

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BASİT YIKAMA YÖNTEMİ İLE HAZIRLANMIŞ SEMEN  
ÖRNEKLERİNDE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN  
(TZP) ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

MERVE DURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Selçuk DUMAN

KONYA 2019

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BASİT YIKAMA YÖNTEMİ İLE HAZIRLANMIŞ SEMEN  
ÖRNEKLERİNDE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN  
(TZP) ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

MERVE DURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Selçuk DUMAN

KONYA 2019

**TEZ ONAY SAYFASI**

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Merve DURAN' ın "**Basit Yıkama Yöntemi ile Hazırlanmış Semen Örneklerinde Trombositten Zengin Plazmanın (TZP) Etkisinin Değerlendirilmesi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, Türkiye/ 18/06/2019

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Selçuk DUMAN  
Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
İmzası

Jüri Üyesi  
Prof. Dr. S. Serpil KALKAN  
Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı

Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN  
Selçuk Üniversitesi  
Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03/07/2019 tarih ve 13./25.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

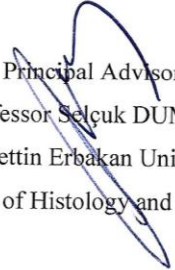
Enstitü Müdürü

İmzası



### APPROVAL

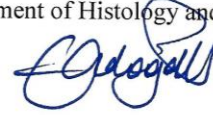
We certify that we have read this dissertation entitled “**Evaluate The Effect of Platelet Rich Plasma (PRP) in Semen Samples Prepared By Simple Washing Method**” by “**Merve DURAN**” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of **Master of Science** in the Department of “**Histology and Embryology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan  
Konya, Turkey / 18/06/2019

  
Principal Advisor  
Professor Selçuk DUMAN  
Necmettin Erbakan University  
Department of Histology and Embryology

Examination Committee Member  
Professor S. Serpil KALKAN  
Necmettin Erbakan University  
Department of Histology and Embryology



Examination Committee Member  
Professor Ender ERDOĞAN  
Selçuk University  
Department of Histology and Embryology



This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kismet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK  
Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature



## BEYANAT

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

17.06.2019

MERVE DURAN



01.07.2019

Turnitin

[Skip to Main Content](#)  
[Assignments](#)

[Students](#)

[Grade Book](#)

[Libraries](#)

[Calendar](#)

[Discussion](#)

[Preferences](#)

About this page

This is your assignment inbox. To view a paper, select the paper's title. To view a Similarity Report, select the paper's Similarity Report icon in the similarity column. A ghosted icon indicates that the Similarity Report has not yet been generated.

## BASIT YIKAMA YÖNTEMİ İLE HAZIRLANMIŞ SEMEN ÖRNEKLE...

Inbox | Now Viewing: new papers ▼

[Submit](#) [File](#) [Online Grading Report](#) | [Edit assignment settings](#) | [Email non-submitters](#)

[Delete](#) [Download](#) [move to...](#)

<input type="checkbox"/>	Author	Title	Similarity	web	publication	student papers	Grade	response	File	Paper ID	Date
<input type="checkbox"/>	Merve Duran	BASIT YIKAMA YÖNTEMİ İLE HAZIRLANMIŞ SEM...	10% <input type="text" value="10%"/>	7%	2%	6%	--	--	download paper	1148408080	01-Jul-2019

Prof. Dr. Selçuk DUMAN

## İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i> .....	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i> .....	<i>ii</i>
<i>Approval</i> .....	<i>iii</i>
<i>Beyanat</i> .....	<i>iv</i>
<i>Orjinallik Raporu</i> .....	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i> .....	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i> .....	<i>viii</i>
<i>Şekiller Listesi</i> .....	<i>x</i>
<i>Resimler Listesi</i> .....	<i>xi</i>
<i>Tablolar Listesi</i> .....	<i>xii</i>
<i>Grafikler Listesi</i> .....	<i>xiii</i>
<i>Özet</i> .....	<i>xiv</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xv</i>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>5</b>
2.1. <i>Erkek Üreme Sistemi</i> .....	5
2.1.1. <i>Erkek Üreme Sistemine Genel Bakış</i> .....	5
2.1.2. <i>Testisler (Erbezi)</i> .....	6
2.1.2.1. <i>Sertoli Hücreleri</i> .....	7
2.1.2.2. <i>Spermatogenik Hücreler</i> .....	7
2.1.3. <i>Olgun (Matür) Spermin Yapısı</i> .....	10
2.2. <i>Semen Analizi</i> .....	12
2.2.1. <i>Semenin Laboratuvarında İncelenmesi</i> .....	12
2.2.1.1. <i>Volüm</i> .....	13
2.2.1.2. <i>Renk</i> .....	14
2.2.1.3. <i>Koku</i> .....	14
2.2.1.4. <i>pH</i> .....	14
2.2.1.5. <i>Likefaksiyon</i> .....	15
2.2.1.6. <i>Viskozite</i> .....	15
2.2.1.7. <i>Ejakülatın Ön Mikroskopik İncelenmesi</i> .....	16
2.2.1.8. <i>Sperm Sayımı</i> .....	16
2.2.1.9. <i>Sperm Motilitesi</i> .....	17

2.2.1.10.	<i>Sperm Morfolojisi</i>	19
2.2.1.11.	<i>Sperm Canlılığı (Viabilitesi)</i>	20
2.2.1.12.	<i>Ejakülatın Genel Görünümü</i>	20
2.3.	<i>IUI, IVF, ICSI için Semen Hazırlığı</i>	21
2.3.1.	<i>Sperm Hazırlama Yöntemleri</i>	21
2.3.1.1.	<i>Basit Yıkama (Simple Washing)</i>	22
2.3.1.2.	<i>Swim-Up (Yüzdürme)</i>	23
2.3.1.3.	<i>Percol Gradyent Yöntemi</i>	23
2.4.	<i>Kan ve Trombosit</i>	23
2.4.1.	<i>Trombositlerin görevleri</i>	24
2.4.2.	<i>Trombositlerin Zonları</i>	24
2.4.3.	<i>Trombositlerdeki Granüller</i>	25
2.4.4.	<i>Trombosit Aktivasyonu</i>	26
2.5.	<i>Trombositten Zengin Plazma (TZP) Biyolojisi</i>	26
2.5.1.	<i>TZP</i>	26
2.5.2.	<i>TZP'nin Alt Grupları ve Büyüme Faktörleri</i>	27
2.5.2.1.	<i>TZP'nin Alt Grupları</i>	27
2.5.2.2.	<i>TZP İçerisindeki Büyüme Faktörleri</i>	28
2.5.3.	<i>TZP'nin Kullanım Alanları</i>	29
2.5.4.	<i>TZP'nin Hazırlanması</i>	30
2.5.5.	<i>TZP'nin Avantaj ve Dezavantajı</i>	31
<b>3.</b>	<b>MATERYAL- METOD</b>	<b>33</b>
3.1.	<i>Semen Numunesinin Analizi</i>	33
3.2.	<i>TZP Hazırlanması</i>	34
3.3.	<i>Deney Aşaması</i>	39
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>EKLER</b>	<b>64</b>

## **KISALTMALAR**

**°C:** S antigrat derece

**µl:** Mikrolitre

**µm:** Mikrometre

**ACD-A:** Asit sitrat dekstroz

**Ad:** Koyu tip spermatogonyum

**ADP:** Adenozin difosfat

**AKS:** Açık kanallar sistemi

**Ap:** Açık tip spermatogonyum

**ATP:** Adenozin trifosfat

**CaCl<sub>2</sub>:** Kalsiyum klorür

**cc:** Cubic centimer

**cm:** Santimetre

**dk:** Dakika

**DNA:** Deoksiribo nükleik asit

**DSÖ:** Dünya sağlık örgütü

**EDTA:** Etilendiamin tetra asetik asit

**EGF:** Epidermal growth factor (Epidermal Büyüme Faktörü)

**FGF:** Fibroblast growth factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)

**HIV:** İnsan immün yetmezlik virüsü (human immunodeficiency virus)

**ICSI:** İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

**IGF:** İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin like growth factor)

**IUI:** İntrauterin inseminasyon-aşılama

**IVF:** İn vitro fertilizasyon

**kDa:** Kilo dalton

**LE-PRP:** Lökosit ve eritrosit plateletten zengin plazma (Leukocytes and rythrocytes platelet)

**L-PRF:** Lökosit ve plateletten zengin fibrin (Leukocytes and platelet rich fibrin)

**L-PRP:** Lökosit ve platelet zengin plazma (Leukocytes and platelet rich plasma)

**ml:** Mililitre

**mm:** Milimetre

**nm:** Nanometre

**PAF:** Platelet aktive edici faktör

**PBS:** Fosfat bazlı tampon (Phosphate Buffared Saline)

**PDGF:** Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor)

**P-PRF:** Saf plateletten zengin fibrin (Pure Platelet Rich Plasma)

**P-PRP:** Saf plateletten zengin plazma (Pure Platelet Rich Plasma)

**ROS:** Reaktif oksijen radikalleri

**TGF-b:** Değiştirici büyüme faktörü (Transforming growth factor beta)

**TZP:** Trombositten zengin plazma

**A-TZP:** Aktive Trombositten zengin plazma

**VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)

**YTS:** Yoğun tübüler sistem

**YÜT:** Yardımcı üreme teknikleri

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Erkek üreme sistemin genel görüntüsü .....	5
Şekil 2: İnsan testisinin şematik gösterimi .....	6
Şekil 3: İnsan testisinin histolojik görüntüsü.....	6
Şekil 4: Spermatogenik hücrelerin nesillerinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 5: İnsan spermatogenezin şematik gösterimi.....	10
Şekil 6: İnsan spermatozoonunun şematik gösterimi .....	12
Şekil 7: Makler sayım kamarası.....	17
Şekil 8: Tam kanın ACD'li tüpe çekilmiş görüntüsü.....	34
Şekil 9: Alınan kanın dibi konik tüplere eşit hacimde paylaştırılması.....	35
Şekil 10: Eşit hacimde paylaştırılan tüplerin santrifüj aşaması.....	35
Şekil 11: Santrifüj sonrası plazma ve şekilli elemanların oluşturduğu faz oluşumu .	36
Şekil 12: Üst plazma fazının çekilme aşaması.....	36
Şekil 13: Üst fazın çekilmiş görüntüsü.....	37
Şekil 14: Trombosit aktive etmek için kullanılan %10'luk CaCl <sub>2</sub> .....	37
Şekil 15: TZP'nin jel formu.....	38
Şekil 16: 2. Santrifüjden sonra oluşan pellet.....	38
Şekil 17: 12/06/2019 tarihinde Pubmed üzerinden yapılan tarama.....	55

## RESİMLER LİSTESİ

**Resim 1:** Steril spermiyogram kabı.....34

## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1:</b> Spermiyogram yapılırken baz alınan parametreleri.....	19
<b>Tablo 2:</b> +4 değerinin kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması.....	41
<b>Tablo 3:</b> PBS ve TZP gruplarının birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları.....	42
<b>Tablo 4:</b> +3 değerinin kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması.....	43
<b>Tablo 5:</b> PBS ve TZP gruplarındaki birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları.....	44
<b>Tablo 6:</b> +2 değerinin kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması.....	45
<b>Tablo 7:</b> PBS ve TZP gruplarındaki birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları.....	46
<b>Tablo 8:</b> +1 değerinin kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması.....	47
<b>Tablo 9:</b> PBS ve TZP gruplarındaki birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları.....	48
<b>Tablo 10:</b> +3 ve +4 motilite değerlerinin toplamının kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması.....	49
<b>Tablo 11:</b> PBS ve TZP gruplarındaki birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları.....	50

## GRAFİKLER LİSTESİ

<b>Grafik 1:</b> Konsantrasyonun kontrol ve deney grubu olarak zamana bağlı değişimi...40	
<b>Grafik2:</b> + 4 değerinin zamana bağlı değişim grafiği.....41	
<b>Grafik 3:</b> + 3 değerinin zamana bağlı değişim grafiği .....43	
<b>Grafik 4:</b> + 2 değerinin zamana bağlı değişim grafiği.....45	
<b>Grafik 5:</b> + 1 değerinin zamana bağlı değişim grafiği.....47	
<b>Grafik 6:</b> +3 ve +4 motilite değerlerinin toplamının zamana bağlı değişim grafiği.49	

# ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BASİT YIKAMA YÖNTEMİ İLE HAZIRLANMIŞ SEMEN ÖRNEKLERİNDE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN (TZP) ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Merve DURAN

HISTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ- KONYA 2019

**AMAÇ:** Trombositten Zengin Plazma (TZP)'nin içinde bulunan büyüme faktörlerinin sperm parametrelerine etkisinin olup olmadığını araştırmaktır. TZP, kandan elde edilen yüksek konsantrasyonda trombosit içeren plazma olarak karışımıza çıkmaktadır ve hâlihazırda birçok alandaki araştırmalarda ve tedavilerde kullanımı mevcuttur. TZP'de temel yaklaşım, trombositleri patlatma aşamasından sonra büyüme faktörlerini ve sitokinleri açığa çıkarıp proliferasyonu, yenilenmeyi ve farklılaşmayı uyararak hücrel çoğalma, kollajen üretimi, hyaluronik asit üretimi, epidermal hücre büyümesi, anjiyogenez gibi sistemleri harekete geçirerek farklı tipteki tedavilerde kullanılabilir yapmaktır. Bizim asıl amacımız ise semen örneklerinde kullanmak için hazırlayacağımız TZP ile sperm çift yıkama yapmak, daha sonrasında ise TZP 'nin bazı semen parametrelerine (motilite, sayı) olan etkisine bakmaktır. Ayrıca, TZP'nin sperm hazırlama tekniklerinden biri olan basit yıkama işleminde kullanılan medyumlara ek bir alternatif olması beklenmektedir.

**MATERYAL- METOD:** Gönüllü onam formlarıyla bilgilendirilmiş 10 gönüllünün her birinden 10 cc kan alındı. Gönüllülerden alınan bu kanlardan TZP elde edilerek çalışmamıza dâhil edildi. Gönüllü onam formları ile bilgilendirilmiş ve spermiyograma gelen 20 hastadan azospermi grupları hariç diğer tüm gruplar çalışmaya dâhil edildi. Alınan numunelerinin spermiyogram sonuçlarına bakıldıktan sonra atık hedefli çalışmamıza geçildi. Likefiye olan semen kontrol ve deney grubu olmak üzere eşit hacimde 2 grupta randomize edildi. Kontrol grubu PBS ile rutinde olan basit yıkama metoduyla iki kere yıkandı. Deney grubunda ise semen örnekleri TZP ile muamele edilerek iki kere yıkandı ve her iki grubun 15. , 30. , 45. dk. ve son olarak 2. santrifüj sonrası sonuçlarına bakılarak karşılaştırmalar yapıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

**BULGULAR:** Çalışmamıza yaşları 18-50 arasında olan 20 gönüllü hasta katıldı. Spermiyograma gelen ve azospermi hariç tüm hastalar çalışmamıza dâhil edildi. Spermiyogram analizleri yapıldıktan sonra azospermi olduğu anlaşılan spermiler çalışma dışı bırakılıp yeniden gönüllü formlarıyla bilgilendirilen hastalardan tekrardan örnekler alınıp çalışmaya devam edildi. Deney ve Kontrol gruplarımızda basit yıkama yapıldığı ve yıkama medyumlari da 1/1 kullanıldığı için konsantrasyon analizimizde bir değişiklik gözlemlenmedi. TZP grubundaki +4 motilite analizinde grup etkisi  $p=0.0004$ , zaman etkisi  $p<0.0001$ , grup-zaman etkisinin  $p$  değeri 0.02 olduğu ve tüm bu değerlerin 0.05'den küçük olduğu dikkate alındığında analizin bu kısmı anlamlı bulundu. +3 motilite analizinde grup etkisi  $p<0.0001$ , zaman etkisi  $p<0.0001$ , grup-zaman etkisinin  $p<0.0001$  olduğu ve tüm bu değerlerin 0.05'den küçük olduğu dikkate alındığında analizin bu kısmı anlamlı bulundu. +2 motilite analizinde grup etkisi  $p=0.04$  olduğu için sonuç anlamlı, zaman etkisi  $p=0.1$ , grup-zaman etkisinin  $p=0.4$  olduğu ve tüm bu değerlerin 0.05'den büyük olduğu dikkate alındığında analizin bu kısmı anlamlı bulunmadı. +1 motilite analizinde grup, zaman ve grup-zaman etkisi  $p<0.0001$  olduğu için anlamlı bulunmuştur. +3 ve +4 motilite değerlerinin toplam analizinde ise grup, zaman, grup-zaman etkisi  $p<0.0001$  olduğu yani  $p<0.05$  olduğu için sonuç anlamlı bulunmuştur.

**SONUÇ:** Çalışmamızda azospermi hariç çalışmaya dâhil edilen gruplarda ilk 15. dakikada istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen motilite artışı gözlemlenmiştir. TZP'nin ilerleyen zaman diliminde yani çalışma sürelerimiz olan 30 ve 45.dk.'larda etkisini kaybederek spermin motilitesinde bir azalma gösterilmiştir. 45.dk sonrası yapılan 2. santrifüj sonrası TZP ile yeniden muameleden sonra ölçüme bakıldığında ilk 15.dk kadar olmasa da yine anlamlı bir artma meydana gelmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Sperm Motilite ve Morfoloji; Sperm Yıkama; Trombosit; Trombositten Zengin Plazma (TZP).

## ABSTRACT

REPUBLIC of TURKEY

NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

EVALUATION OF THE EFFECT OF THROMBOCYTE RICH PLASMA (PRP) IN SEMEN  
SAMPLES PREPARED BY SIMPLE WASHING METHOD

Merve DURAN

HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY

MASTER'S THESIS - KONYA 2019

**OBJECTIVE:** The aim of this study was to investigate the effect of growth factors on sperm parameters in platelet-rich plasma (PRP). PRP is a high concentration platelet-containing plasma obtained from blood and it is currently used in many research and treatment areas. The basic approach in PRP is making it usable in different types of treatments by activating systems such as the proliferation that occurred by extracting growth factors and cytokines after the blasting step of platelets, cellular proliferation, stimulating proliferation, collagen production, hyaluronic acid production, epidermal cell growth, angiogenesis and more which obtained by inducing regeneration and differentiation. Our main goal is looking for some effects of PRP on some semen parameters (motility, concentration) after double washing the sperm with the PRP which will be prepared to use in semen samples. Moreover, TZP is expected to be an additional alternative to the mediums used in the simple washing process, which is one of the techniques of sperm preparation.

**MATERIAL AND METHODS:** 10 cc blood was collected from each of 10 volunteers who were informed by their volunteer consent forms. PRP was obtained from the blood samples taken from volunteers and included in our study. All the groups were included in the study except the azoospermia groups among 20 patients who were informed by their consent forms and were given the spermiogram. After looking at the spermiogram results of the samples taken, our waste-targeted study started. Semen was randomized into two groups of equal volume, control and experimental group. The control group was washed twice with PBS using a simple washing method. In the experimental group, semen samples were washed twice by treating it with PRP in each 15th, 30th, 45th minutes. Finally, after the second centrifugation, the results were compared and evaluated statistically.

**FINDINGS:** Twenty volunteer patients ages between 18-50 participated in our study. All patients were included in our study except azoospermias. After the analysis of the spermiogram, the patients who were found to have azoospermia were excluded from the study. No change was observed in our concentration analysis since 1/1 of the wash media was used and simple washing was performed in our experiment and control groups. In the + 4 motility analysis of the PRP group, the effect of group was  $p = 0.0004$ , the time effect was  $p < 0.0001$ , the p-value of group-time effect was 0.02 and because all of these values were less than 0.05, this part of the analysis was found significant. In the +3 motility analysis, the effect of the group was  $p < 0.0001$ , the time effect was  $p < 0.0001$ , the group-time effect was  $p < 0.0001$  and also this part was found significant because all these values were less than 0.05. In the +2 motility analysis, since the effect of the group was  $p = 0.04$ , the result was significant, the time effect was  $p = 0.1$ , the group-time effect was  $p = 0.4$  and all of these values were greater than 0.05 so this part of the analysis was not considered significant. In the +1 motility analysis, the group was found to be significant since the time and group-time effect were  $p < 0.0001$ . In the total analysis of +3 and +4 motility values, the result was significant since the group, time and group-time effects were  $p < 0.0001$  which are  $p < 0.05$ .

**CONCLUSION:** In our study, the increase of the motility is observed and accepted as statistically significant at the first 15th minute for each group that included to the study, except for azoospermia. A decrease in sperm motility has shown in the 30th and 45th minutes of the treatment period of the PRP. After the second centrifugation, which is done after 45 minutes, samples are re-treated with PRP and an important increase in sperm motility was observed again but not as much as it was in the first 15 minutes of our study.

**KEY WORDS:** Sperm Motility and Morphology; Sperm Washing; Platelet; Platelet Rich Plasma (PRP).

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, yani istenildiği halde çocuk sahibi olamama, pek çok toplumda önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Tanım olarak, en az 1 yıl herhangi bir korunma yöntemi uygulanmaksızın gebelik elde edilmemesi infertilite yani kısırlık olarak adlandırılmaktadır (Castila 2010).

Fertilite, kadın ve erkekte yaşla birlikte azalmakta ve bunun kadınlarda ise daha belirgin olduğu bilinmektedir (Dunson ve ark. 2004).

Tüm infertil çiftlerde %40-50 oranında kadına ait faktörler rol oynamaktadır. Bu faktörlerden bazıları ise şunlardır; ovulatuvar, tubal/peritoneal faktör, servikal ve immünolojik faktörler, yaş, aşırı alkol veya sigara kullanımı, aşırı kilo alımı ve kaybı, yoğun fiziksel veya ruhsal stres, birden fazla düşük yapılmış olması vb. faktörler sayılabilmektedir (Stein ve Levental 1935; Cramer ve ark. 1979; D'Hooge 2003). % 30-40 oranında ise erkeğe ait faktörler rol oynamaktadır. Bu faktörler ise şunlardır; aşırı alkol veya sigara kullanımı, testis damarlarının geniş olması, testislerde ısı artışının sperm şeklini bozması, diyabet, iltihap vb. sağlık sorunlarıdır (Bonde ve ark. 1998; Larsen ve ark. 2000). %10-15 oranında ise günümüzde yapılan tanısal testlerde herhangi bir sebebe bağlı olarak gelişmeyen infertilite, açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmaktadır (Miller ve ark. 1999).

İnfertil çiftlerin çocuk sahibi olmasını sağlayan işlemlerin tümüne Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) denilmektedir. Bu tekniklerden örnek verilecek olursa İntrauterin inseminasyon- aşılama (IUI), İn vitro fertilizasyon (IVF), İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) vb. dir. Hastanın yaşı, infertilite süresi ve nedeni vs. gibi değişkenler göz önüne alınarak klinisyen tarafından uygun bulunan yardımcı üreme tekniklerinden biri kullanılarak tedaviye başlanır. Bu tekniklerden en yaygın olarak kullanılanı ise IVF'dir (Fritz ve Speroff 2014).

IUI; Erkeğin spermelerinin rahim içerisine özel ince bir boru (kateter) yardımıyla verilmesidir. Verilmeden önce erkeğin spermelerin prostaglandinlerden ve proteinlerden arındırılması amacıyla özel bazı yöntemlerle yıkanıp hazırlanır. Bu hazırlama işleminde spermelerin hareketli ve normal olanları seçilir. Hazırlanmış olan spermeler rahim içerisine kateter vasıtasıyla verilir ve yumurtaya kolayca ulaşmaları sağlanır. Özellikle nedeni açıklanamayan kısırlık ve sperm sayısı, yapısı ve

hareketliliği normalin (%40'ın) altında olan hastalarda uygulanmaktadır (Schlegel 2004; Baka ve ark. 2009; Ombelet ve ark. 2014).

IVF; Kontrollü ovaryan stimülasyon sağlamak için ekzojen gonodotropin verilerek oluşturulan oositlerin, toplanması, laboratuvar ortamında fertilize edilerek, vajinal yoldan endometrial kaviteye transfer edilmesi işlemidir. Genellikle tubal faktör, endometriosis, erkek faktörü ve açıklanamayan infertilite de kullanılmaktadır (Fritz ve Speroff 2014).

ICSI; Tek bir spermin çok ince bir pipet yardımıyla oosit sitoplazmasına enjekte edilmesidir. İleri derece anormal sperm parametrelerine sahip, epididimden veya testisten cerrahi yöntemlerle elde edilen spermlerin kullanıldığı işlemlerde ve ileri kadın yaşı, oosit sayısının az olması gibi düşük fertilizasyon riski taşıyan hastalarda ise bu yöntem kullanılmaktadır (Gwatkin 1993; Pinhero 1999; Tandberg 2005).

Yardımcı üreme tekniklerine karar verildiğinde öncelikle iyi bir spermogram testi yapılmaktadır ve sonrasında ise semeni bir takım işlemlere tabi tutarak hazırlamak gerekmektedir. Sperm hazırlama teknikleri çok çeşitli olsalar bile bu tekniklerin genel amacı seminal plazmanın, hücresel artıkların, lökositlerin ve diğer elemanlardan ayrılarak yardımcı üreme teknikleri için gerekli motilite ve yeterli sayıda sperm elde etmektir. Semen hazırlama tekniklerinden hangisinin kullanılacağı infertil hastalara göre belirlemek gerekir. Laboratuvarlarda kullanılan birden fazla sperm hazırlama teknikleri mevcuttur. En önemli ve sıklıkla kullanılan sperm hazırlama tekniklerinden bazıları şunlardır: Basit yıkama (Simple Washing), yukarı yüzdürme (Swim-Up), Percol Gradyent yöntemleridir (Mortimer 1991).

Semen örneği içerisinde seminal sıvı, spermatozoa, epitelyal hücreler, immün hücreler vs. barınmaktadır. Semen içerisinde bulunan bu bileşikler sperm kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu sebepten dolayı spermin seminal plazma ile 30 dakikadan fazla muamele edilmemesi gerekmektedir. 30 dakikadan fazla muamele edildiği takdirde spermler fertilizasyon özelliğini kaybetmektedir. Bu nedenle YÜT'lerinde sperm hücresini seminal plazmadan ayırmak için sperm yıkama işleminin yapılması çok önemlidir (Aitken and Clarkson 1988).

Çalışmamızda kullandığımız ikinci bileşen olan kan, şekilli elemanlar ve plazmadan oluşmaktadır. Şekilli elemanlar kırmızı ve beyaz kan hücreleri ile trombositlerden ve az sayıda dolaşımda bulunan, kemik iliğinde yer alan megakaryosit isimli öncül hücrelerden meydana gelmektedir. Plazma ise proteinlerden, iyonlardan ve sudan oluşmaktadır. Plazma ve şekilli elemanlar santrifüj yardımıyla birbirlerinden ayrılabilir. Santrifüj sonrasında kırmızı kan hücreleri tüpün en alt kısmında yerini alır ve yaklaşık olarak kan hacminin %45 lik bir kısmını oluşturmaktadır. Plazma ise santrifüj işleminden sonra tüpün üst kısmında toplanır ve kan hacminin yaklaşık %55'lik bir kısmını oluşturur. Plazma ile eritrositlerin arasında kalan bölge ise beyaz kan hücreleri ve trombositlerin biriktiği bölge olan buffy coat'tır. Tek santrifüjde düşük g kullanıldığı zaman üç tabakaya ayrılmaktadır. Buffy coat kısmının bir miktar plazma ile beraber alınması ile Trombositten Zengin Plazma (TZP) elde edilmektedir (Alsousou J 2009; Dhillon ve ark. 2012; Ross ve Pawlina 2014).

Trombositten zengin plazmada kana göre daha fazla yoğunlukta trombosit bulunmaktadır. Sistemik dolaşımda bulunan olgun trombositlerin, çekirdekleri yoktur ve sitoplazmalarında büyüme faktörleri ve sitokinler bulunan alfa ve dens granüller içerirler. Trombositlerin periferik kan dolaşımındaki ömürleri 8-10 gündür. Trombositlerin asıl görevleri ise hemostazı yani kanın pıhtılaşmasını sağlamaktır. Ayrıca yara iyileşmesi, yeni kan damarı oluşumu gibi görevleri de bulunmaktadır. TZP 'de bol miktarda büyüme faktörleri ve sitokinler bulunmaktadır. Bu büyüme faktörleri ve sitokinlerden bazıları ise şunlardır; Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ), Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Vasküler Endotelial Growth Factor (VEGF), Connective Tissue Growth Factor, Insulin Like Growth Factor (IGF), Platelet Factor 4, İnterlökin 8, Keratinocyte Growth Factor. TZP içerdiği büyüme faktörleri ve sitokinler ile ortopedi, kozmetik, diş hekimliği, spor hekimliği, ürolojide kullanım alanları bulmuştur (Rendu ve Brohard 2001; İtaliano ve Hartwing 2007; Mehta ve Watson 2008).

TZP uygun fiyatlı, basit, yenilikçi ve etkileyici bir tedavi şeklidir. Aynı zamanda umut verici sonuçları olan ve yan etkisi olmayan bir yöntemdir. TZP'nin mevcut kullanım alanlarına ek infertilite tedavilerinde de kullanılabilirliğini, TZP elde edilmesi aşamasında kullanılan materyallerin rahatlıkla bulunabilmesi özelliğine bakıldığında ileride yapılacak çalışmalarda daha az zahmetli bir araştırma alanı

olduğunu gösterebilmeyi amaçladık. Maliyetinin düşük olmasından dolayı ise ekonomiye katkı sağlamaktadır. Son olarak bu çalışma sonrasında elde ettiğimiz değerlerle TZP'nin ev tipi IUI kitlerinin kullanıma açılımları söz konusu olabilir ve bu sayede ekonomiye bir katkı sağlaması beklenmektedir. TZP'nin sperm hazırlama tekniklerinden biri olan basit yıkama işleminde kullanılan medyumlara ek bir alternatif olmasını beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek Üreme Sistemi

#### 2.1.1. Erkek Üreme Sistemine Genel Bakış

Erkek üreme sistemi 4 ana bölümden oluşmaktadır (Aşçı ve ark. 2013);

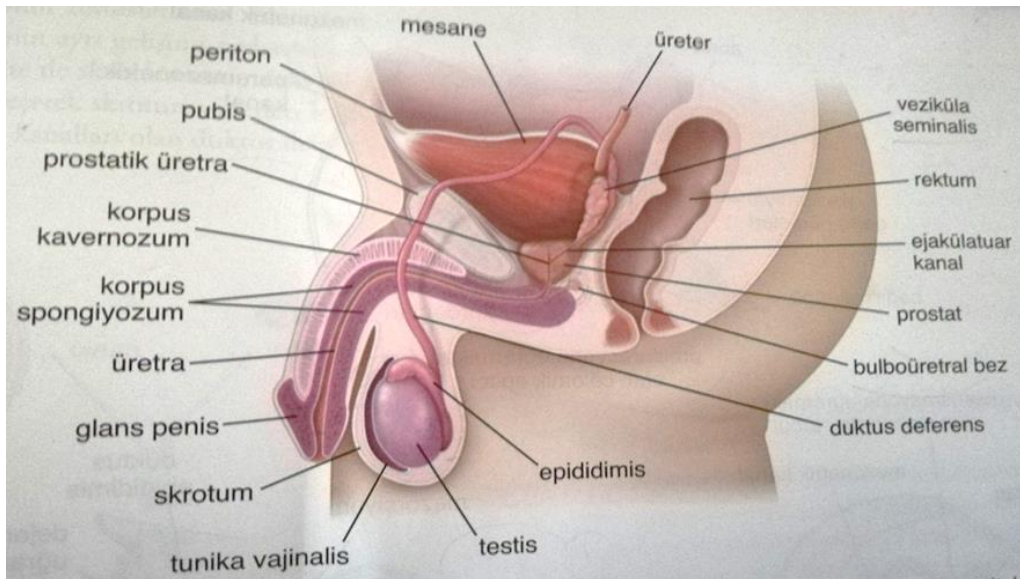
1) Spermatogenez (sperm üretimi), depolanması ve steroidogenezi (seks hormonları olan androjenlerin sentezlenmesi) sağlayan testislerden (erbezi) (Kadioğlu ve ark. 2004; Abraham 2006),

2) Spermatozoanın dışarıya taşınmasından sorumlu olan dış genital boşaltım kanalları; epididimis, vaz deferens, ejakülatuar kanal ve üretradan,

3) Salgıları sayesinde semen kitlesini oluşturan ve spermatozoaya besin sağlayacak sıvıların üretilmesinden sorumlu aksesuar cinsiyet bezleri olan seminal vezikül, prostat, bulbo üretral bezlerden,

4) Çiftleşme organı olan penis'ten oluşmaktadır.

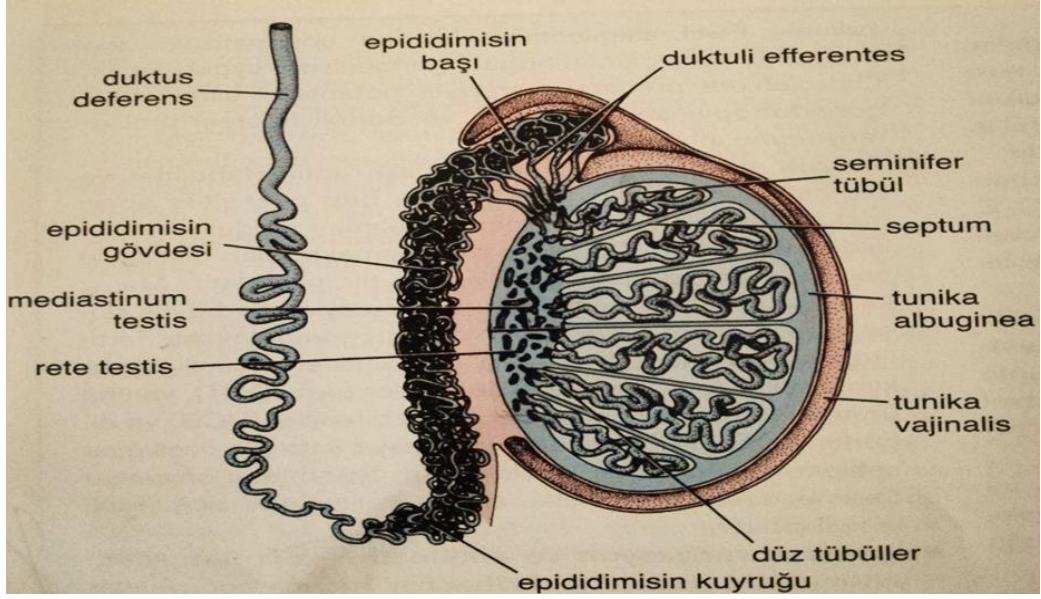
Erkek üreme sisteminin 2 önemli görevi vardır. Bunlardan ilki haploid erkek gametin (spermatozoa veya sperm) devamlı olarak üretilmesi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından, ikincisi ise erkek seks hormonlarının (androjenler) sentezi ve salgılanmasından sorumludur (Abraham 2006; Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 1).



Şekil 1: Erkek üreme sisteminin genel görüntüsü (Ross ve Pawlina 2014).

### 2.1.2. Testisler (Erbezi)

Yetişkin erkeklerin testisleri karın boşlukları dışında, skrotum içerisinde yer alan bir çift organdır. Böyle yerleşmesinin sebebi vücut ısısından  $2^{\circ}\text{C}$ - $3^{\circ}\text{C}$  düşük olmasını sağlayarak spermatogenez için uygun sıcaklığın sağlanmış olmasıdır. Normal bir spermatogenezin ısı  $34^{\circ}\text{C}$ - $35^{\circ}\text{C}$  arasında değişmektedir (Abraham 2006; Ross ve Pawlina 2014). Testisler 3 tabakadan oluşmaktadır ve bu tabakalar ise şunlardır; tunica vajinalis, tunica vasküloza, tunica albuginea'dır (Şekil 2,3).



Şekil 2: İnsan testisinin şematik gösterimi (Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 3: İnsan testisinin histolojik görüntüsü (Ross ve Pawlina 2014).

Her bir testis bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından 250-300 lopçuğa bölünür (Schlegel 2004; Ross ve Pawlina 2014). Her bir lopçuk kıvrımlı yaklaşık 1-4 arasında seminifer tübül içerir ve yetişkin testis ağırlıklarının yaklaşık olarak %90'nı seminifer tübüller oluşturur (Schlegel 2004). Seminifer tübül özelleşmiş seminifer epitel ile döşelidir ve iki belirgin hücre popülasyonuna sahiptir. Bu hücre popülasyonları (Abraham 2006; Borg ve ark. 2010; Ross ve Pawlina 2014);

### **2.1.2.1. Sertoli Hücreleri**

Destek hücrelidir. Bu hücreler puberteden sonra çoğalmazlar. Seminifer tübüllerin bazal membranından lümeneye doğru uzayarak komşu spermatogenik hücreleri çevrelerler (Fawcett 1979; Ross ve Pawlina 2014). Farklılaşmamış spermatogonyumlar bazal membrana yakındır, spermatosit ve spermatidler ise Sertoli epitelinin daha lümen merkezine yakın bulunur.

Bu hücrelerin görevleri;

- Gelişen spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek,
- Olgun sperm oluşumu sırasında (spermiyogenezis) spermatidler tarafından atılan rezidüel cisimlerini fagosite etmek,
- Olgun spermatidlerin seminifer tübül lümenine atılımını kolaylaştırmak,
- Seminifer tübül lümenine protein ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamaktır.

### **2.1.2.2. Spermatogenik Hücreler**

Spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidlerdir. Düzenli olarak çoğalıp olgun sperme farklılaşırlar. Bu hücreler komşu sertoli hücrelerinin arasında ilerleyici gelişim sergileyen, belirgin olmayan tabakalar halinde düzenlenmişlerdir (Şekil 4).

- Spermatogonyumlar: Bazal lamina üzerine oturmuş en immatür hücrelerdir. Seminifer tübülün bazal kompartmanında bulunup bazal lamina ile direkt ilişkilidir. Diploit yapılı germ hücresi olup puberteye kadar bölünmezler (Barratt 1995; Gardner 1997).

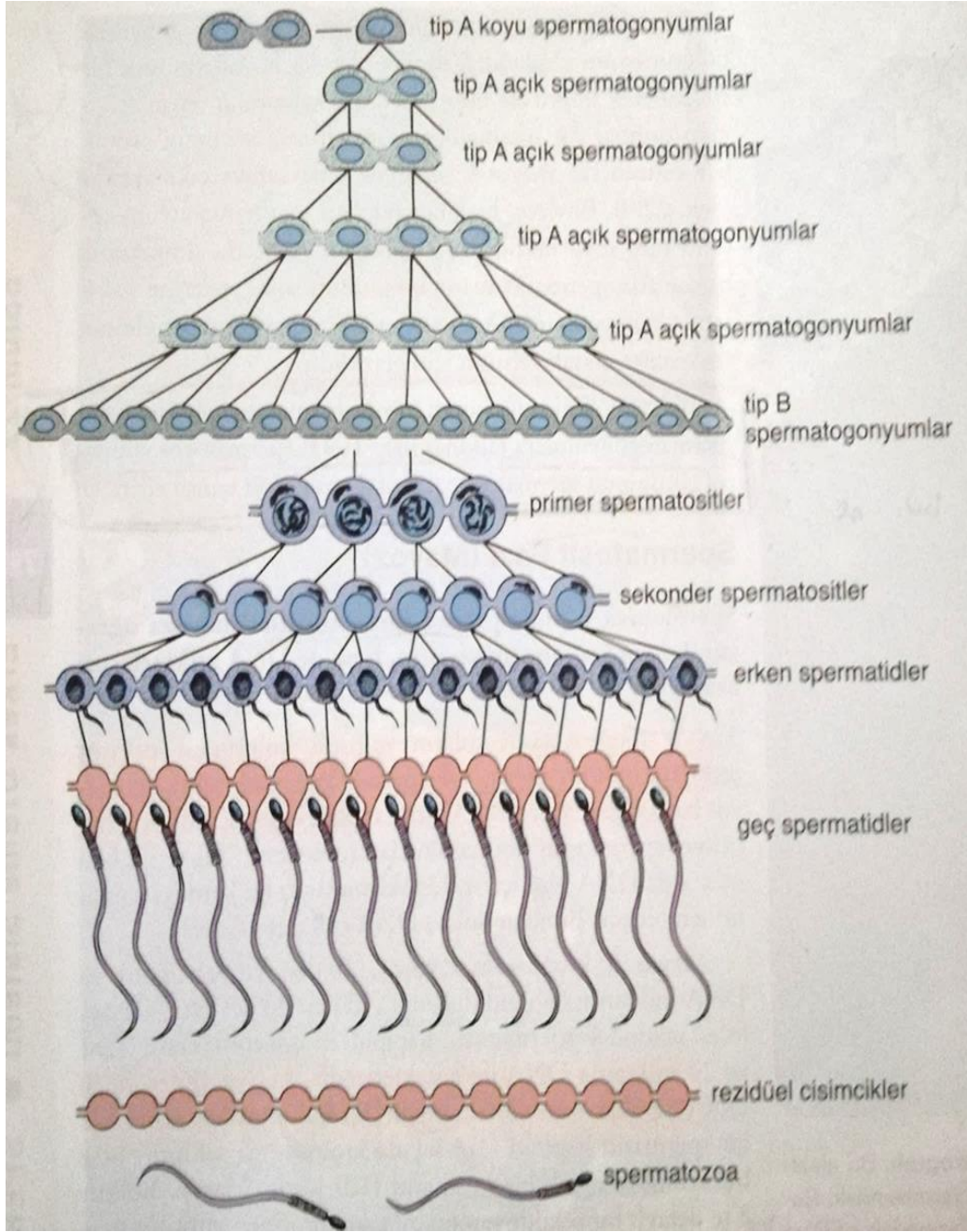
Çekirdeklerinin görüntüsüne göre 3 grupta incelenirler. Sırasıyla koyu tip A (Ad), açık tip A (Ap) ve tip B spermatogonyumlardır (Kadioğlu ve ark. 2004). Ad spermatogonyumlar: Seminifer epitelin kök hücreleri olarak adlandırılırlar. Düzensiz olarak bölünüp ya kendini oluşturur ya da bir çift Ap spermatogonyumları oluşturur (Hassa 2003). Ap spermatogonyumlar: Ardışık mitoz geçirip sayılarını artırır. Sperm oluşturacak farklılaşma sürecine girerler. Tip B spermatogonyumlar: Açık tip A hücrelerinin birkaç mitoz bölünme geçirmesiyle çoğalarak primer spermatositleri oluştururlar (Gartner ve Hiatt 1997; Ross ve Pawlina 2014).

- Spermatositler: En büyük boyutlu germ hücresidir. Bu primer spermatositler 46 kromozom sayısına ve 2n deoksiribo nükleik asit (DNA) miktarına sahip olup mitoz bölünmeyle oluşan DNA replikasyonu sonucunda 4n durumuna geçerler. DNA sentezi tamamlandıktan sonra hemen mayoz bölünmenin profaz aşamasına geçip uzun bir süre burada beklerler. Sonrasında ise birinci mayoz bölünmeyle seconder spermatositlere (2n) dönüşürler. Bu sekonder spermatositler mayoz bölünmenin interfaz aşamasında kısa bir süre kalıp hızla ikinci mayoz bölünmeye girerler (Oehninger 2001; Langman's 2012; Ross ve Pawlina 2014).

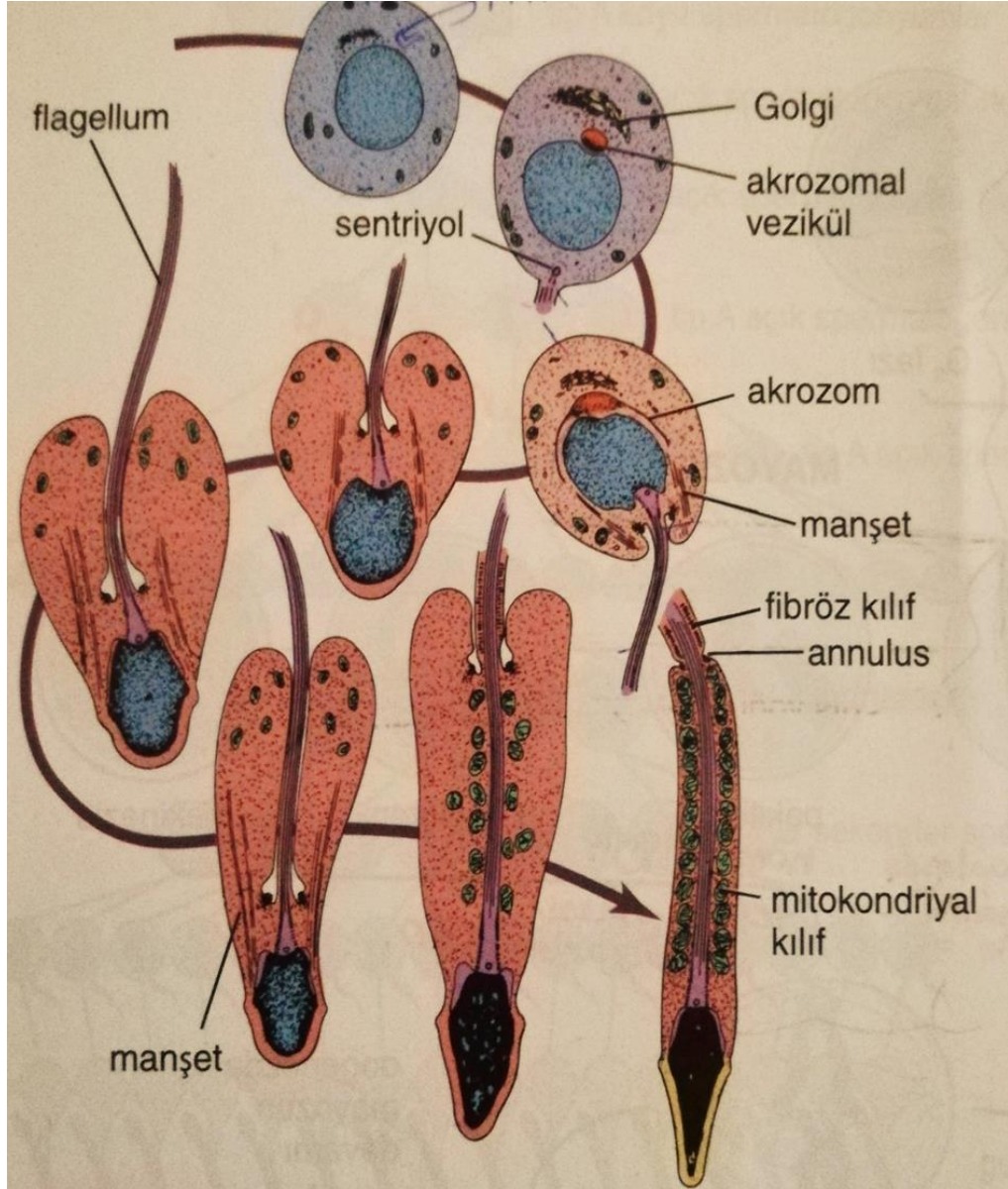
- Spermatidler: Bu bölünmenin sonucunda ise haploid yapıda spermatidler (n) oluşur.

İkinci mayoz bölünmeden önce DNA replike edilmediği için her bir spermatid haploid sayıda kromozoma sahip olur (Fawcett 1965; Ross ve Pawlina 2014).

Spermatid oluştuktan sonra spermatogenez yani sperm üretim işlemi tamamlanıp bu aşamadan sonra spermiyogenez süreci denen karmaşık bir farklılaşma sürecine girerler. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasını oluşturmaktadır. Bu aşamada hücre bölünmesi gerçekleşmez. Karmaşık olaylardan oluşan bu evre dört aşamada gerçekleşir; golgi fazı, kep fazı, akrozom fazı, olgunlaşma yani maturasyon fazıdır (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 5). Eğer spermatogenez sırasında bir aksaklık, bir yanlışlık olduğu takdirde hatalı sperm üretimi kaçınılmaz olmaktadır (A. Shafik 2006).



**Şekil 4:** Spematogenik hücrelerin nesillerinin şematik gösterimi (Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 5: İnsan spermatogenezin şematik gösterimi (Ross ve Pawlina 2014).

### 2.1.3. Olgun (Matür) Spermin Yapısı

Olgun insan spermi (spermatozoa) yaklaşık olarak 60 µm uzunluğundadır. Baş, boyun ve kuyruk olmak üzere 3 bölüme ayrılır (Flechon ve Hafez 1976; Erdemir ve ark. 2011; Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 6).

- **Baş kısmı:** Yassı, sivri ve 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığa sahiptir. Sperm DNA 'sını içerir. Nükleusun 3/2'lik kısmını akrozomal kep içermektedir. Bu akrozomal kep hyaluronidaz, nörominidaz, asit fosfataz vs. gibi hidrolitik enzimleri içermektedir. Bu akrozomal enzimler ovumun zona pellusidasının

delinmesi için gereklidir (Mack ve ark. 1983; Kadioğlu ve ark. 2011; Ross ve Pawlina 2014).

- **Boyun kısmı:** Yani bağlantı parçasıdır ve bir çift sentriyol bulunan dar bir parça olup baş ve kuyruk arasındaki bağlantı sağlamaktadır (Curry 1995; Ross ve Pawlina 2014). Uzunluğu yaklaşık olarak 0,3µm'dir (Gartner ve Hiatt 1997; Kadioğlu ve ark. 2004). Sentrozom organeli bulunur ve bu organelin asıl görevi yumurtanın bölünerek çoğalmasını ve embriyo gelişim sürecinin başlatılmasını sağlamaktır. Sperm oositi fertilize ettiği esnada, yumurtanın sentrozomu eridiği için sadece sperm sentrozomu hücre bölünmesindeki görevi üstlenir.

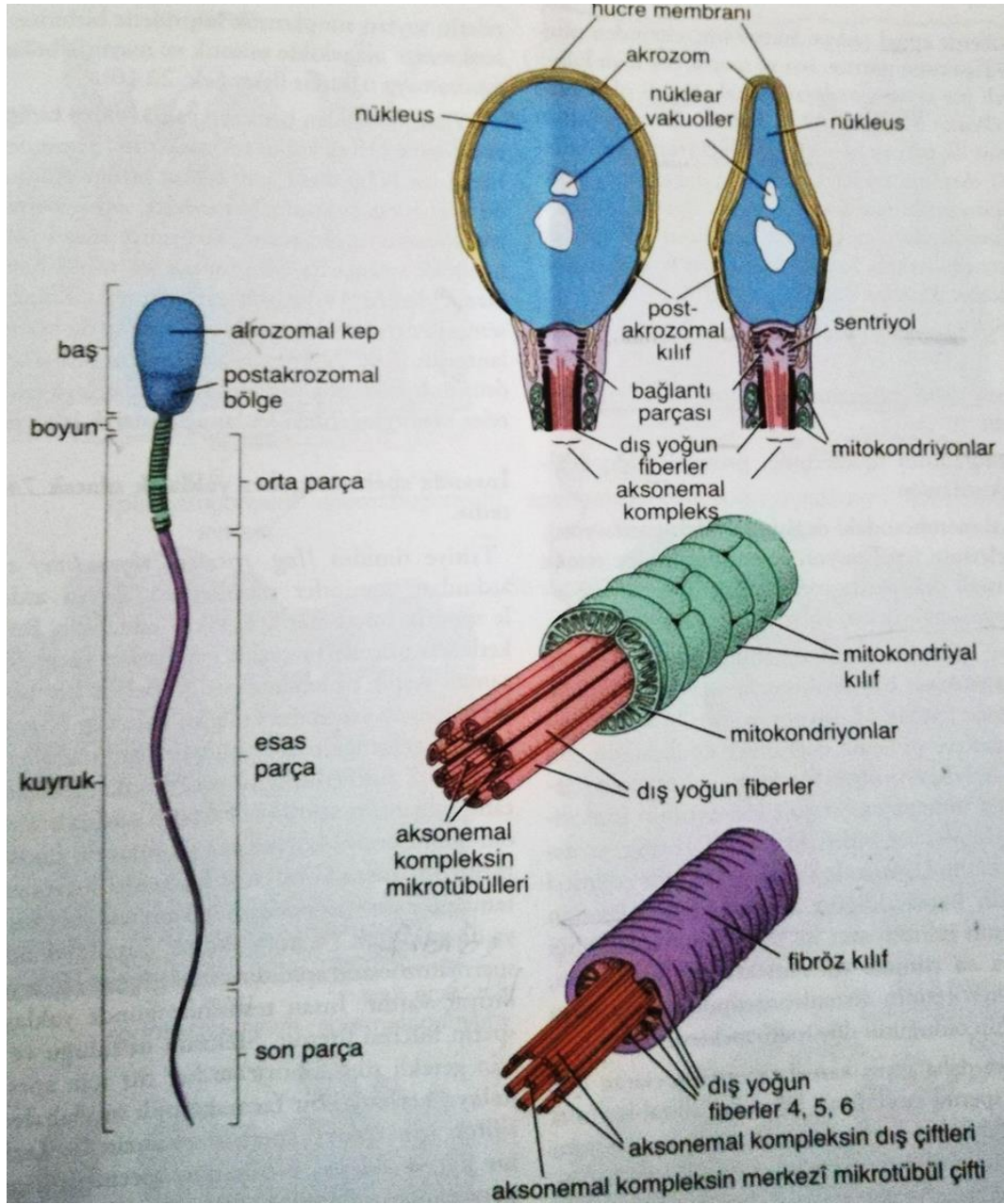
- **Kuyruk kısmı:** Spermin hareketinden ve enerjisinden sorumlu olup orta, esas ve son parça olmak üzere üç bölüme ayrılır (Erdemir ve ark. 2011).

Orta parçası yaklaşık 7 µm uzunluğuna sahiptir. Mitokondri içermektedir. Sarmal olarak düzenlenen bu mitokondrilerin oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler yapılı aksonem ve dış yoğun fiberler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan 9 adet uzamına seyreden kolonlardan oluşmaktadır. Aksonem etrafındaki bu mitokondriler sperm kuyruğunun hareketinden sorumlu olan enerjiyi sağlamaktadır (Abraham 2006; Alberts B ve ark. 2008).

Esas parça ise yaklaşık 40 µm uzunluğunda olup sperm kuyruğunun en uzun parçasıdır. Kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içermektedir (Favcet 1965; Ross ve Pawlina 2014).

Son parça ise olgun sperm kuyruğunun en kısa ve son bölümü olup yaklaşık 5 µm'lik bir uzunluğa sahiptir. Sadece aksonemal kompleksi içermektedir. Çünkü dış yoğun lifler ve fibröz kılıf erken sonlanmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Olgun sperm, dişi vücudunda yaklaşık olarak 48-72 saat canlı kalma özelliğine sahiptir. Spermatogenez yaklaşık olarak 70 güne denk gelmektedir. Bu 40 yaşına kadar devam eder lakin ileriki yaşlarda kesinti olmaz ama azalma meydana gelir. Sağlıklı erkek tek ejakülasyonda 3-4 cc semen çıkarmaktadır ve buda 200-300 milyon sperm taşır.



Şekil 6: İnsan spermatozoonunun şematik gösterimi (Ross ve Pawlina 2014).

## 2.2. Semen Analizi

### 2.2.1. Semen Laboratuvarında İncelenmesi

Ejakulattaki spermlerin içinde bulunduğu sıvıya seminal plazma denir. Buradaki spermler, semenin yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Semen alkali özelliindedir ve böylece üretra ile birlikte vajinadaki asidik ortamın nötralize edilmesine yardımcı olur. Spermlerin vajinadaki ortamdan korunması için tampon görevi görmektedir. Spermler için enerji kaynağı ve kadın genital organlarından salgılanan

sıvılar için de iyi bir çözücüdür. Semen hem erkek hem de dişi üreme kanallarında spermin taşınmasını etkileyen ve fertilize ovumun implantasyonunda rol oynayabilen prostaglandinleri içermektedir.

Spermiyogram (semen analizi, sperm tahlili) erkek kaynaklı infertilitenin durumu hakkında bizlere genel bilgiler veren laboratuvarın ilk ve en önemli adımıdır. Spermiyogramda spermlerin sayısı ve motilitesi değerlendirilir. Epididimdeki spermler tek ejakülasyonla tamamen boşalmadığı için bir sonraki ejakülasyondaki semenin kalitesini olumsuz yönde etkiler. Ayrıca spermatogenez 70 günlük bir süreyi kapsayan olaylar dizisidir. Eğer hasta bu süre zarfında ateşli bir hastalık vs. geçirilmiş ise spermatogenezde bir aksama meydana geleceğinden dolayı bir kere yapılan semen analizi bizleri doğru sonuca ulaştırmayacaktır. Bundan dolayıdır ki ikinci veya üçüncü numunelerin sonuçlarına bakıp ona göre karar vermekte fayda vardır (Kayıkçı ve ark. 2002).

Semen analizinin standardize edilmesi kişiden kişiye hatta aynı kişide bile cinsel perhiz süresi, ısı farklılığı, günün farklı saatleri, mevsimler, semen örneğinin verildiği yer, çalışma koşullarının farklılığından dolayı güçtür.

Ayrıca cinsel perhiz süresinin en az 2 gün, en fazla ise 8 gün olması gerekmektedir. Eğer 2 günden az olursa spermin sayısı ve hacmi, 8 günden fazla olması halinde ise spermin motilitesini negatif yönde etkileyecektir. Eğer epididimin işlevleri tam olduğunda spermin kromatini ve canlılığı cinsel perhiz süresinin uzamasından etkilenmez. Standart olarak 3-4 günlük perhiz kabul edilir.

Semen analizine semen likefiye olur olmaz başlamak sonuçların güvenilirliği açısından çok önemlidir. Bundan dolayı ejakülasyondan sonra tercihen 30-60 dakika içerisinde analizi gerçekleştirmek gerekmektedir.

Semen numunelerinin analizleri 12 başlık altında incelenmektedir. Bunlar;

#### **2.2.1.1. Volüm**

Semen ejakülasyonla atıldıktan sonra yoğun bir yapısı vardır. Semen miktarı yaklaşık olarak 2-6 ml arasında olmaktadır. Semen hacmi (volümü) kişiden kişiye, hatta aynı kişide bile farklılık göstermektedir. 6 ml'den yüksek ise hiperspermik, 1 ml veya daha az ise hipospermik denmektedir. Hiperspermide hastaların cinsel perhiz

süresi uzundur veya seminal sıvısı fazladır. Bu durum genel itibariyle subfertilite ile birlikte görülmektedir (Pryor ve ark. 1997; DSÖ 2010).

Semenin hacmi 1 ml'den düşük çıktığı zaman semenin doğru bir şekilde alınıp alınmadığına bakmak gerekmektedir. Spermin sayısı; semen örneğinin likefaksiyon durumu, sayım işlemi sırasındaki ışığa maruziyet, homojenizasyonun tam yapılıp yapılmadığı gibi faktörler sperm sayımının doğruluğunu etkilemektedir. Sayım yapılırken işlemin kısa sürede gerçekleştirilmesi, spermlerin mikroskop ışığının olduğu bölgede toplanması yüzünden yanıltıcı sonuç verebileceğinden önemlidir.

#### **2.2.1.2. Renk**

Semenin rengi normalde opak ve gri-beyazımsıdır. Hastaların uzun süreli cinsel perhizlerinde renk sarıya dönmektedir. Eritrositlerin (kırmızı kan hücrelerinin) bulunması halinde semenin rengi kırmızı-kahverengidir (kiremit rengi). Uzun süreli antibiyotik kullanımı mevcut ise semenin renksizleşecektir (Kalaycı 1986).

#### **2.2.1.3. Koku**

Prostat bezinin salgıladığı spermin oksidasyonundan dolayı atkestanesi çiçeği gibi kokmaktadır. Semen kokusu ve rengi cinsel perhiz süresine ve enfeksiyona bağlı olarak değişmektedir (Kayıkçı ve ark. 2002).

#### **2.2.1.4. pH**

Semen pH'sının normalde 7,2-8 arasında olması gerekmektedir (Dunphy ve ark. 1998). Çünkü semen içerisinde bulunan, veziküla seminalislerin salgıları bazik, prostat salgıları asidiktir. Bu salgıların dengede olması gerekmektedir (Gökçe 2011). Analiz yapılacağı zaman heterojen yapıdaki semen homojenize edilerek pH ölçme işleminin homojenizasyondan sonra gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Semenin pH ölçümü geç yapıldığı zaman pH yükselir. Çünkü seminal plazma sürekli CO<sub>2</sub> salgılamaktadır. Veziküla seminalislerin kronik enfeksiyonlarında ve idrarın semene karıştığı durumlarda pH 7nin altına inmektedir veya semen analizi geç yapıldığı takdirde pH 8,0'ın üzerine çıkabilmektedir.

Semenin pH'sı likefaksiyon gerçekleştikten sonra yaklaşık 30 dakikanın içerisinde ölçülmesi gerekmektedir. Lakin her ne olursa olsun üretildiği andan itibaren oluşan CO<sub>2</sub> kaybından etkilendiği için pH'sının ejakülasyondan sonraki bir saat içerisinde yapılmış olması gerekmektedir. Normal semen pH'sı 7,2-8,0 aralığında hafif alkalidir.

#### **2.2.1.5. Likefaksiyon**

Likefaksiyon spermin sıvılaşması, erimesi, çözünmesi anlamına denk gelmektedir (Gökçe 2011). Semen analizinde, ejakülat semen kabına alındıktan hemen sonra dış ortamla ilişkisi kesilir ve 37°C'de inkübe edilerek likefaksiyonun gerçekleşmesi beklenmektedir. Oda sıcaklığında da likefiye olmaya başlar. Likefaksiyon ortalama olarak 15 dakika içerisinde gerçekleşir ve bu sürenin ardından en fazla 30 dakika içerisinde semen analizinin ve motilite tayininin yapılmış olması gerekmektedir. Analiz yapılırken süre uzarsa semenin pH'sı ve ısıya bağlı etkenlerden dolayı spermin motilitesi düşecektir. Analiz yapılan mikroskobun tablasının sıcaklığı da analizi etkileyecek faktörler arasındadır. Tablanın sıcaklığı 27°C-37°C arasında olması gerekmektedir.

Ejakülasyon sırasında yoğun olan semen veziküla seminalislerin salgıladığı enzimin etkisiyle koagüle olmaktadır. Koagüle olan semenin 10-20 dakika içerisinde çözünmesi gerekmektedir. Eğer likefaksiyon süresi 60 dakika ve daha fazla sürdüğü takdirde bu durumu kaydetmek gerekmektedir. Likefaksiyon süresi uzadığı takdirde semenin viskozitesi artar. Analizi yapılacağı zaman çözünmesini enjeksiyon iğneleri ile yapabiliriz. Çözülmesi için yapacağımız işlemlerin hafice yapılması gerekmektedir. Eğer hızlı bir şekilde yaparsak bu durumda semen köpürecek neticesinde ise spermlerin motilitesinde bir azalma meydana gelecektir.

#### **2.2.1.6. Viskozite**

Normalde semenin yapısı hafif visközdür. Prostatit, vezikülit gibi enfeksiyonlarda viskozite artacaktır.

Semenin likefaksiyonu gerçekleştikten sonra tek kullanımlık pipet yardımıyla aspire edilir. Semen daha sonra yavaş yavaş damlatılarak kabında oluşturduğu uzun iplikli yapı, kesikli yapı veya küçük damlacıklar halinde düşmesine bakılarak

viskozite tayini yapılmaktadır. Oluşan ipliksi damla 2 cm'den fazla ise viskozitesini anormal olarak kayıt edebiliriz.

#### **2.2.1.7. Ejakülataın Ön Mikroskobik Olarak İncelenmesi**

Semende döküntü (debris), bakteri, epitelyal hücreler, kan hücreleri, aglütinasyon ve immatür spermeler vardır ve bu durumları göz önüne alarak inceleme yapmak gerekmektedir. Ayrıca aglütinasyonun olup olmadığına bakıp kontrol etmek gerekmektedir. Kontrolden sonra aglütinasyon varsa o zaman bir enfeksiyonun veyahut immünolojik bir problemin varlığını düşünmek gerekmektedir. Semende 1ml de 1 milyondan fazla lökositin bulunması halinde lökospermi olarak adlandırılmaktadır. Lökospermi genital boşaltım kanallarının ve daha çokta aksesuar bezlerinin enfeksiyonundan kaynaklanmaktadır. Semende lökositlerin bulunması Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) arttıracağından dolayı sonuçta sperm hücresinde harabiyete ve sitotoksik sitokinlerin salgılanmasına sebep olacaktır.

#### **2.2.1.8. Sperm Sayımı**

Sperm sayımı, motilitesi makler kamerasında yapılır (Kayıkçı ve ark.2002). Makler sayım kamerasının (Şekil 7) derinliği 0,01mm'dir.

DSÖ standartlarına göre spermeler ml de 15 milyon ve daha fazla olması kabul edilir. Total sperm sayısı sperm konsantrasyonunun tüm ejakülat volümü ile çarpılmasıyla hesaplanır ve en düşük referans değeri ise 39 milyondur. Gebeliğin oluşması için ejakülattaki sperm sayısı 60-80 x10<sup>6</sup> milyon/ml'dir (Gökçe 2011).

Semende tüm ejakülatta hiç sperm bulunmadığı örnekler azospermi diye adlandırılmaktadır. Azospermi nedenleri arasında Y kromozom defektleri, azospermiye spesifik AZF gen delesyonları, spermatogenez anomalileri, hormonal vs. sayılabilmektedir. Oligospermi, semen örneğinde normalden az sperm bulunmasıdır. Oligospermi teşhisi konulmadan önce cinsel perhiz süresinden ve semenin tam olarak toplandığından emin olunduktan sonra böyle bir teşhis konulması gerekir. Numuneye bakıldıktan sonra oligospermi denildiği takdirde sperm morfoloji ve motilite değerlendirilmesi önem kazanmaktadır. Normospermi, normal sayıda sperm bulunması, polispermi de ise normalden daha fazla sperm bulunması demektir. Bu terimin yerine hiperspermi de kullanılmaktadır.



Şekil 7: Makler sayım kamarası

#### 2.2.1.9. Sperm Motilitesi

Spermilerin dişi genital yolundaki ters akıntıya karşı 3-3,6 mm/ dk hareket etme kapasitelerine +rheotaxis adı verilir. Eğer buradaki bazı kimyasallara ilgi duyarak daha hızlı ilerlemesine ise + chemotaxis adı verilir.

Sperm parametresine etkili olan en önemli iki parametre vardır. Bunlar; ısı ve süredir. Mastürbasyonu kolaylaştırmak için krem kullanılması, semenin cam kaba toplanması, vajinal sekresyon ile karışmış olması, çok düşük veya çok yüksek ısıda laboratuvara getirilmesi motiliteyi düşüren etkenler arasındadır. Sperm motilitesi, erkeğin yaşı, cinsel perhiz süresi, testislerin maruz kaldığı dış faktörler (ısı, radyasyon, kimyasal maruziyet), ortamın ıssısı gibi faktörlerden etkilenmektedir. Sperm elde edilme yöntemi motiliteye doğrudan etkisi vardır. Muhafaza koşulları (ortam ıssısı, saklandığı kabın toksisitesi, pH'sı) sperm motilitesinde ise dolaylı yoldan etki eden faktörler arasındadır.

Sperm motilitesi numune sıvılaştıktan sonra 30 dakika ya da en geç bir saat içerisinde bakılması gerekmektedir. Eğer incelenirken oluşan gecikmeler motilitede bozukluklara sebep olacaktır. Sperm motilitesi hesaplanırken makler kamarası kullanılmaktadır. Makler kamarasında (Şekil 7) 10 satır ve sütundan oluşan toplam 100 kare vardır. Semen numunesinden alınıp makler kamarasının 0,01 mm derinliğine

semen numunesinden 0,5 µl damlatılıp motilite analizi yapılmaktadır.

**Sperm motilite analizinde kullanılan sınıflandırma:**

+4 motilite: Doğrusal ve hızlı hareket eden spermelerdir.

+3 motilite: Doğrusal olarak ilerler ancak +4 motiliteli gruba göre daha yavaş hareket eden spermelerdir.

+2 motilite: Yerde hareketlilik gösteren spermelerdir. Örneğin yalnızca kamçı hareketi veya baş kısmının zorla hareket hali vs.

+1 motilite: Hareketsiz spermelerdir. Bu grupta yer almaktadır. Bu gruba immotil sperm denilmektedir.

DSÖ 2010 standartlarına göre sperm toplam motilite değeri %40'tır. İleri hareketlilik içinse %32'dir (DSÖ 2010).

Hareketsiz spermeler immotil olarak adlandırılmaktadır. İmmotil sperm ve ölü sperm aynı kategoride değerlendirilmezler. İmmotil spermeler canlı olabilmektedir. Spermelerin ölü olmasına nekrospermi denir. Bu ölü spermeler ile immotil spermeleri ayırt etmek için özel boyalar kullanılmaktadır. Bu durum klinik açıdan son derece önemlidir. Canlı ancak hareketsiz spermelerin yüksek oranda olması, sperm kuyruğunda morfolojik bir sorunun olduğu anlamına gelmektedir. Hareketsiz ve ölü spermelerin miktarı yüksek olması epididimde patolojik bir sıkıntı olduğunun göstergesi olabilir.

**Tablo 1:** Spermiyogram yapılırken baz alınan parametreler

NORMOSPERMİ	ml'deki sperm sayısı 20 milyon/ml veya daha fazla olması
OLİGOSPERMİ	ml'deki sperm sayımı $20 \times 10^6$ 'dan daha az olması
POLİSPERMİ	ml'deki sperm sayımı $20 \times 10^6$ 'dan daha fazla olması
AZOSPERMİ	Tüm ejakulatta hiç sperm bulunmamasıdır
ASPERMİ	Seminal plazma üretiminin olmayışı
NEKROSPERMİ	Spermilerin ölü olması
ASTENOSPERMİ	Motilitenin düşük olması (%30 dan daha az olması)
TERATOSPERMİ	Morfolojik olarak bozukluğu fazla olan
LÖKOSPERMİ	Semende lökositlerin $1 \times 10^6$ /ml'den daha fazla olması
HİPERSPERMİ	Semen hacminin 6 ml'den daha fazla olması durumu
HİPOSPERMİ	Semen 1 ml veya daha az olması

### 2.2.1.10. Sperm Morfolojisi

Sperm baş, orta parça ve kuyruktan oluşur.

Baş: 2-3  $\mu\text{m}$  genişliğinde ve 4-6  $\mu\text{m}$  uzunluğunda olmalıdır. Post-akrozomal bölge vakuol içermemelidir. Başı yassı, oval ve sınırları düzgün olmalıdır. Başının %40-70'ini akrozomal kep kaplamalıdır. Böylece çekirdek-akrozomal kep oranı, akrozomal kepin düzensiz görünümü veya hücre sınırlarının düzgün olmayışı incelenerek normal ve anormal ayrımı yapılmalıdır (Mack ve ark. 1983; Kadioğlu ve ark. 2011; Ross ve Pawlina 2014).

Orta parça: incedir, sınırları düzgündür ve uzunluğu yaklaşık sperm başı kadar olması gerekmektedir. Orta parça uzunluğu ve genişliği yönünden incelendikten sonra droplet (sitoplazmik artık) içerip içermediği kontrol edilmelidir. Sitoplazmik droplet başın yarısından büyük olmamalıdır (Abraham 2006; Alberts ve ark. 2008).

Sperm kuyruğu: 50-55  $\mu\text{m}$  uzunluğunda, giderek incelen yapısı, uzunluğu, kalınlığı ve kıvrıklığı yönünden incelenir. Ayrıca çift kuyruklu spermeler varsa

bunlarda belirtilmelidir (Erdemir ve ark. 2011).

Belirtilen şartları taşımayan sperm yapısal olarak anormal olarak değerlendirilir. Örneğin baş kısmında: armut baş, iğne baş, şekilsiz baş vs. boyun ve orta parçada ise bükülmüş, kalın, ince boyun vs. kuyrukta ise çift, ince, kıvrık vs. bu sperm yapıları anormal olarak kabul edilir (Delilbaşı 2008). Eğer morfolojik olarak anormal sperm normal sperm oranla fazla ise bu duruma teratozoospermi denir.

Ayrıca aglütinasyon hareketli sperm başı, boynu ve kuyrukları tek tek veya çeşitli kombinasyonlarla birbirlerine yapışması durumudur (DSÖ 2010). Aglütinasyon immünolojik bir nedene bağlı olacağından (antisperm antikorların bulunduğunu gösterir) dolayı farklı testlere ihtiyaç duyulabilir. Agregasyon ise hareketsiz sperm birbirlerine; hareketli sperm sperm dışı hücrelere, mukus iplikçiklerine veya debrise yapışması ile gözlenebilmektedir. Anormal sperm özel boyalar kullanılarak bakılabilir.

#### **2.2.1.11. Sperm Canlılığı (Viabilite)**

Sperm canlılığı sperm hücre membran bütünlüğüyle alakalıdır. Hücre ölümünden sonra, sperm hücre zarının geçirgenliğinin artması boyaların hücre içine geçişine neden olur. Hareketsiz sperm ölü değildirler. Bu hareketsiz ve ölü sperm ayırmak için özel boyalar kullanılır. Normal semen %25'ten fazla ölü sperm içermemesi gerekmektedir. Değer çok yüksek olursa tedavi olanaksızdır.

Semen numunesi alındıktan ve likefaksiyon süreci tamamlandıktan hemen sonra tercihen 30 dakika içerisinde sperm viabilitesinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Dehidratasyon ve ısı değişikliği sperm viabilitesini olumsuz yönde etkileyeceğinden dolayı bu zararlı etkileri sınırlamak için ejakülasyondan sonraki ilk 1 saat içerisinde semenin mutlaka değerlendirilmesi gerekmektedir.

#### **2.2.1.12. Ejekülataın Genel Görünümü**

Normal şartlarda likefiye olmuş semen örneği; homojen, gri-opak bir görünüme sahiptir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse, opak görünmeyebilir veya herhangi bir nedenden dolayı rengi farklı olabilir. Örneğin; eritrositler varsa kırmızı kahverengi veya hasta bazı vitamin ilaçları kullanıyorsa sarı renkli olabilir (Kadioğlu ve ark. 2011).

### 2.3. IUI, IVF, ICSI için Semen Hazırlığı

Cinsel ilişki sırasında vajene bırakılan spermeler hızla servikal kanala geçerek seminal plazmanın olumsuz etkilerinden kurtulur. Servikal mukus doğal bir bariyer olarak motiliteyi artırıcı, hiperaktivasyonu sağlayıcı etkileriyle çok önemli rol oynar. YÜT’nde servikal mukusun bu belirtilen işlevleri in-vitro sperm hazırlama (sperm yıkama) teknikleriyle sağlanır (Mortimer 1991a). Sperm hazırlama teknikleriyle;

- Semende sperm için kontaminasyona neden olabilecek hücrelerden, hücre döküntülerinden, prostaglandinlerden vs. arındırılır. Seminal plazma spermin kapasitesini engelleyen çeşitli faktörler içermektedir. Bu faktörlerden dolayı da spermin semen sıvısı içerisindeyken dölleme yeteneği yoktur. Günümüzde birden fazla sperm hazırlama teknikleri mevcuttur (Aitken ve Clarkson 1988; Mortimer 2000b; Henkel ve Schill 2003).
- ROS’dan kurturulur. Bu ROS’lar semendeki nötrofillerden, spermatozoa veya anormal spermeler tarafından ortama verilirler ve bunlarda infertiliteye neden olabilmektedirler. Bu radikaller spermin fonksiyonunu etkilemektedir.
- Motil ve fertil spermeler elde edilir ve bu durum YÜT’nin başarısı için istenen bir durumdur. Spermelerin kapasitesi ve akrozom reaksiyonları başlatılmış olur. Sperm seminal plazmadan uzaklaştırılır

#### 2.3.1. Sperm Hazırlama Yöntemleri

Tüp bebek merkezlerinde kullanılan sperm hazırlama yöntemleri in vivo koşulları taklit ederek in vitro koşullarda kaliteli sperm seçimini, bir başka deyişle fertilizasyon kapasitesi düşük spermeleri elemeyi amaçlamaktadır.

Yardımcı üreme tekniklerine karar verildiği zaman öncelikle iyi bir spermogram testi yapıldıktan sonra semeni bir takım işlemlere tabi tutarak hazırlamak gerekir. Sperm hazırlama teknikleri çok çeşitli olsalar bile bu tekniklerin genel amacı seminal plazmanın, hücresel artıkların, lökositlerin ve diğer elemanların ayrılarak yardımcı üreme teknikleri için gerekli motilite ve yeterli sayıda sperm elde etmektir.

Semen hazırlama tekniklerinden hangisinin kullanılacağı infertil hastalara göre belirlemek gerekir.

Sperm hazırlama teknikleri:

- 1) Basit yıkama (Simple Washing)
- 2) Yukarı Yüzdürme (Swim-Up)
- 3) Percol Gradyent

### **2.3.1.1. Basit Yıkama (Simple Washing)**

Seminal sıvıda spermatozoa, epitelyal hücreler, immün hücreler vs. barınmaktadır. Semen içinde bulunan bu bileşimler spermin kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu sebepten dolayı spermin seminal plazma ile 30 dakikadan fazla muamele edilmemesi gerekmektedir. 30 dakikadan fazla muamele edildiği takdirde spermiler fertilizasyon özelliğini kaybetmektedir (Aitken ve ark. 1988). Bu nedenle YÜT'lerinde sperm hücrelerini seminal plazmadan ayırmak için sperm yıkama işleminin yapılması çok önemlidir (Harrison 1976).

Basit yıkama, kaba tabirle sperm hücrelerinin seminal plazmadan uzaklaştırılması işlemidir. Yıkama işlemi semen numunesi alındıktan sonra 1 saat içerisinde yapılması gerekmektedir. Basit yıkama işlemi konik dipli steril santrifüj tüpleri kullanılarak yapılmaktadır. Likefiye olan semen numunesi 1-1 oranında kültür medyumu ile karıştırılarak 300-500g'de 10 dakika santrifüj yapılır. Üst fazlar dikkatlice aspire edilerek atılır. Birleşik sperm pelletlerini 1 ml kültür medyumu içerisinde yavaşça pipetleyerek yeniden süspansiyon hale getirilir. Üç ila beş dk boyunca 300-500 g'de tekrardan santrifüjleme işlemi yapılır. Üst faz dikkatli bir şekilde aspire edilip atılır. Son olarak sperm konsantrasyon ve motilitesinin belirlenebilmesi için, sperm pelletini yavaşça pipetleyerek son kullanıma (örn. İnseminasyon gibi) uygun kültür medyumu hacminde yeniden süspansiyon hale getirmek gerekmektedir (DSÖ 2010). Tüp bebek merkezlerinde yapılan bu santrifüj süreleri, devirleri vs. farklılık göstermektedir. Burada dikkat edilecek noktalardan birisi ROS açığa çıkmasını engelleyecek standartların belirlenmiş olması gerekmektedir.

Bu basit yıkama işleminde en yüksek konsantrasyon da sperm elde edilirken motil (hareketli) spermilerin oranı yüksek değildir. Semen örneklerinin kalitesi iyi olduğu zaman, bu işlem yeterli olmaktadır. Genellikle intrauterin inseminasyon işlemi

için spermleri hazırlamak amacıyla kullanılır (DSÖ 2010).

### **2.3.1.2. Yukarı Yüzdürme (Swim-Up)**

Motil spermlerin yerçekimine ters yönde, uygun medyum içerisinde yukarı doğru hareket etmesi ve sonrasında bunların toplanması esasına dayanmaktadır. Bu işlem yüzdürme (Swim- Up) tekniği olarak bilinmektedir. Yüksek motilitedeki spermler lökositlerden, hücresel atıklardan, kısaca seminal plazmadan ayrılır (Agarwal ve ark. 2001).

Bu yüzdürme işleminde semen numunesine yaklaşık 1 ml medyum koyulur. Spermlerin medyuma karışmadan yüzerek katman oluşturması gerekmektedir. Yüzme işleminin gerçekleşmesi için 37°C'de ve 1 saat süreyle, yüzey alanını artırmak içinde 45°C eğimle inkübe edilir.

Bu prosedür, yıkama yöntemine göre daha az sayıda sperm eldesi sağlarsa da, spermler arasında motiliteye göre seçim yaptığı için semendeki hareketli sperm yüzdesinin düşük olduğu durumlarda yararlıdır.

### **2.3.1.3. Percol Gradyent Yöntemi**

Subfertil bireylerde alınan semen örnekleri yüzdürme ya da basit yöntem (washing + swim-up) yetersiz kaldığı durumlarda percol gradiyent yöntemi kullanılır. Yüzdürme ve standart yöntemlerde spermler kendi hareket kabiliyetine göre yüzeyde toplanır. Percol yönteminde ise artan percol gradiyentlerini aşması gerekmektedir. Böylece bu yöntem sperm seçiciliğini artırır. Bu yöntemle semen debristen, epitel hücrelerden vs. daha kolay ayrılabilir (Baker ve ark. 1993).

Percol gradiyentleri tüp içerisinde sırasıyla ve birbirleri ile karışmamaları için son derece yavaş, mümkünse 45°'lik açıyla tüpün iç yüzeyine yavaşça bırakılmalıdır. En altta seçiciliği en fazla olan %90, 95 veya 100'lük percol, 1 ml olacak şekilde koyulmalı, üzerine sırasıyla tercih edilen percol gradiyentleri yerleştirilmelidir.

## **2.4. Kan ve Trombosit**

Kan, hücrelerden ve plazma deneni protein bakımından zengin sıvıyı içeren özelleşmiş bir bağ dokusu türüdür. Eritrositler (kırmızı kan hücresi) kan hacminin

yaklaşık olarak %45'lik bir kısmını oluşturmaktadır. Eritrositlerin hemen üzerinde bulunan beyaz (bulutumsu) örtü yani buffy coat kısmı lökositleri (beyaz kan hücreleri) ve trombositleri (kan pulcukları) içermektedir. Lökositler ve trombositler kan hacminin yaklaşık %1'lik kısmını oluşturur. Üst kısımdaki şeffaf sıvıya ise plazma denir. Plazma kana akışkanlık özelliğini verir. Plazmada çözünen gazlar, proteinler, elektrolitler gibi çözücü maddeler bulunur (Abraham 2006; Alsousou 2009; Dhillon ve ark. 2012; Ross ve Pawlina 2014).

Megakaryositler, kaynağını pluripotent kök hücreden alırlar. Trombositler, öncül hücre olan megakaryositlerden trombopoiez sırasındaki bir glikoprotein olan trombopoietinin kontrolü altında oluşan sitoplazmik parçacıklardır. Trombositler küçük (2-4 µm) hücrelerdir. İçerisinde mRNA bulundurlar lakin çekirdek bulundurmazlar. Sitoplazmalarında büyüme faktörleri ve granüller bulundurlar. Trombositler kemik iliğinden dolaşıma geçtikten sonra disk benzeri yapılar şeklinde dolaşırlar. Ömürleri yaklaşık 8-10 gündür (Rendu ve Brigitte 2001; Mehta ve Watson 2008; Dhillon ve ark. 2012).

Bu 8-10 günlük süre içerisinde dolaşımda sessiz olarak beklerler. Bu sürenin sonunda ise makrofajlar tarafından temizlenirler. Herhangi bir tehdide (doku hasarı, mikrobiyal vs.) karşı sayılarını artırırlar (Yeaman 2014a).

#### **2.4.1. Trombositlerin Görevleri**

Pıhtılaşmayı başlatmak (akut kan kaybını önlemek), konağın savunmasını sağlamak, yara iyileşmesi ve yeni kan damarı oluşumunu aktive etmek, damar onarımını, rejenerasyonu, primer hemostaz ve tromboz oluşumunu bünyelerinde bulunan granüllerdeki büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin aracılığıyla yapmaktadırlar (Klinger ve Jelkmann 2002; Yeaman 2010b; Arora 2009; Foster 2009).

#### **2.4.2. Trombositlerin Zonları**

Trombositler organizasyon ve işlevlerine göre 4 farklı zona ayrılmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Bunlar;

1. **Periferik zon:** Kalın bir glikokaliks örtüsüyle kaplı olan bir hücre membranından oluşmaktadır. Glikokaliks, glikoproteinlerden, glizkozaminoglukanlardan ve

plazmadan adsorbe edilmiş birkaç pıhtılaşma faktöründen oluşmaktadır.

2. **Yapısal zon:** Plazma membranını destekleyen bir ağ oluşturur. Mikrotübüllerden, aktinden, miyozinden ve aktin-bağlayan proteinlerden oluşmaktadır. Aktin filament ağının hemen altında demet halinde 8-24 mikrotübül bulunur. Bunlar dairesel olarak yerleşmişlerdir ve trombositin disk şeklinin sürdürülmesinden sorumludur.
3. **Organel zonu:** Trombositlerin merkezini kaplar. 3 tip granülün yanında mitokondri, peroksizom ve glikojenden oluşur.
4. **Membran zonu:** 2 tip kanallar sisteminden oluşmaktadır. Bunlar açık kanaliküler sistem (AKS), megakaryosit sitoplazmasına katkıda bulunmaz ve trombositlerin kanallarının gelişimsel atıklarıdır. Yoğun tübüler sistem (YTS) kalsiyum iyonları için depo bölgesi olarak hizmet eder.

Trombositler yüksek konsantrasyonlarda sitokinler ve  $\alpha$  (alfa)-granüller içerisinde depolanan büyüme faktörlerini içerir. Bu büyüme faktörleri, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, vasküler endotel büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü beta, fibroblast büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, bağ dokusu büyüme faktörü ve interlekin-8'i içerir. Büyüme faktörlerine ek olarak, trombositler, yara iyileşmesini başlatan fibronektin, vitronektin ve sfingosin 1-fosfat gibi diğer maddeleri içerir (Jo ve ark. 2013).

### 2.4.3. Trombositlerdeki Granüller

Trombositler içeriklerine ve yoğunluklarına göre üç değişik granüle sahiptirler (Shiba 1988; Yeaman 1997; Rendu ve Brigitte 2001; Barrietons 2008; Yeaman 2010b). Bunlar:

- 1) **Alfa granüller:** Trombositlerde miktar olarak en fazla bulunan granüldür. İnaktif durumda olan büyüme faktörleri için depo görevi görmektedir. Esas olarak fibrinojen, pıhtılaşma faktörleri, kinosidinler, mitojenik faktörler, plazminojen aktivatör inhibitörleri platelet kaynaklı büyüme faktörlerini içerir. 300-500 nm çapındadır. Bu granüldeki içerikler hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, anjiogenezi, damar onarımını, pıhtılaşmayı ve trombosit agregasyonunun (kümelenme) başlangıç aşamasında çok önemli rol oynar. Bu granüldeki büyüme faktörlerine örnek verilecek olunursa

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), Transforming Büyüme Faktörü- beta (TGF-B), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörleri(VEGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) vs.dir.

2) **Dense granül (delta granüller):** Yoğun granülde denmektedir çünkü electron mikroskopunda ışığı yoğun olarak absorbe ederler. Yaklaşık olarak 250-300 nm çapında olup alfa granüllere göre daha küçüktür Daha az bulunurlar ve alfa granüllere göre daha yoğundurlar. Esas olarak damar bölgesinde oluşan hasarda trombositlerin adezyonunu, vazokonstriksiyonu (damar daralması) kolaylaştıran adenzin difosfat (ADP), adenzin trifosfat (ATP), serotonin, dopamin, histamin, biyoaktif mineral olan  $Ca^{+2}$  ve  $PO_3^{-2}$  (fosfat) içermektedir.

3) **Lizozomal granüller (lambda granüller):** Yaklaşık olarak 175-250 nm çapına sahiptir. Proteolitik, hidrolaz enzimlerini içermektedir. Trombosit –fibrin pıhtılaşma reaksiyonu, yara iyileşmesini ve doku yenilenmesini artırır. Asit hidrolaz gibi lizozomal enzimleri içerir.

#### **2.4.4. Trombosit Aktivasyonu**

Trombositler aktif değilken şekil itibariyle düzdür lakin aktif oldukları zaman şekil değiştirerek psödopod geliştirirler. Bu sayede trombositler agregasyona uğrar ve granüllerinin salınımı gerçekleşmektedir (Dhillon ve ark. 2012).

Trombosit aktive edildiği zaman ortama büyüme faktörü (alfa ve dens granüllerdeki molekülleri) salgılamaya başlar. Farklı yollar ile aktive olurlar. Aktive oldukları farklı yollardan örnek verilecek olursa; ADP, kollajen, epinefrin, trombosit aktive edici faktör (PAF), soğuğa maruz bırakılması, doku bütünlüğünün bozulması, trombin veya kalsiyum klorit ile etkileşimdir. Son olarak ise değişik dalga boylarındaki ışınlarla maruz bırakılarak aktive olması sağlanır. Aktive etmek için en çok kullanılan maddeler ise sığır ve insan trombin ve kalsiyumdur (Yeaman 2010b; Yeaman 2014c).

### **2.5. Trombositten Zengin Plazma (TZP) Biyolojisi**

#### **2.5.1. TZP**

ACD'li tam kana santrifüj prosedürleri uygulanarak yapılan ve normal tam kana göre kıyaslandığında daha yüksek trombosit konsantrasyonuna sahip plazmaya

trombositten zengin plazma denir. Santrifüj yapıldıktan sonra plazma ile kırmızı kan hücreleri arasında kalan bölgede beyaz kan hücrelerin ve trombositlerin biriktiği gözlenir. Trombosit miktarı tam kanda 150000-350000/ $\mu$ l iken TZP’de ise bu oran 1000000/ $\mu$ l üzerinde olabilir (Marx 2001; Dhillon ve ark. 2012).

Tam kanda %95 kırmızı kan hücreleri (eritrosit), %5 trombosit (platelet), %1 kadar da lökosit bulunmaktadır. Özel santrifüj işlemlerinin ardından bu oran TZP’de tersine dönerek trombosit miktarı %95’e çıkar (Plachokova ve Adelina 2008; Dhillon ve ark. 2012).

Trombositler yaklaşık olarak 35 ila 70 kDa ağırlığındadır.

## 2.5.2 TZP’nin Alt Grupları ve Büyüme Faktörleri

### 2.5.2.1. TZP’nin Alt Grupları

TZP içinde bulundurduğu fibrin ve lökositlere bağlı olarak alt gruplara ayrılmıştır (Dhurat ve Sukesh 2014; Ehrenfes 2014; Tosun ve Akdağ 2017). Bunlar:

- 1) ***Saf-plateletten zengin plazma (Pure Platelet Rich Plasma, P-PRP)***: Bu alt grupların içinde en sık kullanılan bu gruptur. Aktivasyondan sonra düşük yoğunluklu fibrin ağı içerir. Lökosit içermez lakin trombosit içeriği fazladır.
- 2) ***Lökosit ve Platelet Rich Plasma (L-PRP)***: Lökositten zengin olan gruptur. Fibrin yoğunluğu düşüktür. Piyasada bulunan kitlerin çoğu bu gruptandır.
- 3) ***Lökosit ve Eritrosit Platelet Rich Plasma (LE-PRP)***: Hem eritrosit hem de lökositten zengindir olan gruptur.
- 4) ***Pure Platelet Rich Fibrin (P-PRF)***: Lökosit içermeyen yüksek fibrin yoğunluğuna sahip olan gruptur.
- 5) ***Lökosit ve Platelet Rich Fibrin (L-PRF)***: Lökosit ve trombosit içeren yüksek fibrin yoğunluğuna sahip olan gruptur. Antikoagülan içermez sadece kandan elde edilir.

### 2.5.2.2. TZP İçerisindeki Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri protein yapısındadırlar. Büyüme faktörlerinin büyük çoğunluğu alfa granüllerde zimojen formunda bulunmaktadır. Trombositlerdeki büyüme faktörleri hücrelerin çekirdeğine etki etmez. Sitoplazmik membran üzerindeki proteinlere etki ederek görev yaparlar. Hücre içi sinyal yolakları üzerinden kendine özgü reseptörlerine bağlanarak hücrenin DNA'sına etki ederek gen ekspresyonunu uyarırlar. Büyüme faktörleri hücrelerin yenilenmesini, bölünmesini, kollajen sentezini (protein sentezini) hızlandırır.

TZP'nin içeriğinde bol miktarda çeşitli büyüme faktörleri bulunmaktadır. nemli olan bazı büyüme faktörleri ve fonksiyonları (Eppley ve ark. 2004; Everts ve ark. 2006; Mehta ve Watson 2008; Arora 2009; Engebretsen ve ark. 2010; Dhillon ve ark. 2012);

**1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörleri (VEGF):** Anjiogenez ve damar geçirgenliğini arttırır. Endotel hücreleri için mitogenezi uyarır (Marx ve ark. 1996; Ferrara ve ark. 2003; Reddy ve ark. 2012).

**2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF):** Mezenkimal hücreler, kondrositler ve osteoblastlar için mitogenetik. Kondrositlerin ve osteoblastların büyümesini ve farklılaşmasını destekler (Marx ve ark.1998; Otooole 2001).

**3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF 1 Ve 2-):** Fibroblastlar için kemotaktik ve protein sentezini uyarır. Kemik oluşumunu arttırır (Laron 2001; Efeoğlu ve ark. 2004).

**4. Transforming Büyüme Faktörü (TGF-B):** Mezenkimal hücre proliferasyonunu uyarır. Endotel, fibroblastik ve osteoblastik mitogenezi düzenler. Kollajen sentezini ve kollajenaz sekresyonunu düzenler. Diğer büyüme faktörlerinin mitojenik etkilerini düzenler. Endotel kemotaksisini ve anjiogenezi uyarır. Makrofaj ve lenfosit proliferasyonunu inhibe eder (Ksander 1990; Efeoğlu ve ark. 2004).

**5. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü A Ve B (PDGF):** Mezenkimal hücreler ve osteoblastlar için mitogenetik. Fibroblast, glial veya düz kas hücrelerinde kemotaksi ve mitogenezi uyarır. Kollajenaz salgısını ve kollajen sentezini düzenler. Makrofaj ve nötrofil kemotaksisini uyarır (Marx ve ark. 1998; Gustafsson ve Kraus 2001; Doessing

ve ark. 2010).

**6. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF):** Endotel kemotaksisini veya anjiyogenezi uyarır. Kollajenaz salgısını düzenler. Epitel veya mezenkimal mitogenezi uyarır (Dereka ve ark. 2006; He ve ark. 2009; Ott 2010).

### **2.5.3 TZP'nin Kullanım Alanları**

TZP tedavisindeki asıl amaç insan vücudunun tamir mekanizmasını artırmak ve yaralanma sonrasında ise iyileşmeyi hızlandırmaktır. Yani inflamasyonu baskılamak değil aksine tetiklemektir. TZP, içindeki büyüme faktörleri ve biyoaktif moleküller vesilesiyle iyileşme sürecinde önemli rol oynamaktadır. Bu biyoaktif moleküller TZP'nin inflamasyon, koagülasyon, proliferasyon, migrasyon, anjiogenezi artırıcı etkilerin de bu moleküllerin rolü göz ardı edilemeyecek kadar büyüktür (Rendu ve Brigitte 2001; Schwarz 2009; Dhillon ve ark.2012).

TZP kemik oluşumunda (Tomoyasu ve ark. 2007), eklem kıkırdak onarımında (Sánchez ve ark. 2003a), aşil tendon onarımında (Sánchez ve ark. 2007), artroplasti (Gardner ve ark. 2007), epikondilit (Hechtman ve ark. 2011), osteoartrit (Wang-Saegusa ve ark. 2011), rotator cuff onarımında (Randelli ve ark. 2011) kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

TZP; veterinerlik, diş hekimliği, spor hekimliği, ortopedi, üroloji, plastik ve rekonstrüktif cerrahi, kalp-damar cerrahisi, dermatoloji, kozmetoloji vs. gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır (Sampson ve ark. 2008; Dhillon ve ark. 2012).

Erken over yetmezliği tedavisinde TZP kullanılmaktadır. Trombositler direkt olarak yumurtalıklara verilmiş ve büyüme faktörleri ile oosit üretiminde pozitif bir sonuç elde edilmiştir. Ayrıca TZP ile tedavi yumurtalık gençleştirme olarak bilinmektedir (White ve ark. 2012; Dawood ve Salem 2018). Tekrarlanan implantasyon başarısızlığında TZP kullanılmış ve sonuçlar yüz güldürücü olmuştur. TZP'nin intrauterin infüzyonu, endometriyal büyümeyi ve alıcılığı artırmanın bir yolu olarak tanımlanmıştır (Chang ve ark. 2015; Walesco ve ark. 2016; Dawood ve Salem 2018). Endometriyum yetersizliğinde de TZP kullanılmaktadır. Endometriyumu yetersiz olan kadınlarda yapılan çalışmada TZP uygulamasını takiben 48 saat sonra endometriyum kalınlığı (<7 mm) artmıştır (Zadehmodarres ve ark. 2017; Dawood ve

Salem 2018).

IGF-1 ve 2, TZP içerisinde bulunan bir büyüme faktörüdür ve Leydig hücre farklılaşmasını ve fonksiyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Lin ve ark. 1990; Baker ve ark.1996). Ayrıca spermatogenezde önemli faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır (Spiteri-Greech 1992; Tsuruta 1995).

Ayrıca cilt gençleştirilmesi, daha sık ve gür saçlar vs. için başvuru yöntemlerinden biridir TZP. Bu vesile ile TZP'nin uygulanacak bölgeye enjeksiyonu yapıldığı takdirde o bölgede bir miktar doku hasarı ve kanama oluşup, bu hasar ve kanama TZP içindeki trombositlerin uyarılması için gereken trombini sağlayacaktır. Bundan dolayıdır ki çoklu enjeksiyon veya iğneleme yolu ile hasarlı dokularda kanalların açılması trombositleri aktive eden faktörleri önceden açığa çıkaracağı için uygulanacak yöntemler arasında yerini almaktadır.

#### **2.5.4. TZP'nin Hazırlanması**

TZP hazırlandıktan sonra 4 saat ile 3 gün arasında etkinliği giderek azalmaktadır. Ayrıca antikoagülan işlemlerinden geçirildiğinden dolayı ve kontaminasyonu engellemek maksadıyla istenilen bölgeye uygulanma süresi 8 saati geçmemelidir. En hızlı bir şekilde uygulanması gerekmektedir. Çünkü daha önceden sentezlenmiş olan büyüme faktörlerinin yaklaşık %95'i ilk bir saat içerisinde salgılanmaktadır. TZP tedavisindeki amaçlardan biriside süreyi olabildiğince kısa tutmak ve büyüme faktörlerinin konsantrasyonunu artırmaktır (Janse ve Van der 2017; Hersant ve ark. 2018).

TZP'nin kalitesi, hazırlanırken birçok faktöre bağlıdır. Düşük kalitedeki TZP'nin etkisinin olmadığı söylenmiştir. Bundan dolayı da hazırlanma aşaması önem arz etmektedir. Araştırmacılar TZP'nin hazırlanma yollarını araştırmak için çeşitli araştırmalar yapmışlar ve bu vesile ile TZP'nin etkisini artırmak için ticari kitleri piyasaya çıkarmışlardır. Ticari kitler steril ve kullanıma hazır TZP solüsyonları elde edilmesiyle avantajlı lakin maliyet açısından yüksek ve sınırlı miktarda TZP elde edilmesi açısından ise dezavantajlıdır. Ticari kitler arasında yapılan santrifüj yöntemleri (santrifüj hızı, devir sayısı vb.), elde edilen trombosit konsantrasyonları vs. farklıdır. Bu parametreler araştırılmış ve herkes tarafından kabul edilen bir standart oluşturulamamıştır (Kısaarslan 2017).

TZP, hastadan alınan venöz kanın antikoagülan bir madde ile karıştırılıp santrifüj edilmesiyle elde edilir. Antikoagülan madde olarak sodyum sitrat, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), heparin, asit sitrat dekstroz (ACD) kullanılmaktadır. TZP hazırlamak için genellikle asit sitrat dekstroz A (ACD-A) veya sodyum sitrat kullanılır. Antikoagülan madde trombositlerin aktive olmasını ve santrifüj öncesinde ve anında kanın pıhtılaşmasını engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Antikoagülan/kan oranı ACD-A için 2/8, sodyum sitrat için 1/9 olması gerekmektedir. Belirtilen miktarda enjektör ile alınan antikoagülan madde ve kan, enjektörün ters-düz yapılmasıyla tamamen karışması sağlanır ve santrifüj işleminden sonra fazlara ayrılması beklenir. Santrifüj işleminde kandaki şekilli elemanlar ağırlıklarına göre çökme yaparlar. Ağırlıklarına göre eritrositler (kırmızı kan hücreleri) tüpün alt kısmında toplanırken, sırası ile üst kısmında lökosit, trombosit içeren sarı renkli plazma görülmektedir (Marx 2001a; Tözüm ve Demiralp 2003; Dhurat ve Sukesh 2014).

Düşük sıcaklık trombositleri aktive edeceğinden dolayı santrifüj işleminin oda sıcaklığında gerçekleşmesi önerilmektedir. TZP çift santrifüj kullanılarak da elde edilebilmektedir. Çift santrifüj yöntemiyle istenilen konsantrasyonlarda trombosit elde edilmektedir.

### **2.5.5. TZP'nin Avantaj ve Dezavantajı**

Avantajı; kişinin kendi kanından (otolog) alınmasıdır. Bundan dolayı da alerjik reaksiyon, insan immün yetmezlik virüsü (HIV, human immunodeficiency virus) ve hepatit gibi bulaşıcı hastalıklar ve enfeksiyon yönünden riski çok azdır (Everts PA ve ark. 2006; Dhillon ve ark. 2012; Amoczky ve Shebani 2013).

Uygulanması kolaydır, güvenlidir ve biyokimyasal hiçbir ürünü gerektirmez. Sağlanan etki uzun solukludur ve iyileşme süreci ise hızlıdır. A-TZPden salgılanan büyüme faktörleri hücrelerin çekirdeklerine etki etmez ama hücrelerin membran reseptörleriyle etkileşime girip hücre içi sinyal yolunu başlatır ve böylece hücrelerin çoğalmasını artırmış olur (Hamma ve ark.2004). Ayrıca içeriğinde bulunan antikor, proteolitik enzimler, lökositler vb. doğal antibiyotik görevi gördüğünden dolayı enfeksiyon riskini azaltmış olur.

Dezavantajı ise; Kişinin kendi kanından alındığı için normal şartlar altında bir

sıkıntı oluşturmaz lakin TZP lokal anestezi ile birlikte kullanıldığında alerjik reaksiyon yönünden dikkatli olmakta fayda vardır (Amoczky 2013). Ayrıca enjeksiyon bölgesinde skar dokusu oluşumu ve kalsifikasyon bildirilmiştir (Sampson ve ark.2008). Sığır trombini ile dış kaynaklı aktivasyon uygulandığı zaman faktör 5, 11 ve trombine karşı antikor gelişir ve hayatı tehdit eden pıhtılaşma bozukluğu ortaya çıkar (Spero 1993; Ortel ve ark. 2001; Dhillon ve ark. 2012; Amoczky 2013). Dolayısı ile sığır ürünlerine alerjisi olanlarda, trombosit işlev bozukluğu olanlarda (koagülasyon defekti olan) ve antikoagülan tedavisi görenlerde kullanılmaması gerekmektedir. Ayrıca kronik enfeksiyonlar da, fasiyal kanseri vb. durumlarda da kullanılmaması gerekmektedir. Deri altından yağa enjekte edildiği zaman deride döküntü, kızarıklık ve ağrı görülebilmektedir.

### **3. MATERYAL – METOD**

‘Basit Yıkama (Simple Washing) Yöntemi İle Hazırlanmış Semen Örneklerinde Trombositlerden Zengin Plazmanın (TZP) Etkisinin Değerlendirilmesi’ konulu tez çalışması, deneysel nitelikte bir araştırmadır. Çalışmamızın etik kurul onayı, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulunun 26 Ekim 2018 tarihinde 2018/1535 sayılı kararı ile alındı (Ek-1). Çalışmamızda kurumumuzdan herhangi bir mali destek alınmamıştır. Çalışmanın tüm basamakları Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi Androloji Laboratuvarında gerçekleştirildi ve aynı araştırmacı tarafından yürütüldü.

#### **3.1. Semen Numunesinin Analizi**

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesine Kasım 2018- Nisan 2019 tarihleri arasında sperm analizi için başvuran ve gönüllü onam formları (Ek-3) ile bilgilendirilen yaşları 18-50 arasında olan 20 gönüllü hastadan semen örnekleri çalışmaya dâhil edildi. Gönüllülerden alınan semen numuneleri 72 saatlik (3 günlük) cinsel perhiz sonrasında, merkezimizdeki sperm verme odasında mastürbasyon yöntemiyle, hastanın gözü önünde poşetinden çıkarılarak verilen, steril, toksik olmayan polypropilen kaplara (Resim 2) isim, soy isim, saat ve protokol numarası yazıldıktan sonra alındı ve makler kamarası (Şekil 7) kullanılarak rutin spermiyogramlarına Üniversitemiz Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi Androloji Laboratuvarında bakıldı. Semen numunelerinde azospermi grupları hariç tüm spermiyograma gelen spermler kullanıldı. Spermler likefiye olduktan sonra semenden alınan 10 µl, örnek derinliği 0.01 mm olan Makler sayım kamarasının (Sefi – Medical Instruments) ortasına damlatılıp üzerine grid camı kapatıldı ve Nikon T1A Input AC ışık mikroskobunda toplamda 40X büyütme altında spermiyogram analizleri değerlendirildikten sonra atık hedefli çalışmamıza başlandı.



**Resim 1:** Steril spermiyogram kabı



**Şekil 7:** Makler sayım kamarası

### 3.2. TZP Hazırlanması

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi Ar-Ge amaçlı laboratuvarında gönüllülerinden onam formları (Ek-2) ile bilgilendirilen 18-50 yaşları arasındaki hastalardan, kanın pıhtılaşmasını önleyen asit sitrat dekstroz-A (ACD- A)'lı enjektör ile kan alındı (Şekil 8). Burada ACD/kan oranı 2/8 dir.



**Şekil 8:** Gönüllüden alınan ACD'li kanın enjektöre çekilmiş görüntüsü

Gönüllü hastalardan alınan bu ACD'li 10 cc kan tüplere eşit hacimde olmak suretiyle dibi konik tüplere bölündü (Şekil 9) ve 1100 devirde 22 dk. santrifüj edilerek (Şekil 10) fazlara ayrılması beklendi.

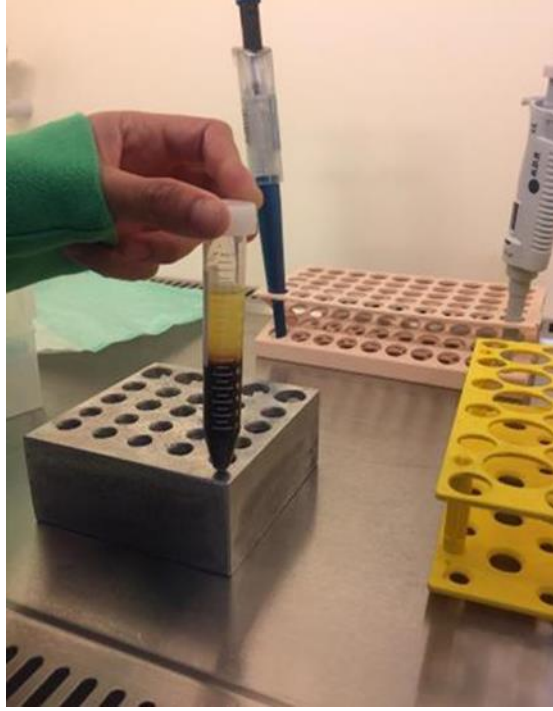


**Şekil 9:** Alınan kanın dibi konik tüplere eşit hacimde paylaşılması



**Şekil 10:** Eşit hacimde paylaşılacak tüplerin santrifüj aşaması

Santrifüj sonrasında ise fazların ayrılması gözlemlenen tüplerde (Şekil 11) üstte kalan plazma enjektörün iğnesi ile dikkatlice şekilli elemanların bulunduğu faza girilmeden alındı (Şekil 12) ve steril santrifüj tüplerine aktarıldı (Şekil 13).

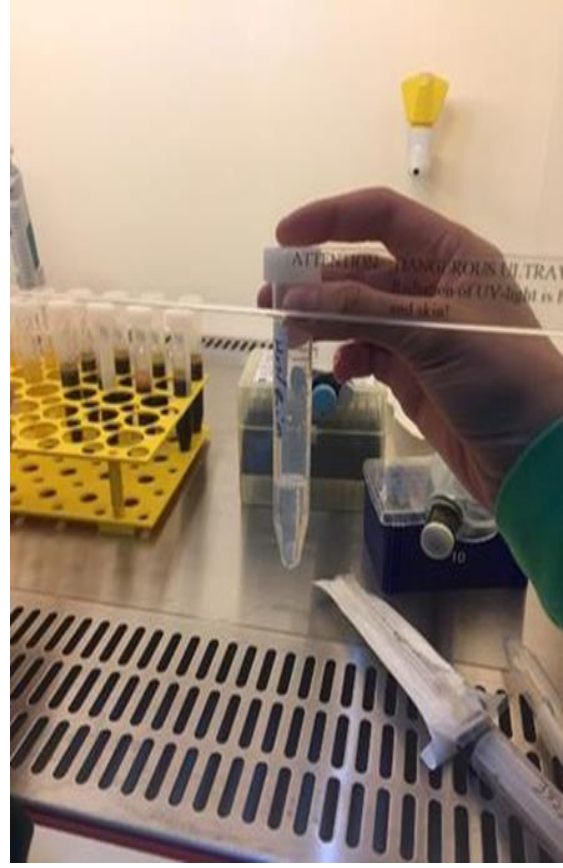
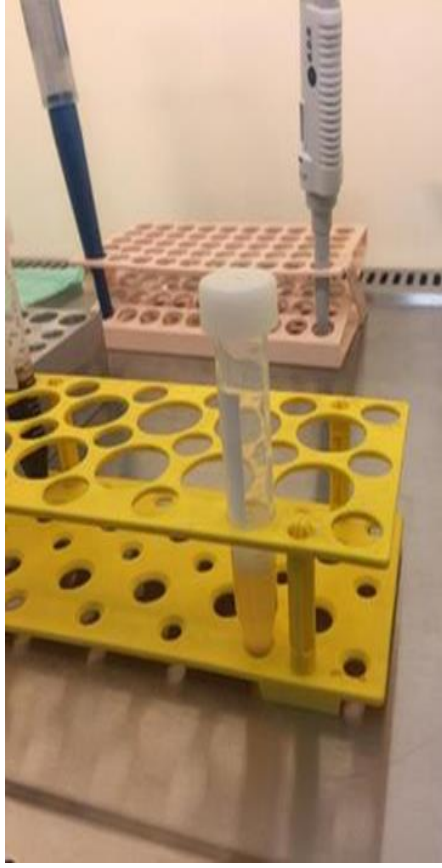


**Şekil 11:** Santrifüj sonrası plazma ve şekilli elemanların oluştuğu faz oluşumu



**Şekil 12:** Üst plazma fazının çekilme aşaması

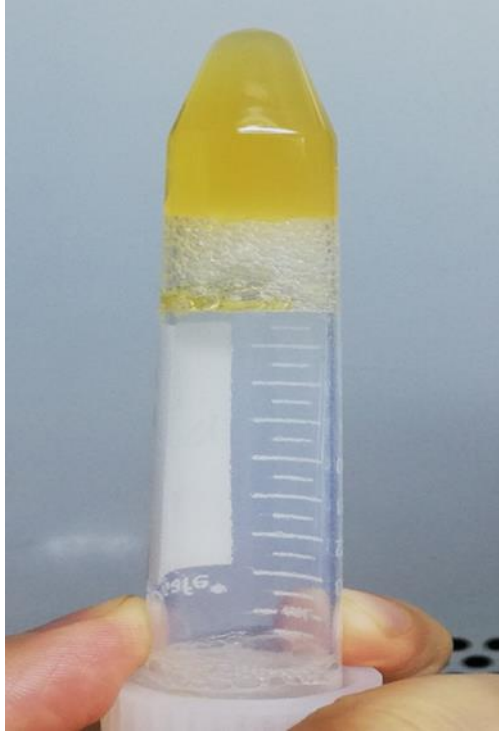
Patlatmak için 1:10 oranında hesaplanan steril olarak çekilen  $\text{CaCl}_2$ 'yi (Şekil 14) steril santrifüj tüplerine alınan plazmanın içine yavaşça bırakılarak köpürtmeden çalkalandı.



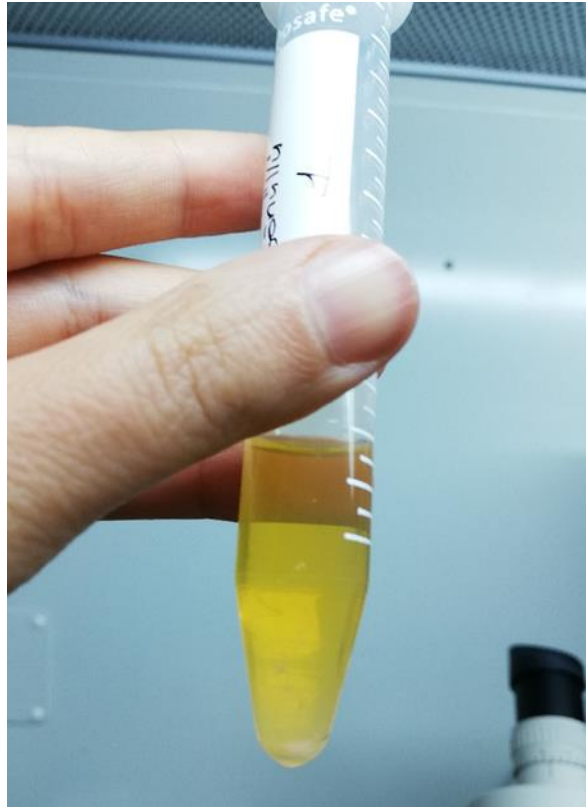
**Şekil 13:** Üst fazın çekilmiş görüntüsü **Şekil 14:** Trombositleri aktive etmek için kullanılan %10'luk  $\text{CaCl}_2$

Çalkalama işlemi bittikten sonra  $37^\circ\text{C}$  veya oda ısısında inkübe edildi ve bu süre zarfında trombositlerin aktivasyonu gerçekleşti. Patlamasının ardından fibrin oluşup jelleşmenin gerçekleşmesi beklendi (Şekil 15).

İnkübasyondan sonra yani plazma jelleştikten son olarak 2700 rpm'de 15 dakika ikinci santrifüjü yapıldı. Santrifüjden sonra elde edilen pıhtı-fibrin atıldı (Şekil 16) ve süpernatant kısmı ise deney çalışmamız için kullanıldı.



**Şekil 15:** TZP'nin jel formu



**Şekil 16:** Santrifüjden sonra oluşan pellet

### 3.2. Deney Aşaması

Kontrol ve Deney grubu olmak üzere ayrılan semen örneklerinden, kontrol grubuna basit yıkama işlemi yapıldı. Kontrol grubunda ki semen PBS ile 1\1 oranında (900µl) homojenize edilip yıkama işlemine geçildi. 1500 rpm'de 10dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı. Çıkan pellet PBS ile 1 saat homojenize edildi ve 1 saat PBS ile inkübasyon esnasında 15dk arayla (15.-30.-45. dakikalar) 10µl alınıp makler sayım kamerasında sayı, motilite analizleri yapıp kaydedildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra tekrar 1500 rpm'de 10dk da 2. santrifüjü yapıldı ve elde edilen süpernatant atılıp çıkan pellet yine 900 µl PBS ile süspanse edildi. Süspanse edildikten sonra son kez 10µl alıp makler sayım kamarasında sayı, motilite analizleri yapıldı ve çıkan değerler kaydedildi.

Semen örneklerinden, deney grubuna basit yıkama (simple washing) yapıldı. Deney grubunda ki semen PBS ile 1\1 oranında (900µl) homojenize edilip yıkama işlemine geçildi. 1500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilip ve süpernatant kısmı atıldı. Çıkan pellet ise oda sıcaklığında çözünmüş A-TZP (Aktive olmuş TZP) ile homojenize edildikten sonra inkübasyona bırakıldı. 15dk arayla (15.- 30.45. dakikalar) 10µl alınıp makler sayım kamerasında sayı, motilite analizleri yapıldı. İnkübasyon bittikten sonra tekrar 1500 rpm'de 10dk da 2. santrifüjü yapıldı ve süpernatant atılıp çıkan pellet 900 µl A-TZP ile süspanse edildi. Süspanse edildikten sonra son kez 10µl alıp makler sayım kamarasında sayı, motilite analizleri yapıldı ve çıkan değerler kaydedildi.

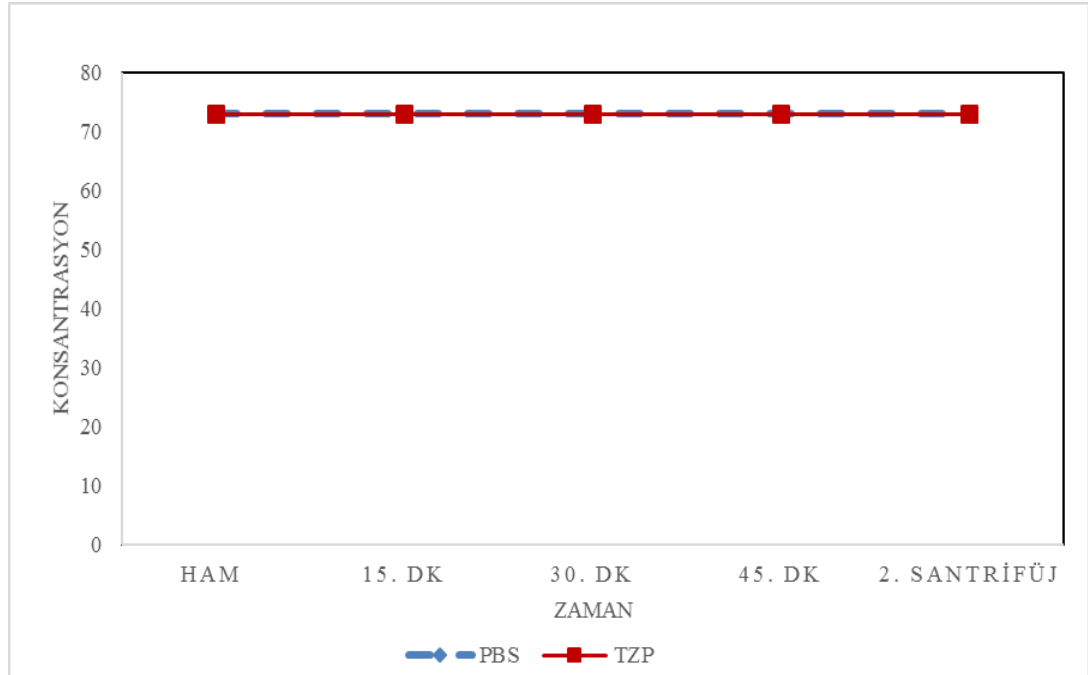
Her iki grubun spermiyogram parametre (sayı, motilite) değerlerine bakılıp karşılaştırma yapıldı. Elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir. Konsantrasyon ve motilite için ortalama+ standart sapma veya medyan (Q1-Q3) değerleri verildi. Bu parametreler karma etki modelleri (mixed effects models) kullanılarak analiz edildi. Analizler SAS University Edition 9.4 programı ile yapıldı.  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamıza 20 tane gönüllü hasta katıldı. Spermiyograma gelen ve azospermi hariç tüm hastalar çalışmamıza dâhil edildi. Spermiyogram analizleri yapıldıktan sonra azospermi olduğu anlaşılan spermeler çalışma dışı bırakılıp yeniden gönüllü formlarıyla bilgilendirilen hastalardan tekrardan örnekler alınıp çalışmamıza devam edildi.

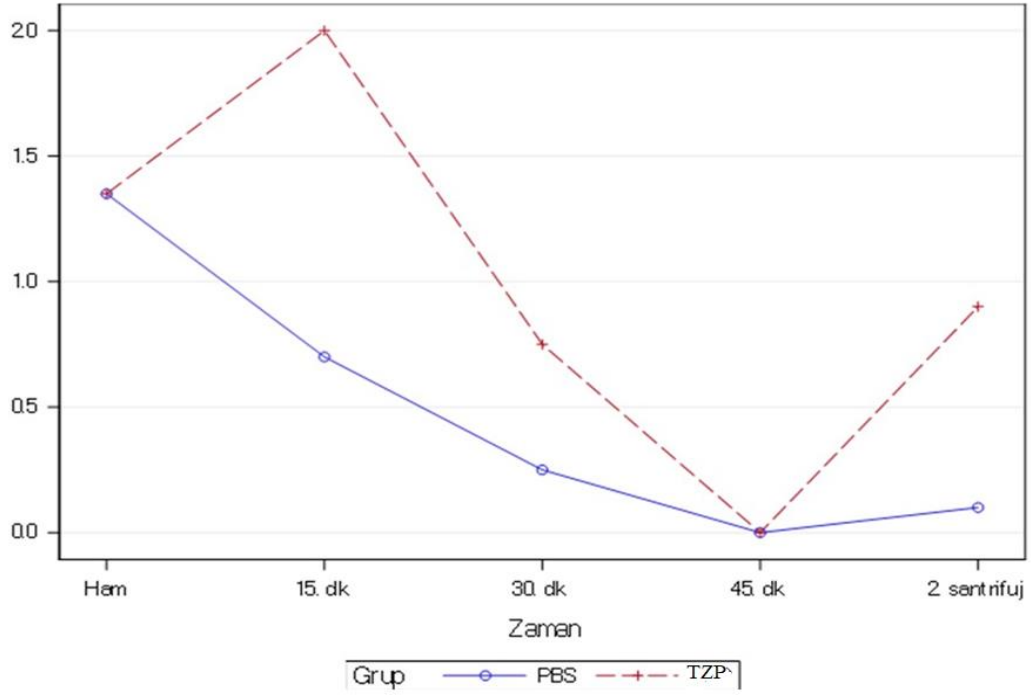
PBS grubu çalışmanın kontrol kısmını, TZP grubu ise deney kısmını oluşturmaktadır. Grafiklerin Y eksenleri ise analizi yapılan parametrelerin yani konsantrasyon ve motilite (+4, +3, +2, +1) değerlerinin yüzdelik dilimlerini ifade etmektedir. Ham grup ise spermelerin hiçbir müdahaleye maruz bırakılmadan ki saf halleridir. 15. dk- 30. dk.- 45. dk ölçümleri müdahale ettikten sonraki ölçümleri, 2. santrifüj ise 45. dk dolup ölçüm yapıldıktan sonra PBS ve TZP ile müdahale ettikten sonra 2. santrifüj işlemine tabi tuttuk ve santrifüj sonrası ölçümü belirtmektedir. PBS spermeler için bir tampon görevi görmesinin yanında yıkama yapmak için kullanılmıştır.

**Grafik 1:** Konsantrasyonun kontrol ve deney grubu olarak zamana bağlı değişimi



Yapılan konsantrasyon analizinde yıkama medyumu olarak kullandığımız miktar 1/1 olduğu için konsantrasyon değerlerimizde bir değişiklik gözlemlenmedi.

**Grafik 2:** + 4 değerinin zamana bağlı değişim grafiği



**Tablo 2:** +4 değerinin kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adj P
Zaman Ham	PBS	TZP	9.99E-16	0.3240	152	0.00	1.0000	1.0000
Zaman 15. dk	PBS	TZP	-1.3000	0.3240	152	-4.01	<.0001	<.0001
Zaman 30. dk	PBS	TZP	-0.5000	0.3240	152	-1.54	0.1249	0.1249
Zaman 45. dk	PBS	TZP	1.29E-14	0.3240	152	0.00	1.0000	1.0000
Zaman	PBS	TZP	-0.8000	0.3240	152	-2.47	0.0147	0.0147

**Tablo 3:** PBS ve TZP gruplarının birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları

Simple Effect Comparisons of mudahale*zaman Least Squares Means By mudahale Adjustment for Multiple Comparisons:								
Simple Effect Level	zama	zaman	Estimate	Standard Error	D	t	Pr >  t	Adj P
mudahale PBS	15.dk	30.dk	0.4500	0.2801	114	1.61	0.1109	0.3790
mudahale PBS	15.dk	45.dk	0.7000	0.2801	114	2.50	0.0139	0.0654
mudahale PBS	15.dk	2.sant.	0.6000	0.2801	114	2.14	0.0343	0.1461
mudahale PBS	30.dk	45.dk	0.2500	0.2801	114	0.89	0.3739	0.8087
mudahale PBS	30.dk	2.sant.	0.1500	0.2801	114	0.54	0.5933	0.9502
mudahale PBS	45.dk	2.sant.	-0.1000	0.2801	114	-0.36	0.7217	0.9843
mudahale TZP	15.dk	30.dk	1.2500	0.2801	114	4.46	<.0001	0.0001
mudahale TZP	15.dk	45.dk	2.0000	0.2801	114	7.14	<.0001	<.0001
mudahale TZP	15.dk	2.sant.	1.1000	0.2801	114	3.93	0.0001	0.0008
mudahale TZP	30.dk	45.dk	0.7500	0.2801	114	2.68	0.0085	0.0417
mudahale TZP	30.dk	2.sant.	-0.1500	0.2801	114	-0.54	0.5933	0.9502
mudahale TZP	45.dk	2.sant.	-0.9000	0.2801	114	-3.21	0.0017	0.0091

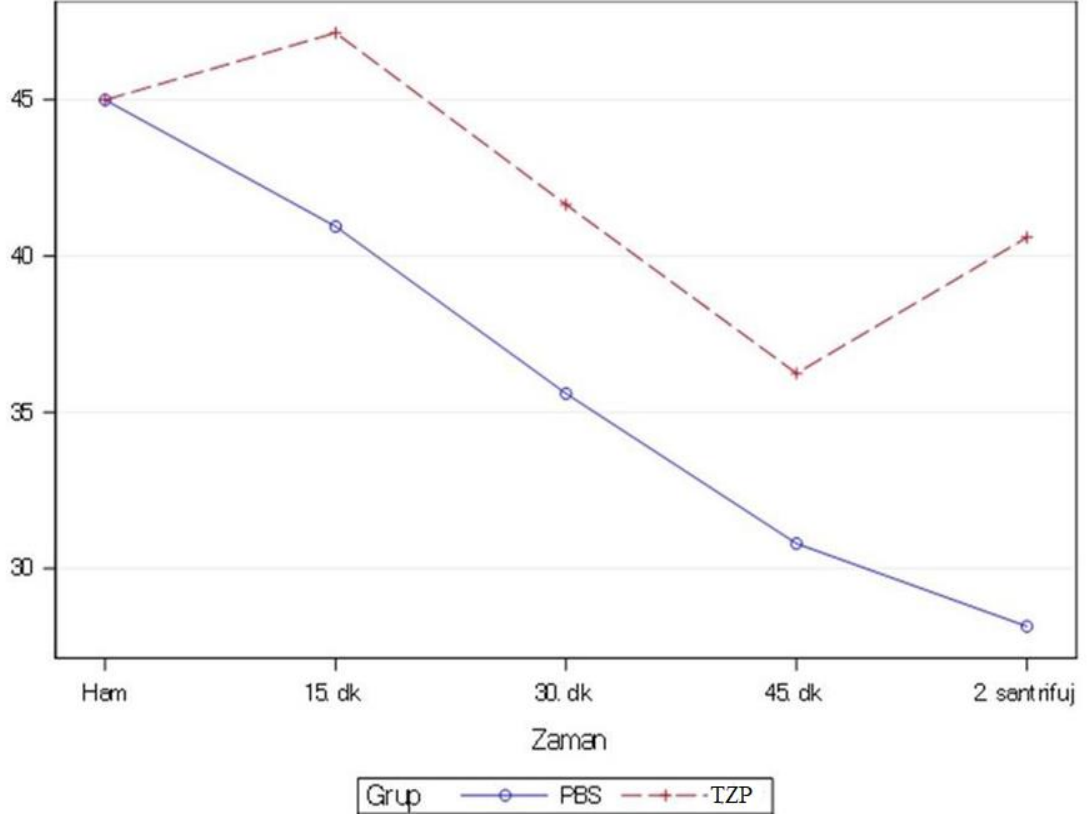
+4 motilite analizinde grup etkisi  $p=0.0004$ , zaman etkisi  $p<0.0001$ , grup-zaman etkisinin  $p$  değeri  $0.02$  olduğu ve tüm bu değerlerin  $0.05$ 'den küçük olduğu dikkate alındığında analizin bu kısmı anlamlı bulundu.

Grafik 2; çalışmamızdaki motilite değerlerinden biri olan +4 değerinin 15. dk.-30. dk.- 45. dk. ve 2. santrifüj sonrası değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çalıştığım hastalarda +4 değeri çok yüksek olmadığı için yüzdeler olarak gözle görülür bir sonuç yoktur. Lakin TZP ile muamele edilen ve %2 çıkan +4 değeri, yaklaşık olarak %0,7 çıkan PBS grubunun +4 değerine göre ilk 15. dakikada  $p$  değeri

<0.0001 olduğu için anlamlı bir sonuç bulunmuştur. Zamana bağlı olarak azalan +4 değerimiz 30.dk da PBS grubu ile aynı noktada olmasına rağmen 2. santrifüj sonrası ölçümden sonra yaklaşık 30.dk. ölçümüne denk gelmiştir ve p=0.01 olduğu için anlamlı bulunmuştur. Tablo 2’de birbirleri ile yapılan analiz sonucunda 15.dk ve 2. santrifüj sonrası ölçümde anlamlı sonuçlar bulunmuştur.

**Grafik 3:** + 3 değerinin zamana bağlı değişim grafiği



**Tablo 4:** +3 değerinin kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adj P
Zaman Ham	PBS	TZP	3.55E-14	1.2718	152	0.00	1.0000	1.0000
Zaman 15. dk	PBS	TZP	-6.2000	1.2718	152	-4.87	<.0001	<.0001
Zaman 30. dk	PBS	TZP	-6.0500	1.2718	152	-4.76	<.0001	<.0001
Zaman 45. dk	PBS	TZP	-5.4500	1.2718	152	-4.29	<.0001	<.0001
Zaman 2. santrifuj	PBS	TZP	-12.4500	1.2718	152	-9.79	<.0001	<.0001

**Tablo 5:** PBS ve TZP gruplarındaki birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları

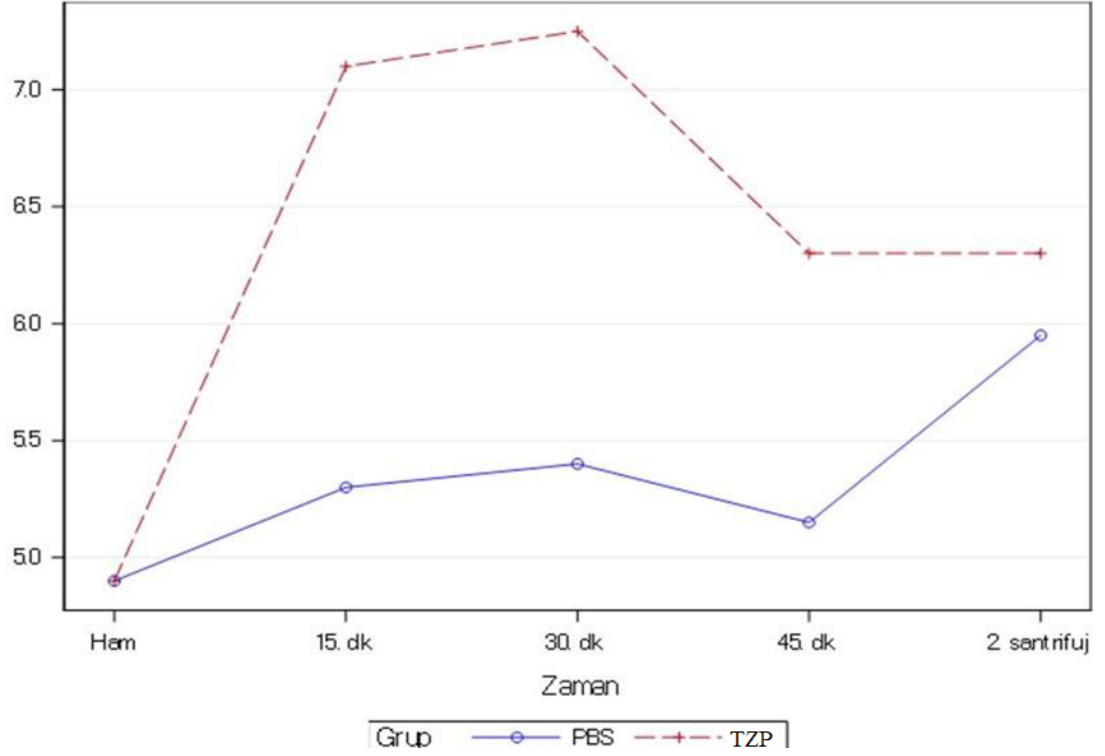
Simple Effect Comparisons of mudahale*zaman Least Squares Means By mudahale Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-								
Simple Effect Level	zaman	zaman	Estimate	Standard Error	D F	t Value	Pr >  t	Adj P
mudahale PBS	15.dk	30.dk	5.3500	0.8503	114	6.29	<.0001	<.0001
mudahale PBS	15.dk	45.dk	10.1500	0.8503	114	11.94	<.0001	<.0001
mudahale PBS	15.dk	2.sant.	12.8000	0.8503	114	15.05	<.0001	<.0001
mudahale PBS	30.dk	45.dk	4.8000	0.8503	114	5.64	<.0001	<.0001
mudahale PBS	30.dk	2.sant.	7.4500	0.8503	114	8.76	<.0001	<.0001
mudahale PBS	45.dk	2.sant.	2.6500	0.8503	114	3.12	0.0023	0.0122
mudahale TZP	15.dk	30.dk	5.5000	0.8503	114	6.47	<.0001	<.0001
mudahale TZP	15.dk	45.dk	10.9000	0.8503	114	12.82	<.0001	<.0001
mudahale TZP	15.dk	2.sant.	6.5500	0.8503	114	7.70	<.0001	<.0001
mudahale TZP	30.dk	45.dk	5.4000	0.8503	114	6.35	<.0001	<.0001
mudahale TZP	30.dk	2.sant.	1.0500	0.8503	114	1.23	0.2194	0.6061
mudahale TZP	45.dk	2.sant.	-4.3500	0.8503	114	-5.12	<.0001	<.0001

+3 motilite analizinde grup etkisi  $p < 0.0001$ , zaman etkisi  $p < 0.0001$ , grup-zaman alındığında analizin bu kısmı anlamlı bulundu.

Grafik 3; çalışmamızdaki motilite değerlerinden biri olan +3 değerinin 15. dk.- 30. dk.- 45. dk. ve 2. santrifüj sonrası değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir. TZP ile muamele edilen ve yaklaşık olarak %45'den fazla çıkan +3 değeri, yaklaşık olarak %40'dan fazla çıkan PBS grubunun +3 değerine göre ilk 15. dakikada p değeri

<0.0001 olduğu için anlamlı bir sonuç bulunmuştur. Zamana bağlı olarak azalan +3 değerimiz PBS' de 2. santrifüj sonrası ölçümlerde bile azalmışken TZP ile muamele edilen deney grubu 2. santrifüj sonrası artmıştır. Tablo 5'de birbirleri ile yapılan analizde ise TZP grubu PBS grubuna göre bütün zamanlarda  $p < 0.0001$  olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur.

**Grafik 4:** +2 değerinin zamana bağlı değişim grafiği



**Tablo 6:** +2 değerinin kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adj P
Zaman Ham	PBS	TZP	1.2E-14	0.9059	152	0.00	1.0000	1.0000
Zaman 15. dk	PBS	TZP	-1.8000	0.9059	152	-1.99	0.0487	0.0487
Zaman 30. dk	PBS	TZP	-1.8500	0.9059	152	-2.04	0.0429	0.0429
Zaman 45. dk	PBS	TZP	-1.1500	0.9059	152	-1.27	0.2062	0.2062
Zaman 2.santrifuj	PBS	TZP	-0.3500	0.9059	152	-0.39	0.6998	0.6998

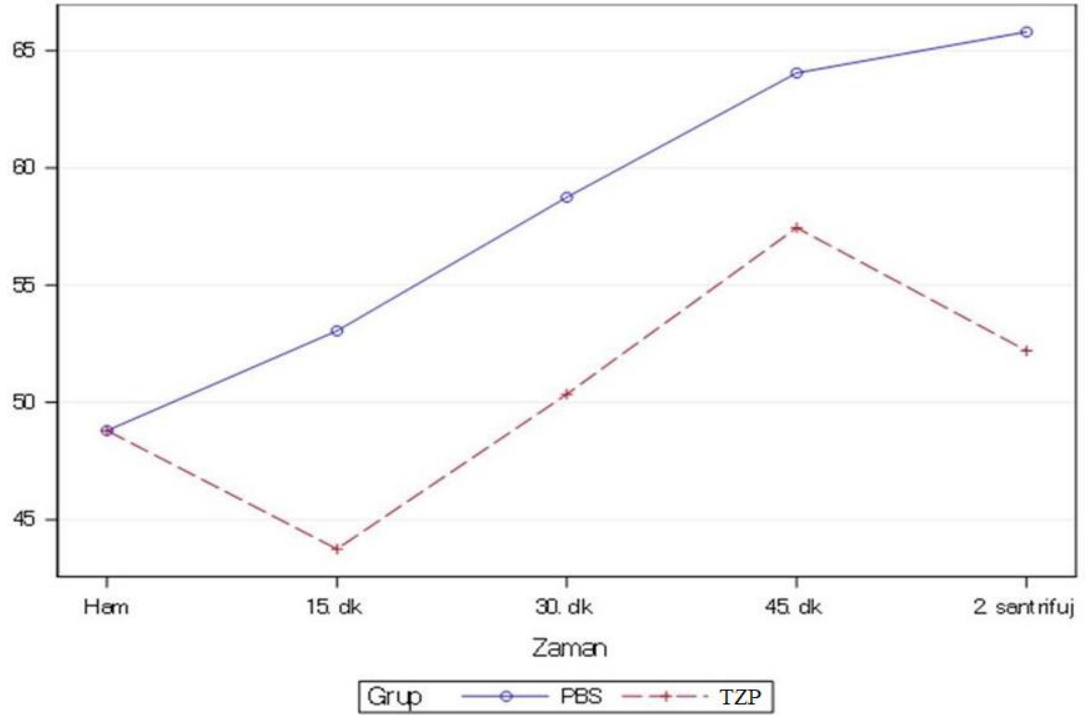
**Tablo 7:** PBS ve TZP gruplarındaki birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları

Simple Effect Comparisons of mudahale*zaman Least Squares Means By mudahale Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-								
Simple Effect	zaman	zaman	Estimate	Standard	D	t	Pr >	Adj
mudaha le PBS	15.dk	30.dk	-0.1000	0.7890	109	-0.13	0.8994	0.9993
mudaha le PBS	15.dk	45.dk	-0.3791	0.8151	109	-0.47	0.6428	0.9665
mudaha le PBS	15.dk	2.sant.	-1.2783	0.8151	109	-1.57	0.1197	0.4010
mudaha le PBS	30.dk	45.dk	-0.2791	0.8151	109	-0.34	0.7327	0.9861
mudaha le PBS	30.sk	2.sant	-1.1783	0.8151	109	-1.45	0.1512	0.4740
mudaha le PBS	45.dk	2.sant.	-0.8992	0.8361	109	-1.08	0.2846	0.7052
mudaha le TZP	15.dk	30.dk	-0.1500	0.7890	109	-0.19	0.8496	0.9975
mudaha le TZP	15.dk	45.dk	0.5640	0.8012	109	0.70	0.4830	0.8954
mudaha le TZP	15.dk	2.sant.	0.8000	0.7890	109	1.01	0.3128	0.7416
mudaha le TZP	30.dk	45.dk	0.7140	0.8012	109	0.89	0.3749	0.8095
mudaha le TZP	30.dk	2.sant.	0.9500	0.7890	109	1.20	0.2312	0.6256
mudaha le TZP	45.dk	2.sant.	0.2360	0.8012	109	0.29	0.7689	0.9911

+2 motilite analizinde grup etkisi  $p=0.04$  olduğu için sonuç anlamlı, zaman etkisi  $p=0.1$ , grup-zaman etkisinin  $p=0.4$  olduğu ve tüm bu değerlerin  $0.05$ 'den büyük olduğu dikkate alındığında analizin bu kısmı anlamlı bulunmadı.

Grafik 4; çalışmamızdaki motilite değerlerinden biri olan +2 değerinin 15. dk.- 30. dk.- 45.dk. ve 2. santrifüj sonrası değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir. TZP ile muamele edilmiş deney grubu ilk 15. dk' da yaklaşık olarak %0.7 artmıştır. Tablo 6'da birbirleri ile yapılan analizde ise TZP grubu PBS grubuna göre 15. dk. ve 30. dk. zamanlarında  $p<0.05$ 'den küçük olduğu için anlamlı, 45.dk ve 2. santrifüj sonrası yapılan ölçümde ise  $p<0.05$ 'den küçük olmadığı için sonuçlar anlamlı bulunmamıştır.

**Grafik 5:** +1 değerinin zamana bağlı değişim grafiği



**Tablo 8:** +1 değerinin kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adj P
Zaman Ham	PBS	TZP	-101E-15	1.5356	152	-0.00	1.0000	1.0000
Zaman 15. dk	PBS	TZP	9.3000	1.5356	152	6.06	<.0001	<.0001
Zaman 30. dk	PBS	TZP	8.4000	1.5356	152	5.47	<.0001	<.0001
Zaman 45. dk	PBS	TZP	6.6000	1.5356	152	4.30	<.0001	<.0001
Zaman 2.santri fuj	PBS	TZP	13.6000	1.5356	152	8.86	<.0001	<.0001

**Tablo 9:** PBS ve TZP gruplarındaki birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları

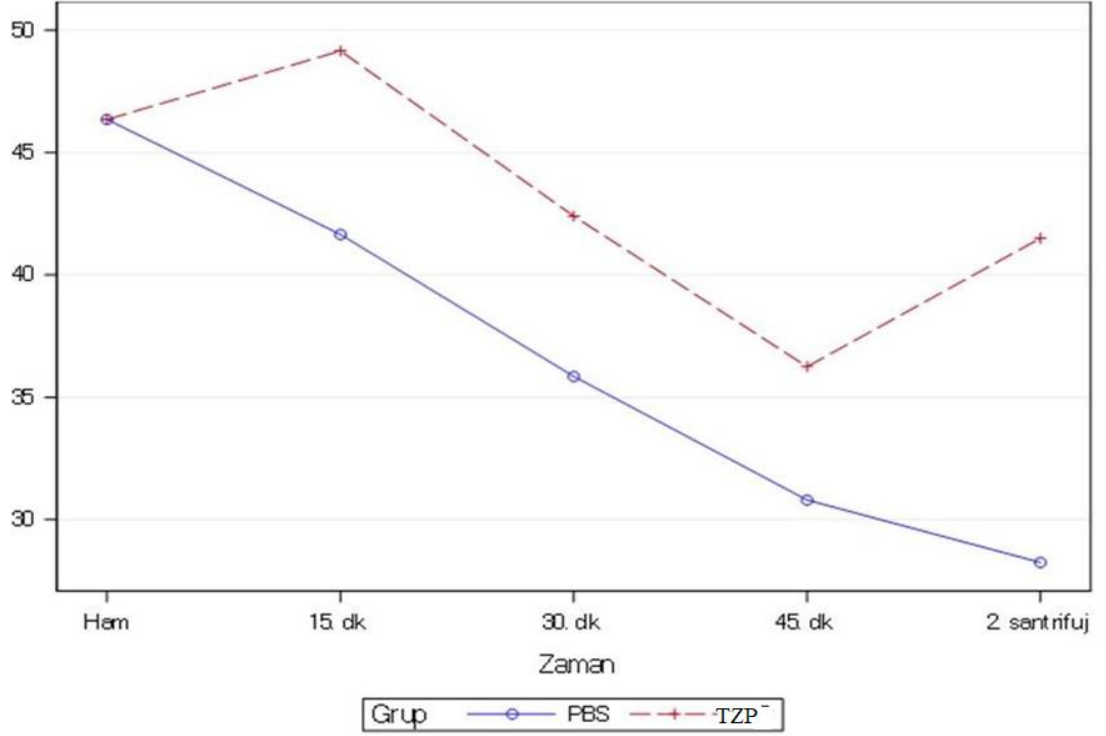
Simple Effect Comparisons of <i>mudahale</i> * <i>zaman</i> Least Squares Means By <i>mudahale</i> Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	<i>zaman</i>	<i>zaman</i>	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adj P
<b>MudahalePBS</b>	15.dk	30.dk	-5.7000	1.2345	114	-4.62	<.0001	<.0001
<b>mudahale PBS</b>	15.dk	45.dk	-11.0000	1.2345	114	-8.91	<.0001	<.0001
<b>mudahale PBS</b>	15.dk	2.sant.	-12.7500	1.2345	114	-10.33	<.0001	<.0001
<b>mudahale PBS</b>	30.dk	45.dk	-5.3000	1.2345	114	-4.29	<.0001	0.0002
<b>mudahale PBS</b>	30.dk	2.sant.	-7.0500	1.2345	114	-5.71	<.0001	<.0001
<b>mudahale PBS</b>	45.dk	2.sant.	-1.7500	1.2345	114	-1.42	0.1590	0.4910
<b>mudahale TZP</b>	15.dk	30.dk	-6.6000	1.2345	114	-5.35	<.0001	<.0001
<b>mudahale TZP</b>	15.dk	45.dk	-13.7000	1.2345	114	-11.10	<.0001	<.0001
<b>mudahale TZP</b>	15.dk	2.sant.	-8.4500	1.2345	114	-6.85	<.0001	<.0001
<b>mudahale TZP</b>	30.dk	45.dk	-7.1000	1.2345	114	-5.75	<.0001	<.0001
<b>mudahale TZP</b>	30.dk	2.sant.	-1.8500	1.2345	114	-1.50	0.1367	0.4417
<b>mudahale TZP</b>	45.dk	2.sant.	5.2500	1.2345	114	4.25	<.0001	0.0003

+1 motilite analizinde grup, zaman ve grup-zaman etkisi  $p < 0.0001$  olduğu için anlamlı bulunmuştur.

Grafik 5; çalışmamızdaki motilite değerlerinden biri olan +1 değerinin 15. dk.- 30. dk.- 45. dk. ve 2. santrifüj sonrası değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir. Kontrol grubu tüm zaman dilimlerinde artma göstermiştir. Deney grubu olan TZP'li grup ise 45. dk'ya kadar artmış 2. santrifüj sonrası ölçümlerde ise azalma göstermiştir. Bu durumda zamanla yorulan spermelerin +4, +3, +2 motilitelerinde bir düşme +1

motilitesinde ise artma meydana gelecektir. Tablo 8’de tüm zamanlarda  $p < 0.0001$ ’den küçük olduğu için bu tabloda durum tersine dönerek PBS lehine geçip sonuç anlamlı bulunmuştur.

**Grafik 6:** +3 ve +4 motilite değerlerinin toplamının zamana bağlı değişim grafiği



**Tablo 10:** +3 ve +4 motilite değerlerinin toplamının kontrol ve deney gruplarının birbirleriyle zaman yönünden karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimat	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adj P
Zaman Ham	PBS	TZP	3.91E-14	1.2734	152	0.00	1.0000	1.0000
Zaman 15. dk	PBS	TZP	-7.5000	1.2734	152	-5.89	<.0001	<.0001
Zaman 30. dk	PBS	TZP	-6.5500	1.2734	152	-5.14	<.0001	<.0001
Zaman 45. dk	PBS	TZP	-5.4500	1.2734	152	-4.28	<.0001	<.0001
Zaman 2.santrifuj	PBS	TZP	-13.2500	1.2734	152	-10.40	<.0001	<.0001

**Tablo 11:** PBS ve TZP gruplarındaki birbirleri içerisindeki zamana bağlı olarak yapılan karşılaştırma sonuçları

Simple Effect Comparisons of mudahale*zaman Least Squares Means By mudahale Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	zaman	zaman	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adj P
mudahale PBS	15.dk	30.dk	5.8000	0.8695	114	6.67	<.0001	<.0001
mudahale PBS	15.dk	45.dk	10.8500	0.8695	114	12.48	<.0001	<.0001
mudahale PBS	15.dk	2.sant.	13.4000	0.8695	114	15.41	<.0001	<.0001
mudahale PBS	30.dk	45.dk	5.0500	0.8695	114	5.81	<.0001	<.0001
mudahale PBS	30.dk	2.sant.	7.6000	0.8695	114	8.74	<.0001	<.0001
mudahale PBS	45.dk	2.sant.	2.5500	0.8695	114	2.93	0.0041	0.0209
mudahale TZP	15.dk	30.dk	6.7500	0.8695	114	7.76	<.0001	<.0001
mudahale TZP	15.dk	45.dk	12.9000	0.8695	114	14.84	<.0001	<.0001
mudahale TZP	15.dk	2.sant.	7.6500	0.8695	114	8.80	<.0001	<.0001
mudahale TZP	30.dk	45.dk	6.1500	0.8695	114	7.07	<.0001	<.0001
mudahale TZP	30.dk	2.sant.	0.9000	0.8695	114	1.04	0.3028	0.7292
mudahale TZP	45.dk	2.sant.	-5.2500	0.8695	114	-6.04	<.0001	<.0001

+3 ve +4 motilite değerlerinin toplam analizinde ise grup, zaman, grup-zaman etkisi  $p < 0.0001$  olduğu yani  $p < 0.05$  olduğu için sonuç anlamlı bulunmuştur.

Grafik 6; çalışmamızdaki motilite değerlerinden +3 ve +4 motilite değerlerinin toplamının 15.dk.-30. dk.-45. dk. ve 2. santrifüj sonrası değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir. Kontrol grubu tüm zaman dilimlerinde artma göstermiştir. 15.dk'da deney grubu aynı zaman dilimi kontrol grubuna göre yüzdelik olarak fazla çıkmıştır. Zamanla azalan kontrol grubu 2. santrifüj sonrasında da bir azalma göstermiş ama TZP' li yani deney grubu ise 2. santrifüj sonrası ölçümlerde ise artma göstermiştir. Tablo 10'da da bu durum matematiksel olarak  $p < 0.0001$  yani  $p < 0.05$ 'den küçük olduğu için anlamlı bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA

Fertilite yani doğurma yeteneği, erkek ve kadın üreme sistemlerinin anatomik ve fonksiyonel olarak normal çalışması ile işleyen fizyolojik bir süreçtir. Eşlerden birinin, üreme sisteminde herhangi bir nedenle bozulma ortaya çıkması fertilitiyi olumsuz yönde etkileyecek ve infertilite olarak karşımıza çıkacaktır (Castila 2010). İnfertilite; Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, üreme çağındaki çiftlerin en az 12 aylık bir zaman dilimi boyunca düzenli olarak korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanır. İnfertilite vakalarının yaklaşık %30-40 erkek kaynaklıdır. Erkek infertilitesi; heterojendir, birden fazla nedeni vardır. Örnek verilecek olursa; karmaşık gen-çevre etkileşimlerinden kaynaklanması, bozulmuş bir spermatogenez, testis damarların geniş olması, testislerde ısı artışının sperm şeklini bozması, düşük sperm sayısı, spermilerin motilite yani hareket özelliğinin olması gerekenden az ya da hiç olmaması, sperm morfoloji bozukluğu, diyabet vs. nedenler sayılabilir. Biz bu çalışmada erkek infertilitesinden biri ve en önemlisi olan sperm motilitesinin yetersiz olduğu durumu ele aldık. Eğer motilite yetersiz olursa yumurtaya ulaşmayacak veya ulaşmak için yola çıktığı zaman yarı yolda yorulması ile fertilitate gerçekleşemeyecektir.

TZP, trombositten zengin plazma demektir. TZP, kandan santrifüj yöntemi ile elde edilir. Elde edilme aşamasında trombositler patlatılarak içerisindeki büyüme faktörleri ve sitokinlerin açığa çıkması sağlanır. Periferik damarlardan toplanır ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transformasyon büyüme faktörü (TGF) ve proliferasyon ve büyümeyi uyaran diğer sitokinler gibi birkaç büyüme faktörü içerir. Açığa çıkan bu büyüme faktörleri ve sitokinler ortopedi, kozmetik, diş hekimliği, spor hekimliği, üroloji, kadın doğum gibi çeşitli alanlarda kullanılır (Borrione ve ark. 2010; Yu ve ark. 2011; Alcareaz ve ark. 2015; Patel ve ark. 2016). TZP, otolog kan örneklerinden yapıldığından, bulaşıcı hastalıkların bulaşma riskini ve immünolojik reaksiyonların asgari riskiyle güvenli bir prosedürdür (Shahzad ve ark. 2017).

Endometriyum kalınlığı üzerine yapılan bir çalışmada TZP'nin etkinliğine bakılmıştır (Chang 2015). Yeterli endometriyum kalınlığı implantasyon ve gebelikte ana faktördür. Endometriyum kalınlığı arttıkça gebelik oranı da artmaktadır. Yapılan

bazı çalışmalarda embriyo transferi için minimum endometriyum kalınlığının 7 mm olması gerektiği bildirilmiştir. İnce endometriyuma sahip bayanlara önce ilaç ile artırılmaya çalışılmış sonra ise TZP uygulanmıştır. TZP uygulandıktan 2 gün sonra endometriyum kalınlıkları artmış ve bayanlara embriyo transferi yapılmış ve hamile kaldıkları rapor edilmiştir. Bazı araştırmacılar G-CSF'nin endometrial büyüme ve hamileliği desteklediğini bildirdi. G-CSF nötrofilik granülosit farklılaşmasını ve çoğalmasını uyaran bir sitokindir, endometriyum çoğalmasını ve büyümesini indükleyebilir, böylece hamilelik sonuçlarını iyileştirebilir. Bu hipoteze göre, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler içeren lokal TZP infüzyonu endometriyal büyümeyi ve alınabilirliği artırabilir.

A-TZP aktive edildiği zaman ortama büyüme faktörü (alfa ve dens granüllerdeki molekülleri) salgılamaya başlar. Farklı yollar ile aktive olurlar. Aktive oldukları farklı yollardan örnek verilecek olursa, ADP, kollajen, epinefrin, trombosit aktive edici faktör (PAF), soğuğa maruz bırakılması, doku bütünlüğünün bozulması, trombin veya kalsiyum klorit ile etkileşimdir. Son olarak ise değişik dalga boylarındaki ışınlarla maruz bırakılarak aktive olması sağlanır. Aktive etmek için en çok kullanılan maddeler ise sığır trombinini ve kalsiyumdur (Yeaman 2010b; Yeaman 2014c). Yapılmış bir çalışmada trombositlerin aktivasyonu için kullanılan  $CaCl_2$  'in ilavesinin 30 dakikasında pıhtı oluşumunu indüklenmektedir.  $CaCl_2$  ile muamele süresi uzadığı takdirde ise büyüme faktörlerinin salınımı özellikle VEGF'in salınımı artmıştır (Cavallo ve ark. 2016).

İnsan spermindeki PAF (Platelet Activating Factor) içeriği seminal parametreler ve gebelik sonuçlarıyla pozitif korelasyon göstermektedir. PAF aktivasyonu ve deaktivasyonu için gerekli olan enzimler (örn. PAF-asetilhidrolaz) spermde bulunur. PAF-asetilhidrolaz dekapasitasyon faktörü olarak kabul edilir. Bu enzimin kapasitasyon sırasında uzaklaştırılması, sperm hareketliliğini ve döllenmeyi artırır. PAF ayrıca oositlerin döllenme oranını artırarak döllenme sürecinde rol oynar. PAF ile tedavi edilen spermle döllenmiş oositlerde pozitif yönde devam eden embriyo gelişimi bildirilmiştir. PAF antagonistleri, sperm hareketliliğini, akrozom reaksiyonunu ve döllenmeyi önler. PAF'ın sperm fonksiyonunda mekanizması belirsizdir ve daha çalışılması gerekmektedir (Roudebush 2001). Ayrıca PAF trombositler için güçlü bir aktivatördür. Bir hücrede şekil değişikliğini, granül

sekresyonunu ve agregasyonu indükler. Uyarılmış trombositlerden serbestleşir (Shukla 1992; Ersöz 1997).

IGF-1 insan seminal plazmasında tanımlanmıştır. Semen in IGF-1 ve 2 ile inkübe edilmesi sonucunda yapılan çalışmadaki tüm zamanlarda (90.-180.-360 dk.) sperm hareketliliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Sığır seminal plazmasında bulunan IGF-1'in ejaküle edilmiş sperm in akrozomal bölgesinde spesifik bir IGF-1 reseptörü ile etkileşime girebildiği gösterilmiş, ligand ve reseptörün bu etkileşiminin, sperm hareketliliğini artırabildiği sonucuna varılmıştır (Henricks ve ark.1998). Ayrıca insan seminal plazmada bulunan diğer bir büyüme faktörü EGF (Hirata ve ark. 1987) ve TGFa (Yie ve ark. 1994)'dır. Bu büyüme faktörlerinin ve tanımlanamayan diğer büyüme faktörlerinin varlığı, büyüme faktörlerinin sperm fizyolojisinde ve üreme sistemi üzerine düzenleyici bir rol oynadığını gösterilmektedir. Ayrıca insan sperm hücrelerinin IGF-1 reseptörünün ekspresyonuna sahip olduğunu gösteren bir çalışma yapılmıştır (Naz ve Padman 2009).

Diğer bir çalışmada ise; hem erkek hem de dişi üreme sistemlerinde VEGF ve reseptörünün bulunması göz önüne alınarak farklı VEGF konsantrasyonlarının sperm hareketliliğine etkisi incelenmiştir. Burada yıkama solüsyonu olarak VEGF bulunan sıvı kullanılmıştır. Sonuç olarak ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur (İyibozkurt ve ark. 2009).

Büyüme faktörleri ile sperm üzerine yapılan tüm bu çalışmalar gösteriyor ki büyüme faktörlerine maruz kalan sperm in parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızdaki sperm parametrelerinden biri olan motilite değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı çıkması TZP içerisindeki bu büyüme faktörlerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Her ne kadar basit yıkama ile alakalı çalışmalarda (Dorado ve ark. 2015; Malo ve ark. 2017) yapılan santrifüjden dolayı membran bütünlüğünün ve hareketli sperm in yüzdesinin azaldığı gösterilmiş olsa da yaptığımız çalışmada ikinci santrifüj sonrası +3 ve +4 motilite değerlerimizde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Literatürdeki yayınlarda santrifüj sonrasındaki bu motilite düşüklüğünün sebebinin ROS kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızdaki motilite artış nedeninin sperm in taze TZP ile muamele edilerek

santrifüj sırasında açığa çıkan ROS'un kısmende olsa elimine edildiğini ya da TZP içerisindeki büyüme faktörlerinin spermi koruduğunu düşündürmektedir. Basit yıkama metodunu seçmemizdeki asıl amacımız oligospermi gibi hastalarda sayı artırımını sağlayabilmektir.

Anbari ve arkadaşlarının (2016) üç farklı sperm hazırlama medyumu ile yaptıkları çalışmada sperm motilite, viabilite ve DNA bütünlüğünün üzerindeki etkilerine bakılmışlardır. Farklı medyumların kullanımının sperm parametrelerinin sonuçlarında da farklılık oluşturduğu gözlemlenmiştir. Biz de bu çalışmamızda TZP'yi katkı maddesi olarak kullanmayı amaçladık. Kan plazmasının pH'sı 7,4 ve osmolaritesi 275-299 mOsm/ lt; semenin pH'sı 7.2-8.0 ve osmolaritesi 285-350 mOsm/lt; PBS pH'sı 7,2-7,4 ve osmolaritesi 380 mOsm/lt dir. Hazır medyumlarda  $Ca^{+2}$ ,  $K^{+1}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Na^{+1}$  iyonları vardır. Bu iyonlar plazma bünyesinde bulunmaktadır. Bu bilgiler bizim çalışmamızdaki semen üzerine kullandığımız A-TZP'nin normalde kullanılan yıkama medyumlarına benzer kompozisyonda bir supplement olduğunu ve semen için uygunluğunu göstermektedir.

Son olarak teze başladığımızda A-TZP'nin direkt sperm parametresine etkisini araştıran hiçbir çalışma yoktu. Lakin Mayıs 2019 tarihinde Andrology dergisinde yayınlanan bir makalede (Bader ve ark. 2019)  $H_2 O_2$  ile oksidatif strese uğratılmış insan sperm hücrelerinde otology TZP'nin etkisine bakılmış ve TZP uygulanan grupta progresif ve toplam motilitede anlamlı bir artış söz konusu olmuştur. Yapılan bu çalışma tezimizdeki elde ettiğimiz verileri desteklemektedir.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sperm+and+platelet+rich+plasma

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed.gov US National Library of Medicine National Institutes of Health

PubMed  Search

Create RSS Create alert Advanced Help

Article types: Clinical Trial, Review, Customize ...

Text availability: Abstract, Free full text, Full text

Publication dates: 5 years, 10 years, Custom range...

Species: Humans, Other Animals

Clear all Show additional filters

Format: Summary - Sort by: Most Recent - Send to - Filters: Manage Filters

Search results

Items: 2

1. [In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human spermatozoa.](#)  
Bader R, Ibrahim JN, Moussa M, Mourad A, Azoury J, Azoury J, Alaaeddine N.  
Andrology. 2019 May 12. doi: 10.1111/andr.12648. [Epub ahead of print]  
PMID: 31079423  
[Similar articles](#)

2. [The use of platelet-rich plasma \(PRP\) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan.](#)  
Dehghani F, Sotoude N, Bordbar H, Panjeshahin MR, Karbalay-Doust S.  
Platelets. 2019;30(4):513-520. doi: 10.1080/09537104.2018.1478400. Epub 2018 Jun 8.  
PMID: 29883240  
[Similar articles](#)

Find related data  
Database: Select  
Find items

Search details  
("spermatozoa"[MeSH Terms] OR "spermatozoa"[All Fields] OR "sperm"[All Fields]) AND ("platelet-rich plasma"[MeSH Terms] OR ("platelet-rich"[All Fields] AND "plasma"[All Fields]))  
Search See more...

Recent Activity  
Turn Off Clear  
Q sperm and platelet rich plasma (2) PubMed  
Q sperm washing (661) PubMed

**Şekil 17:** 12/06/2019 tarihinde Pubmed üzerinden yapılan tarama (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sperm+and+platelet+rich+plasma)

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

‘‘Basit yıkama yöntemi ile hazırlanmış semen örneklerinde Trombositten Zengin Plazmanın etkisinin değerlendirilmesi’’ adlı tez çalışmamızda elde edilen sonuçlar ve önerilerimiz kısaca şu şekildedir;

- 1) Çalışmamızda azospermi hariç çalışmaya dâhil edilen gruplarda inkübasyonu takip eden ilk 15. dakikada istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen motilite artışı gözlemlenmiştir.
- 2) A-TZP'nin ilerleyen zaman diliminde yani çalışma sürelerimiz olan 30 ve 45. dk.'larda etkisini kaybederek spermin motilitesinde bir azalma gösterilmiştir.
- 3) 45.dk sonrası yapılan 2. santrifüj sonrası TZP ile yeniden muameleden sonra ölçüme bakıldığında ilk 15. dk. kadar olmasa da yine anlamlı bir artma meydana gelmiştir.
- 4) TZP'nin sperm hazırlama tekniklerinden biri olan basit yıkama işleminde kullanılan medium ve katkılarına ek bir alternatif olmasını beklenmektedir.
- 5) TZP uygun fiyatlı, basit, yenilikçi ve etkileyici bir tedavi şeklidir. Aynı zamanda umut verici sonuçları olan ve yan etkisi olmayan bir yöntemdir. TZP'nin mevcut kullanım alanlarına ek infertilite tedavilerinde de kullanılabilirliğini, TZP elde edilmesi aşamasında kullanılan materyallerin rahatlıkla bulunabilmesi özelliğine bakıldığında ileride yapılacak çalışmalarda daha az zahmetli bir araştırma alanı olduğunu gösterebilmeyi amaçladık.
- 6) Maliyetinin düşük olmasından dolayı ise ekonomiye katkı sağlamaktadır.
- 7) Son olarak, bu çalışma sonrasında elde ettiğimiz değerlerle TZP'nin ev tipi IUI kitlerinin kullanıma açılımı söz konusu olabilir.

## 7.KAYNAKLAR

- Abraham L. Kierszenbaum. Çeviri Editörü: Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
- Agarwal A, Ranganathan P. Higher rates of recovery with pure sperm density gradient compared to isolate. Hum Reprod. 2001; 16: p-053.
- Ahmet Cem Iyibozkurt1, Pelin Balcik, Sibel Bulgurcuoğlu, Burcu Kardas Arslan, Rukset Attar, Erkut Attar. Effect of vascular endothelial growth factor on sperm motility and survival. Reproductive BioMedicine Online, 2009, Vol 19. No 6. 784–88.
- Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. 1988; 9(6): 367-76.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Essential Cell Biology. 1983; Hücrenin Moleküler Biyolojisi. 4. Baskı, Çeviren: Altungöz O, Akçalı C, Çırakoğlu B ve ark. Ankara: Tüba yayınları, 2008.
- Alcaraz J, Oliver A, Sánchez JM. Platelet-Rich Plasma in a patient with cerebral palsy. Am J Case Rep. 2015; 16:469–72.
- Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. J Bone Joint Surg Br. 2009;91(8):987-96.
- Arnoczky, S.P. and S. Shebani-Rad, The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians Need to know. Sports Medicine and Arthroscopy Review, 2013. 21(4): p. 180-85.
- Arora, N.S., et al., Platelet-rich plasma: a literature review. Implant dentistry, 2009. 18(4): p. 303-10.
- Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçiöğlü O, Kadioğlu A. Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013.
- Ayman Shehata Dawood, Hesham Abdelaziz Salem Current clinical applications of platelet-rich plasma in various gynecological disorders. An Appraisal of Theory and Practice Clinical and Experimental Reproductive Medicine. 2018;45(2):67-74
- Bader R, Ibrahim JN, Moussa M, Mourad A, Azoury J, Azoury J, Alaaeddine N. In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H2 O2 induced oxidative stress in human spermatozoa. Andrology. 2019 May 12.
- Baka, S., Grigoriou, O., Hassiakos, D., Konidaris, S., Papadias, K., & Makrakis, E. Treatment of sperm with platelet-activating factor does not improve intrauterine insemination outcome in unselected cases of mild male factor infertility: A Prospective Double-Blind Randomized Crossover Study. Urology 2009; 74(5), 1025–28.
- Baker HWG, Ng FLH, Liu DY. Preparation and analysis of semen for ivf/gift. In Trounson A, Gardner DK (eds'). Handbook of in Vitro Fertilization, CRS Press, USA, 1993; pp. 33-56.
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A. effects of an Igf I gene null mutation on mouse reproduction. Mol Endocrinol 1996; 10: 903–16.
- Barratt C. Spermatogenesis. In: Grudzinskas JG YJ, editor. Gametes- The Spermatozoon. Cambridge University Press, 1995. P.250- 67
- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, et al. Relation between semen quality and fertility, A Population - Based Study Of 430 First - Pregnancyplanners, Lancet 1998, 1172-77.
- Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'Non-Performer'. Human Reproduction Update. 2010, 2: 205–24
- Borrione P, Gianfrancesco AD, Pereira MT, Pigozzi F. Platelet-rich plasma in muscle healing. Am J Phys Med Rehabil. 2010; 89:854–61.
- Carola Cavallo, Alice Roffi, Brunella Grigolo, Erminia Mariani, Loredana Pratelli, Giulia Merli, Elizaveta Kon, Maurilio Marcacci, and Giuseppe Filardo Platelet-Rich Plasma: the choice of activation method affects the release of bioactive molecules hindawi publishing corporation BioMed

- Research International Volume 2016, Article ID; 6591717, 7.
- Castilla JA, et al. Reproductive BioMedicine Online 2010, 114-24.
- Chang Y, Li J, Chen Y, Wei L, Yang X, Shi Y, et al. Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8:1286-90.
- Cieslik-Bielecka A, Bielecki T, Gazdzik TS, Arendt J, Król W, Szczepanski T. Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury. *Transfus Apher Sci*. 2009; 41:9–12.
- Cramer, D.W., A.M. Walker, and I. Schiff, Statistical methods in evaluating the outcome of infertility therapy. *Fertil Steril*, 1979. 32(1): p. 80-6.
- Curry MR, Sperm structure and function, in gametes- the spermatozoon, I.G.J.a.Y.J. eds, Editor. Cambridge University Press. 1995; P. 45-69
- Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. 1. baskı, İstanbul: Veri Medikal Yayıncılık; 2008. s. 55-72.
- Dereka, X. E., C. E. Markopoulou, and I. A. Vrotsos. "Role of growth factors on periodontal repair." *Growth Factors* 24.4 (2006): 260-67.
- Dhillon, R.S., E.M. Schwarz, and M.D. Maloney, Platelet-rich plasma therapy-future or trend Arthritis research & therapy, 2012. 14(4): p. 219.
- D'Hooghe T.M., Debrock S, Hill JA, Meuleman C et al., Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved *Semin Reprod Med*, 2003. 21(2): p. 243-54.
- Dhurat, R. and M. Sukesh, Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 2014; 7(4): p. 189.
- Doessing S, Holm L, Heinemeier KM, Feldt-Rasmussen U, Schjerling P, Qvortrup K, et al. GH and IGF1 levels are positively associated with musculotendinous collagen expression: experiments in acromegalic and GH deficiency patients. *Eur J Endocrinol*. 2010; 163(6):853–62.
- Donald M. Henricks, Andrew J. Kouba, Brett R. Lackey<sup>3,4</sup> William R. Boone and Sandra L. Gray identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa. *Influence on Sperm Motility Biology of Reproduction* 59, 1998; 330–37.
- Dorado, J., Glvez, M. J., Demyda-Peyrs, S., Ortiz, I., Morrell, J. M., Crespo, F., Hidalgo, M. Differences in preservation of canine chilled semen using simple sperm washing, single-layer centrifugation and modified swim-up preparation techniques. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016; 28(10), 1545.
- Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. *obstetrics and gynecology*. 2004; 103(1): 51-6
- Efeoglu C, Akçay YD, Ertürk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: An experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*, 2004; 62: 1403-7
- Ehrenfest, D.M.D., et al., Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma- PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *MLTJ Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 2014. 4(1): p. 3-9.
- El-Toukhy T, Coomarasamy A, Khairy M, Sunkara K, Seed P, Khalaf Y, Braude P. The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril*. 2008; 89:832–9.
- Engelbrechtsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E, Bachl N, Devilee R, Everts P, Hamilton B, Huard J, Jenoure P, Kelberine F, Kon E, Maffulli N, Matheson G, Mei-Dan O, Menetrey J, Philippon M, Randelli P, Schamasch P, Schweltnus M, Vernec A, Verrall G. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med*. 2010; 44:1072–81.
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic Reconstruct Surg*. 2004; 114:1502–8.
- Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem*.

- 2011; 2:11-7.
- Everts PA, Knappe JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overvest EP, Box HA, Van Zundert A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006; 38:174–187.
- Fatemeh Anbari, Iman Halvaei, Ali Nabi, Shahin Ghazali, Mohammad Ali Khalili, Lars Johansson The quality of sperm preparation medium affects the motility, viability, and DNA integrity of human spermatozoa *Journal of Human Reproductive Sciences* 2016, volume: 9 254-8
- Fawcett D. *The Cell Biology of Gametogenesis in The Male*, 1979
- Fawcett DW., *The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea pig.* *Z Zellforsch* 1965; 67: 279-96
- Ferrara, Napoleone, Hans-Peter Gerber, and Jennifer LeCouter. "The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 9.6 (2003): 669-76
- Flechon J, Hafez ESE. *Scanning Electron Microscopy of Human Spermatozoa* In: Hafez E, editor. *Human Semen and Fertility Regulation in Men.* St Louis: CV Mosby; 1976. p. 76.
- Foster, Timothy E., et al. "Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American Journal of Sports Medicine* 37.11 (2009): 2259-72.
- Fritz, M.A. and L. Speroff, *Kadın İnfertilitesi*, in *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji Ve İnfertilite*, G.S. Günalp, Editor. 2014, Güneş TIP Kitapevleri: Ankara, Türkiye. p. 1137-90.
- G. M. et al. Barrientos S, Stojadinovic O, "Growth factors and cytokines in wound healing," *Wound Repair Regen*, vol. 16, pp. 585–601, 2008.
- Garcia-Velasco JA, Acevedo B, Alvarez C, Alvarez M, Bellver J, Fontes J, et al. Strategies to manage refractory endometrium: state of the art in 2016. *Reprod Biomed Online* 2016; 32:474-89.
- Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, Mooar PA. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty. An Analysis of the Hemoglobin, Narcotic Requirement and Range of Motion. *Int Orthop.* 2007; 31:309–313. doi: 10.1007/s00264-006-017-z.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology.* 3rd ed. Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1997;493 498.
- Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;427(Suppl): S27–36.
- Gökçe A. Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Turk Urol Sem.* 2011; 2:1- 7.
- Gustafsson T, Kraus WE. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci. (Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review).* 2001;6: D75– 89.
- Gülriş Ersöz Trombosit Aktivasyonu Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 50, Sayı 3, 1997 163-72
- Gwatkin, R.B.L., *Handbook of in vitro fertilization*, Edited by Alan O. Trounson and David K. Gardner, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, 324 pp, \$89.50. *Molecular Reproduction and Development*, 1993. 36(4): p. 517.
- Hanna R, Trejo PM, Weltman RL. Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: A Randomized Clinical Trial. *J Periodontol.* 2004; 75:1668-1677.
- Harrison R.A.P A Highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J. Reprod Fert.* 1976; 48,347-53.
- Hassa H. *İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları.* 1. Baskı. Eskişehir, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları; 2003:127-65
- He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. 2009; 108: 707-13.
- Hechtman KS, Uribe JW, Botto-vanDemden A, Kiebzak GM. Platelet-rich plasma injection reduces pain in patients with recalcitrant epicondylitis. *Orthopedics.* 2011; 34:92.

- Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:108-29.
- Hersant B, Bouhassira J, Sidahmed-Mezi M, Et Al Should Platelet-Rich Plasma Be Activated In Fat Grafts An Animal Study. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* 2018; 71:681–90.
- Hirata Y, Uchihashi M, Hazama M, Fujita T. Epidermal growth factor in human seminal plasma. *Horm Metab Res* 1987; 19:35–37.
- Italiano JE, Hartwig JH. Megakaryocyte development and platelet formation, in platelets, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2007. p.63–85.
- Janse Van Rensburg Wj, Van Der Merwe P. Comparison of commercially available blood collection tubes containing sodium citrate 24 and hirudin in platelet aggregation testing. *Med Sci Monit Basic Res* .2017;23:264–69.
- Jo CH, Roh YH, Kim JE, Shin S, Yoon KS. Optimizing platelet-rich plasma gel formation by varying time and gravitational forces during centrifugation. *J Oral Implantol* 2013; 39:525–32.
- Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. İstanbul, Türk Androloji Derneği Yayını, 2004.
- Kadioğlu A, Kendirci M, Aktan G, Yaman Ö, Çayan S. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm- Cervical Mucus Interaction. 2010; WHO Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semeni ve Sperm- Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. 5. Baskı, Çeviri Editörü: Günalp S. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2011
- Kalaycı Ş. Histoloji. Bursa. Uludağ Üniversitesi Basımevi. 1986; 374-77.
- Kayıkçı MA, Çam KH, Akman Y, Erol A. Erkek infertilitesini değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002;4(3):35-8.
- Kısaarslan T. Plateletten zengin plazma (platelet rich plasma-PRP) hazırlanmasında kullanılan farklı tüp, farklı çevirme sürelerine ısının elde edilen trombositler üzerine etkisi. Sağlık Bakanlığı Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, İstanbul,2017 (Tez Danışmanı: Doç.Dr. Berrin Berçik İnal).
- Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22(9):913-22.
- Ksander, George A., et al. "The effect of platelet releasate on wound healing in animal models." *Journal of the American Academy of Dermatology* 22.5 (1990): 781-91
- Langman's Medical Embryology, 12th Edition 2012 20th Edition
- Laron, Z. "Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular Pathology* 54.5 (2001): 311.
- Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH et al. computer assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population, The Danish First Pregnancy Planner Study Team, *Hum Reprod*, 2000, 1562-67
- Lin T, Wang D, Calkins H, Guo H, Chi R, Housley DR. Changes in the messenger ribonucleic expression in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 73:147–52.
- Mack S, Bhattacharyya AK, Joyce C, Van der Ven H, Zaneveld LJD. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod*. 1983;28(5):1032-42.
- Malo, C., Crichton, E., Morrell, J., Pukazhenthil, B., & Skidmore, J. Single layer centrifugation of fresh dromedary camel semen improves sperm quality and in vitro fertilization capacity compared with simple sperm washing. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017; 52(6), 1097–1103.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-Rich Plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *OOOOE*. 1998; 85: 638-46.
- Marx, R.E., Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry*, 2001. 10(4): p. 225-28.
- Mehta, S. and J.T. Watson, Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2008. 22(6): p. 432-38.
- Miller JH, Weinberg RK, Canino NL, Klein NA, Soules MR, The pattern of infertility diagnoses in

- women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*, 1999; 181(4):952-7.
- Mortimer D. Sperm preparation methods. *J Androl*. 2000; 21:357-66.
- Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 1991; vol 6. no.2 pp. 173-76.
- Oehninger S., Strategies for the infertile man. *Sem Reproductive Med*, 2001; 19 (3): 231-37.
- Ombelet W, Dhont N, Thinus Kruger, et al. Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review. *Reproductive BioMedicine Online* 2014, 300-9.
- Ortel TL, Mercer MC, Thames EH, Moore KD, Lawson JH. Immunologic impact and clinical outcomes after surgical exposure to bovine thrombin. *Ann Surg*. 2001; 233:88–96.
- O'Toole, Greg, et al. A review of therapeutic angiogenesis and consideration of its potential applications to plastic and reconstructive surgery. *British Journal of Plastic Surgery* 54.1 (2001): 1-7.
- Ott SM. New Aspects of Normal Bone Biology. In: Olgaard K, Salusky IS, Silver J (eds). *The spectrum of mineral and bone disorders in chronic kidney disease*. 2nd ed. Oxford, Oxford University Press. 2010;15-29.
- Patel AN, Selzman CH, Kumpati GS, McKellar SH, Bull DA. Evaluation of autologous platelet rich plasma for cardiac surgery: outcome analysis of 2000 patients. *J Cardiothorac Surg*. 2016; 11:62.
- Pinheiro, R.C. et al. Effectiveness of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection for severe male infertility. *Cmaj*. 1999. 161(11): p. 1397-401.
- Plachokova, Adelina S. Et al. Effect of platelet- rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*. 19.6 (2008): 539-45.
- Pryor JL, Howards SS. Varicocele. *Urol Clin North Am*. 1997,14;3:499-51.
- R. K. Naz, P. Padman identification of insulin-like growth factor (Igf)-1 receptor in human sperm cell. *Archives of Andrology* 2009 43:153–59.
- Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg*. 2011; 20:518–28.
- Reddy, N., Kasukurthi, K. B., Mahla, R. S., Pawar, R. M., & Goel, S. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) transcript and protein in the testis of several vertebrates, including endangered species. *Theriogenology*. 2012; 77(3), 608–14.
- Rendu Francine and Brigitte Brohard-Bohn. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12.5 (2001): 261-273
- Richter KS, Bugge KR, Bromer JG, Levy MJ. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. *Fertil Steril*. 2007; 87:53–9.
- Ross, M.H. and Pawlina, W. *Histology: a text and atlas, with correlated cell and molecular biology*. Edt. Baykal, B., Palme Yayıncılık, 6th Edition, 2014; 286-9.
- Roudebush WE. Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function. *Asian J Androl*. 2001 Jun;3(2):81-5.
- Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008; 1:165–174. doi: 10.1007/s12178-008-9032-5
- Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007; 35:245–51.
- Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andía I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion a case report. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35:1648–52.
- Schlegel P, *Male Reproductive Physiology*. Ed. Philadelphia, Saunders, 2004.
- Schwarz A. A Promising treatment for athletes in blood. *The New York Times*; 2009.
- Shafik O. El Sibai, Sperm DNA fragmentation. *Arch Androl*. 2006, May- Jun;52(3):197208.

- Shahzad Zadehmodarres, Saghar Salehpour, Nasrin Saharkhiz and Leila Nazari. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study JBRA. Assist Reprod 2017; 21(1)
- Shiba R et al., Geometry of the humeroulnar joint. J Orthop Res, 1988; 6(6): 897-906.
- Shukla SD. Platelet activating factor receptor and signal transduction mechanisms. FASEB J. 1992; 6: 2296-301.
- Spero JA. Bovine thrombin-induced inhibitor of factor V and bleeding risk in postoperative neurosurgical patients. Report of three cases. J Neurosurg. 1993; 78:817-20.
- Spiteri-Greech J, Nieschlag E. Role of growth hormone and insulinlike growth factor in the regulation of male reproductive function. Horm Res 1992; 38(1 1):22-7.
- Stein, I.F. and M.L. Leventhal, Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 1935. 29(2): p. 181-91.
- Tandberg, A., Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and Clinical Perspectives. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 2005. 84(10): p. 1027.
- Tomoyasu A, Higashio K, Kanomata K, Goto M, Kodaira K, Serizawa H, Suda T, Nakamura A, Nojima J, Fukuda T, Katagiri T. Platelet-rich plasma stimulates osteoblastic differentiation in the presence of BMPs. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 361:62-7.
- Tosun Z, Akdağ O. Plateletten Zengin Plazma ve Kök Hücre. Türkiye Klinikleri Journal of Plastic Surgery Special Topics, 2017;6(2): 125-9.
- Tözüm TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. J Can Dent Assoc.2003; 69: 664-7.
- Tsuruta JK, O'Brien DO. Sertoli cell-spermatogenic cell interactions: insulin-like growth factor-II/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mediates changes in spermatogenic cell gene expression in mice. Biol Reprod 1995; 53:1454-64.
- Wang-Saegusa A, Cugat R, Ares O, Seijas R, Cuscó X, Garcia-Balletbó M. Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. Arch Orthop Trauma Surg. 2011; 131:311-17.
- White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. Nat Med 2012; 18:413-21.
- World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva: WHO Press, 2010.
- Wu PI, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-Rich Plasma. Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America. 2016;27(4):825-53.
- Yeaman MR. Platelets at the nexus of antimicrobial defence. Nat Rev Microbiol. 2014;12(6):426-37
- Yeaman MR. Platelets in defense against bacterial pathogens. Cell Mol Life Sci. 2010;67(4):525-44.
- Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. Clin Infect Dis. 1997;25(5):951-68; quiz 69-70.
- Yie SM, Lobb DK, Clark DA, Younglai EV. Identification of a transforming growth factor alpha-like molecule in human seminal plasma. Fertil Steril 1994; 61:129-35.
- Yu W, Wang J, Yin J. Platelet-rich plasma a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. Int J Neurosci. 2011; 121:176-80.
- Zadehmodarres S, Salehpour S, Saharkhiz N, Nazari L. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study. JBRA Assist Reprod 2017; 21:54-6.

## **8.EKLER/ ÖZGEÇMİŞ**

1993 Sivas doğumludur. 1999 yılında Sivas Reşat Şemsettin Sırer İlköğretim Okulu'nda ilköğrenimine başladı. Lise eğitimini 2011 yılında Sivas Lisesi (Anadolu)'nde tamamladı. 2012 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümüne başladı ve 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı'nda Yüksek lisans eğitimine başladı.

Ek 1:

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ  
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:75

Toplantı Tarihi: 26.10.2018

**Karar Sayısı:2018/1535:**Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Selçuk DUMAN' ın "Basit Yıkama (Simple Washing) Yöntemi İle Hazırlanmış Semen Örneklerinde Trombositlerden Zengin Plazmanın (TZP) Etkisinin Değerlendirilmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 15.10.2018 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Merve DURAN' ın yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Selçuk DUMAN' ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Selçuk DUMAN

Yardımcı Araştırmacı: Merve DURAN

ASLI GİBİDİR

26.10.2018

Prof. Dr. Ayşe S. ŞAHİN

İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkan Yardımcısı

SEMEN İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın gönüllü,

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesinde Histoloji-Embriyoloji Yüksek Lisans Öğrencisi Merve DURAN'IN Yüksek Lisans Tezi amaçlı yürüttüğümüz "Basit yıkama(simple washing) yöntemi ile hazırlanan semen örneklerinde trombositlerden zengin plazma(TZP)'nin etkisinin değerlendirilmesi "adlı araştırmamıza sizin de katılmanızı öneriyoruz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz.

Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Yapacak olduğumuz çalışmanın amacı infertilite sorunu olan hastalarda alternatif bir tedavi seçeneği oluşturmaktır. Necmettin Erbakan Üniversitesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

- 1) Araştırmamız için Semen örnekleri için günlük semen analizi yapılmış hastaların analizden sonra atık hedefli semenleri gönüllü onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edilecektir.
- 2) Sizden kan alınması sizin için herhangi bir risk unsuru oluşturmaz.
- 3) Semen hazırlığında özel sıvılarda rutin yıkama ve yüzdürme metodları şu anda kullanılmaktadır. Biz de elde ettiğimiz Trombositten zengin plazmayı bu çalışmada sperm yıkama metodu olarak kullanacağız. Araştırmamızda Simple Washing(basit yıkama) metodu kullanılacaktır.
- 4) Araştırma süresi 3 aydır.
- 5) Araştırmaya Trombositten zengin plazma eldesi için kan verecek olan 10 gönüllü, semen(sperm,meni) için ise 25 gönüllü katılacaktır.Gönüllülerin yaş aralıkları 18-50 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

**(Katılımcının/Hastanın Beyanı)**

## SEMEN İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın yüksek lisans öğrencisi Merve DURAN tarafından Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Pırpf.Dr.Selçuk DUMAN' 0505 407 56 70 (cep) no'lu telefonlardan ve NEÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve yüksek lisans öğrencisi ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

## SEMEN İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Katılımcı ile görüşen yüksek lisans öğrencisi

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

KAN İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın gönüllü,

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesinde Histoloji-Embriyoloji Yüksek Lisans Öğrencisi Merve DURAN'IN Yüksek Lisans Tezi amaçlı yürüttüğümüz "Basit yıkama (simple washing) yöntemi ile hazırlanan semen örneklerinde Trombositlerden Zengin Plazma(TZP)'nin etkisinin değerlendirilmesi "adlı araştırmamıza sizin de katılmanızı öneriyoruz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz.

Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Yapacak olduğumuz çalışmanın amacı infertilite sorunu olan hastalarda alternatif bir tedavi seçeneği oluşturmaktır. Necmettin Erbakan Üniversitesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

- 1) Araştırmamız için sizden 10cc kan alınacaktır. Elde edilen kan laboratuvarında santrifüj edilip (yüksek devirli döndürme ile) TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA elde edilecektir. Elde edilen Trombositten zengin plazmalar dondurulup buzdolabının buzlukunda saklanacak, semen örneklerinin çalışılacağı günlerde çözündürülüp kullanılacaktır.
- 2) Sizden kan alınması sizin için herhangi bir risk unsuru oluşturmaz.
- 3) Semen hazırlığında özel sıvılarda rutin yıkama ve yüzdürme metotları şu anda kullanılmaktadır. Biz de elde ettiğimiz Trombositten zengin plazmayı bu çalışmada sperm yıkama metodu olarak kullanacağız. Araştırmamızda Simple Washing(basit yıkama) metodu kullanılacaktır.
- 4) Araştırma süresi 3 aydır.
- 5) Araştırmaya Trombositten zengin plazma eldesi için kan verecek olan 10 gönüllü, semen(sperm, meni) için ise 25 gönüllü katılacaktır. Semen örnekleri için günlük semen analizi yapılmış hastaların analizden sonra atık hedefli semenleri gönüllü onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edilecektir. Gönüllülerin yaş aralıkları 18-50 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

## KAN İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

**(Katılımcının/Hastanın Beyanı)**

Sayın yüksek lisans öğrencisi Merve DURAN tarafından Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Selçuk DUMAN' 0505 407 56 70 (cep) numaralı telefonlardan ve NEÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve yüksek lisans öğrencisi ile olan ilişkiime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde

KAN İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

"katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

**Katılımcı ile görüşen yüksek lisans öğrencisi**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza