür. Dondurma işleminden 1 ay sonra çözme işlemi uygulandığında dondurma öncesine göre DNA fragmentasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği gözlenmiştir. Bu durumun fiziksel ve kimyasal strese bağlı olarak hücre membran yapısının bozulmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Yapılan çalışmalarda insanlarda pubertenin başlamasında leptinin rolü olabileceği öne sürülmüştür (92). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, varikozel ilişkili spermatogenik disfonksiyonun artan leptin ve leptin reseptör hormonu ile ilişkili olduğu görülmüştür. Von Sobbe ve ark., 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada semen leptin konsantrasyonu ile serum leptin konsantrasyonunun paralel seyrettiğini ve infertilitesi olan hastalarda testiküler disfonksiyonun derecesi ile leptin düzeylerinin

orantılı olarak arttığını göstermişlerdir (93). Çeşitli çalışmalarda leptinin spermatogenez ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ancak leptin ile sperm fonksiyonu ve motilite arasındaki bağlantı henüz tespit edilememiştir (94). Guo ve ark. idiopatik astenozoospermi hastalarında seminal leptin seviyelerinin arttığını ve seminal leptin seviyeleri ile sperm motilitesi arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (94). Biz de çalışmamızda, dondurma-çözme sonrası seminal leptin seviyelerinde anlamlı bir artış olduğunu ve artan seminal leptin seviyelerinin sperm motilitesi ile negatif bir korelasyon yaptığını gösterdik. Vendramini ve ark., leptin direnci ile ilgili olarak artan seminal leptin seviyeleri ile DNA fragmentasyon artışının birbirlerine paralel olduğunu göstermişlerdir (95). Biz de, dondurma-çözme sonrası artan seminal leptin konsantrasyonları ile artan DNA fragmentasyon oranlarının birbiriyle istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon yaptığını gösterdik.

Elektron mikroskopisi ile incelenen spermlerde kromatin yapısı, plazma yapısı ve akrozom membran yapısı, boyunda yer alan mitokondrilerin düzeni gibi detaylı birçok bilgi elde edilebilmektedir. Aydın ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada, kontrol ve sigara grubunda dondurma çözme işlemi sonrasında az sayıda normal morfolojili spermin yanısıra çok sayıda spermde akrozom yapısında bozulma, vezikül oluşumu, boyun bölgesinde plazma membranında ayrılma ve kayıp ve bazı spermlerde de kuyruk kopmaları olduğunu göstermişlerdir (35). Bizim çalışmamızda da benzer olarak dondurma işlemi öncesi ve dondurma-çözme işlemi sonrası yapmış olduğumuz geçirimli elektron mikroskopi incelemelerinde, dondurma-çözme işlemi sonrasında az sayıda normal morfolojili spermin yanısıra plazma membran bütünlüğünde bozulma ve şişme, vezikül oluşumu, vakuol artışı, kromatin kondensasyonunda bozulma gibi apoptoza ait bulgular, boyun morfolojisi, mitokondri dizilimi, kuyruk ve dynein yapılarında hasar bulunan spermler gözlenmiştir.

Sonuç olarak, dondurma-çözme sonrası artan seminal leptin konsantrasyonlarının azalan motilite oranları ile istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon ve artan DNA fragmentasyon oranları ile pozitif bir korelasyon yaptığı gösterilmiştir. Bu sonuç, leptinin sperm motilitesi ve DNA fragmentasyonu için kullanılacak bir belirteç (marker) olabileceğini düşündürmektedir. Leptin ile ilgili mekanizmaların

belirlenmesi erkek fertilitesi üzerine yapılacak olan çalışmalara önemli katkı sağlayacaktır. Seminal leptin seviyeleri ile sperm motilitesi ve DNA fragmantasyonu ilişkisini araştıran kısıtlı sayıda yayın bulunmaktadır. Biz de bu çalışmamızın leptin ve erkek (in)fertilitesi ile ilgili olarak literatüre katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.



## 8.KAYNAKLAR

1. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A and Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril.* **93**(1);159-66, 2010.
2. Schiller J, Arnhold J, Glander HJ and Arnold K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy - effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids.* **106**(2);145-56, 2000.
3. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* **35**(4);495-516, 2007.
4. Baccetti B, Collodel G and Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol.* **28**(4);587-96, 1996.
5. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* **38**(12);1103-11, 2005.
6. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl.* **25**(1);5-18, 2004.
7. Cummins JM, Jequier AM and Kan R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol Reprod Dev.* **37**(3);345-62, 1994.
8. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* **372**(6505);425-32, 1994.
9. Spitzweg C and Heufelder AE. More clues from fat mice: leptin acts as an opponent of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Eur J Endocrinol.* **136**(6);590-1, 1997.
10. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P and Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(20);11073-8, 1997.
11. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H et al. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**(12);4144-8, 1997.
12. Ramos CF and Zamoner A. Thyroid hormone and leptin in the testis. *Front Endocrinol (Lausanne).* **5**;198, 2014.
13. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi.* Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.
14. Junquera LC and Carneiro J. *Temel Histoloji.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009.
15. Kaur G, Thompson LA and Dufour JM. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* **30**;36-44, 2014.
16. Thakur RK, Yadav VK, Kumar A, Singh A, Pal K, Hoepfner L et al. Non-metastatic 2 (NME2)-mediated suppression of lung cancer metastasis involves transcriptional regulation of key cell adhesion factor vinculin. *Nucleic Acids Res.* **42**(18);11589-600, 2014.
17. Komeya M and Ogawa T. Spermatogonial stem cells: Progress and prospects. *Asian J Androl.* **17**(5);771-5, 2015.
18. Ross MH and Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas.* Ankara: Palme Yayıncılık, 2013.
19. Peschon JJ, Behringer RR, Brinster RL and Palmiter RD. Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**(15);5316-9, 1987.
20. Polge C, Smith AU and Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* **164**(4172);666, 1949.



21. Sanger WG, Olson JH and Sherman JK. Semen cryobanking for men with cancer--criteria change. *Fertil Steril.* **58**(5);1024-7, 1992.
22. Thomson LK, Fleming SD, Schulke L, Barone K, Zieschang JA and Clark AM. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. *Fertil Steril.* **92**(3);991-1001, 2009.
23. Donnelly ET, Steele EK, McClure N and 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.
24. 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.
25. Paoli D, Lombardo F, Lenzi A and Gandini L. Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Adv Exp Med Biol.* **791**;137-50, 2014.
26. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **26**(4);239-57, 1972.
27. Searle J, Kerr JF and Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* **17 Pt 2**;229-59, 1982.
28. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene.* **15**(13);1573-81, 1997.
29. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* **40**(5);481-95, 2003.
30. Schwartzman RA and Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev.* **14**(2);133-51, 1993.
31. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC and Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* **13**;18-54, 1988.
32. Wyllie AH, Kerr JF and Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* **68**;251-306, 1980.
33. Glander HJ and Schaller J. Localisation of enzymes in live spermatozoa by CellProbe reagents (preliminary results). *Andrologia.* **31**(1);37-42, 1999.
34. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* **284**(5756);555-6, 1980.
35. Aydin MS, Senturk GE and Ercan F. Cryopreservation increases DNA fragmentation in spermatozoa of smokers. *Acta Histochem.* **115**(4);394-400, 2013.
36. Oliver C and Jamur MC. *Immunocytochemical Methods and Protocols.* ed. J.M. Walker. London: Humana Press, 2010.
37. Aitken RJ and Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl.* **9**(6);367-76, 1988.
38. Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* **10**(5);387-99, 2004.
39. de Lamirande E and Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl.* **16**(1);21-5, 1993.
40. Baker MA and Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* **3**;67, 2005.

41. Nissen HP and Kreysel HW. Superoxide dismutase in human semen. *Klin Wochenschr.* **61**(1);63-5, 1983.
42. Li TK. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol Reprod.* **12**(5);641-6, 1975.
43. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* **74**(1);139-62, 1994.
44. Agarwal A, Saleh RA and Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* **79**(4);829-43, 2003.
45. Yilmaz S, Koyuturk M, Kilic G, Alpak O and Aytoz A. Effects of leucocytospermia on semen parameters and outcomes of intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl.* **28**(6);337-42, 2005.
46. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* **269**(5223);543-6, 1995.
47. Samson WK, Murphy TC, Robison D, Vargas T, Tau E and Chang JK. A 35 amino acid fragment of leptin inhibits feeding in the rat. *Endocrinology.* **137**(11);5182-5, 1996.
48. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R and Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* **269**(5223);546-9, 1995.
49. Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M and Leibel RL. Mapping of the OB receptor to 1p in a region of nonconserved gene order from mouse and rat to human. *Genome Res.* **6**(5);431-8, 1996.
50. Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimacopoulos-Jeannet F, Golay A and Dayer JM. IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab.* **87**(3);1184-8, 2002.
51. Kratzsch J, Lammert A, Bottner A, Seidel B, Mueller G, Thiery J et al. Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab.* **87**(10);4587-94, 2002.
52. Friedman JM and Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* **395**(6704);763-70, 1998.
53. Wallace AM. Measurement of leptin and leptin binding in the human circulation. *Ann Clin Biochem.* **37 ( Pt 3)**;244-52, 2000.
54. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* **83**(7);1263-71, 1995.
55. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tumer N and Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes.* **46**(12);2035-9, 1997.
56. Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR and Kuijper JL. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**(2);561-5, 1997.
57. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB and Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* **1**(12);1311-4, 1995.
58. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* **334**(5);292-5, 1996.
59. Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y et al. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res.* **5**(1);5-12, 1995.

60. Hoggard N, Haggarty P, Thomas L and Lea RG. Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? *Biochem Soc Trans.* **29**(Pt 2);57-63, 2001.
61. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest.* **98**(6);1277-82, 1996.
62. Brabant G, Horn R, von zur Muhlen A, Mayr B, Wurster U, Heidenreich F et al. Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia.* **43**(4);438-42, 2000.
63. Boden G, Chen X, Mozzoli M and Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* **81**(9);3419-23, 1996.
64. Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM and Davenport M. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes.* **46**(2);313-6, 1997.
65. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM and Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature.* **389**(6649);374-7, 1997.
66. Mercer JG, Moar KM, Rayner DV, Trayhurn P and Hoggard N. Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (*ob/ob*) and cold-exposed lean mice. *FEBS Lett.* **402**(2-3);185-8, 1997.
67. Frederich RC, Lollmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB et al. Expression of *ob* mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest.* **96**(3);1658-63, 1995.
68. Ma Z, Gingerich RL, Santiago JV, Klein S, Smith CH and Landt M. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clin Chem.* **42**(6 Pt 1);942-6, 1996.
69. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F and Jeanrenaud B. The *ob* gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes.* **44**(12);1467-70, 1995.
70. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J et al. Regulation of expression of *ob* mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem.* **271**(10);5301-4, 1996.
71. Gualillo O, Lago F, Garcia M, Menendez C, Senaris R, Casanueva FF et al. Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology.* **140**(11);5149-53, 1999.
72. Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F and Morreale de Escobar G. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology.* **138**(10);4485-8, 1997.
73. Florkowski CM, Collier GR, Zimmet PZ, Livesey JH, Espiner EA and Donald RA. Low-dose growth hormone replacement lowers plasma leptin and fat stores without affecting body mass index in adults with growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* **45**(6);769-73, 1996.
74. Donahoo WT, Jensen DR, Yost TJ and Eckel RH. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**(12);4139-43, 1997.
75. Rentsch J and Chiesi M. Regulation of *ob* gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett.* **379**(1);55-9, 1996.
76. Trayhurn P, Duncan JS and Rayner DV. Acute cold-induced suppression of *ob* (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J.* **311** ( Pt 3);729-33, 1995.
77. Scriba D, Aprath-Husmann I, Blum WF and Hauner H. Catecholamines suppress leptin release from in vitro differentiated subcutaneous human adipocytes in

- primary culture via beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Eur J Endocrinol.* **143**(3);439-45, 2000.
78. Imagawa K, Numata Y, Katsuura G, Sakaguchi I, Morita A, Kikuoka S et al. Structure-function studies of human leptin. *J Biol Chem.* **273**(52);35245-9, 1998.
  79. Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev.* **60**(10 Pt 2);S1-14; discussion S68-84, 85-7, 2002.
  80. Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med.* **356**(3);237-47, 2007.
  81. Oswal A and Yeo G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity (Silver Spring).* **18**(2);221-9, 2010.
  82. Myers MG, Jr., Leibel RL, Seeley RJ and Schwartz MW. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab.* **21**(11);643-51, 2010.
  83. Morris DL and Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **297**(6);E1247-59, 2009.
  84. Chehab FF, Mounzih K, Lu R and Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science.* **275**(5296);88-90, 1997.
  85. Laughlin GA and Yen SS. Hypoleptinemia in women athletes: absence of a diurnal rhythm with amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**(1);318-21, 1997.
  86. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S and McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(3);1023-8, 1997.
  87. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N and Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril.* **82**(4);913-8, 2004.
  88. Petyim S and Choavaratana R. Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. *J Med Assoc Thai.* **89**(3);306-13, 2006.
  89. Ngamwuttiwong T and Kunathikom S. Evaluation of cryoinjury of sperm chromatin according to liquid nitrogen vapour method (I). *J Med Assoc Thai.* **90**(2);224-8, 2007.
  90. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS and Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod.* **13**(6);1429-36, 1998.
  91. Lewis SE. Sperm DNA fragmentation and base oxidation. *Adv Exp Med Biol.* **791**;103-16, 2014.
  92. Roemmich JN and Rogol AD. Role of leptin during childhood growth and development. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **28**(4);749-64, viii, 1999.
  93. von Sobbe HU, Koebnick C, Jenne L and Kiesewetter F. Leptin concentrations in semen are correlated with serum leptin and elevated in hypergonadotrophic hypogonadism. *Andrologia.* **35**(4);233-7, 2003.
  94. Guo J, Zhao Y, Huang W, Hu W, Gu J, Chen C et al. Sperm motility inversely correlates with seminal leptin levels in idiopathic asthenozoospermia. *Int J Clin Exp Med.* **7**(10);3550-5, 2014.
  95. Vendramini V, Cedenho AP, Miraglia SM and Spaine DM. Reproductive function of the male obese Zucker rats: alteration in sperm production and sperm DNA damage. *Reprod Sci.* **21**(2);221-9, 2014.

## 9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU <sup>E-İmzalıdır</sup>



Sayı : 10840098-604.01.01-E.2304

17/09/2015

Konu : Etik Kurulu Kararı

Sayın Tuğçe ÖNEL

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “İnsan sperm kriyoprezervasyonunun sperm motilitesi ve deoksiribonükleik asit (DNA) fragmantasyonuna etkisinin leptin molekülü ile ilişkisi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar  
Etik Kurulu Başkanı

EK:  
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge; 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre PROF.DR. HANEFİ ÖZBEK tarafından 17.09.2015 tarihinde e-imzalanmıştır.  
Doküman Kodu: <http://ebys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmation/CodeDocumentViewer.aspx?Code=395B1DD2X6>

Kavacık Mahallesi Ekinciler Caddesi No: 19 Beykoz / İSTANBUL  
Tel: (216) 681 5100 Faks: (212) 531 7555

## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)






İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan sperm kriyoprezervasyonunun sperm motilitesi ve deoksiribonükleik asit (DNA) fragmantasyonuna etkisinin leptin molekülü ile ilişkisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Tuğçe ÖNEL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI				
	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"/>

## ETİK KURUL ONAYI (DEVAMI)

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	11.09.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	11.09.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
Karar Bilgileri	<b>Karar No: 462</b>		<b>Tarih: 15/09/2015</b>			
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, 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	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
			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"/>	
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	Istanbul 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"/>	
Prof. Dr. Tangül MÜDOK	Histoloji ve Embriyoloji	Istanbul 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"/>	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	Istanbul 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"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	Istanbul 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"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Emir YÜZBAŞIOĞLU	Protetik Diş Tedavisi	Istanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	Istanbul 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"/>	
Yrd. Doç. Dr. Muhammed Fatih EVCİMİK	Kulak-Burun Boğaz	Istanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

\* :Toplantıda Bulunma

## 10.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğçe	Soyadı	Önel
-----	-------	--------	------

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Marmara Üniversitesi / Fen Fakültesi / Biyoloji	2014
Lise	Şenesenevler Lisesi	2010

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl )

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71,39445	70,91552	65,57975



## Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

## Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2015
Marmara Üniversitesi	Pedagojik Formasyon Sertifikası	2014
İngiltre/Londra, Delfin School	İngilizce Dil Eğitim Kursu Sertifikası	2015

## Poster Bildirileri

XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi	‘İnsan Sperm Kriyoprezervasyonunun Sperm Motilite, Morfoloji ve Deoksiribonükleik Asit (DNA) Fragmantasyonuna Etkisinin Araştırılması’	2016
--	--	------