

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (TZP) İLE MUAMELE
EDİLMİŞ SEMEN ÖRNEKLERİNDE ODA ISISI (+23±2°C) VE
SOĞUK ORTAM ŞARTLARININ (+4°C) SPERM
PARAMETRELERİ VE KROMATİN YAPISINA ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

GÜL KARAKUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ

KONYA 2019

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (TZP) İLE MUAMELE
EDİLMİŞ SEMEN ÖRNEKLERİNDE ODA ISISI (+23±2°C) VE
SOĞUK ORTAM ŞARTLARININ (+4°C) SPERM
PARAMETRELERİ VE KROMATİN YAPISINA ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

GÜL KARAKUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ

KONYA 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Gül KARAKUŞ**' un **“Trombositten Zengin Plazma (TZP) ile Muamele Edilmiş Semen Örneklerinde Oda Isısı (+23±2° C) ve Soğuk Ortam Şartlarının(+4° C) Sperm Parametreleri ve Kromatin Yapısına Etkilerinin Değerlendirilmesi**’ başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, Türkiye/ 19/06/2019

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ

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 0.3/27/2019 tarih ve 13.124... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

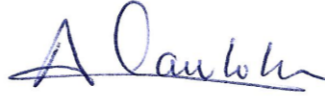
Enstitü Müdürü

İmzası



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**The Evaluation of Room Temperature (+23±2° C) and Cold Environment (+4° C) Sperm Parameters and Chromatin Structure in Semen Samples Prepared by Platelet Rich Plasma (PRP)**” by “**Gül KARAKUŞ**” 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 / 19/06/2019



Principal Advisor

Professor Aydan ÖZGÖRGÜLÜ

Necmettin Erbakan University

Department of Histology and Embryology

Examination Committee Member

Professor S. Serpil KALKAN

Necmettin Erbakan University

Department of Histology and Embryology

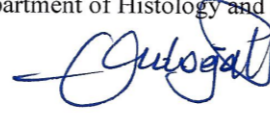


Examination Committee Member

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. Kısmet 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.

18.06.2019

GÜL KARAKUŞ



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.

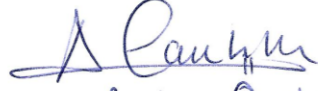
TROMBOSİTLEN ZENGİN PLAZMA (TZP) İLE MUAMELE EDİLM...

Inbox | Now Viewing: new papers ▼

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

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

☐	Author	Title	Similarity	web	publication	student papers	Grade	response	File	Paper ID	Date
☐	Gül Karakuş	Tez	8% 8%	6%	1%	6%	--	--	download paper	1148407337	01-Jul-2019


Prof. Dr. Aydan Özgöçmen

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>xiv</i>
<i>Özet</i>	<i>xv</i>
<i>Abstract</i>	<i>xvi</i>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek genital sistemi	3
2.1.1. Testis gelişimi	3
2.1.2. Testisin yapısı	4
2.1.2.1. İnterstisyum	5
2.1.2.2. Seminifer tübüller	6
2.1.3. Spermatogenez	8
2.1.4. Sperm yapısı	11
2.1.5. Semen analizi (Spermiogram)	13
2.1.5.1. Semen makroskopik olarak incelenmesi	15
2.1.5.2. Semen mikroskopik olarak incelenmesi	16
2.2.İnfertilite	23
2.2.1. İnfertilitede erkek faktörü	23
2.2.2. Yardımcı üreme teknikleri (YÜT)	24
2.2.2.1. İntra Uterin İnseminasyon (IUI)	25
2.2.2.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)	25
2.2.3. Sperm hazırlama ve yıkama yöntemleri	26
2.2.3.1. Basit yıkama (simple washing)	28

2.2.3.2. <i>Sperm yüzdürme (swim-up/swip-down)</i>	28
2.2.3.3. <i>Density gradient santrifügasyon</i>	30
2.3. <i>Sperm DNA hasarı</i>	30
2.3.1. <i>Sperm kromatin kondensasyonu</i>	31
2.3.2. <i>Anilin mavisi</i>	32
2.4. <i>Trombositten Zengin Plazma (TZP)</i>	32
2.4.1. <i>Trombositin yapısı ve içeriği</i>	33
2.4.2. <i>TZP tanımı ve sınıflandırılması</i>	36
2.4.3. <i>TZP avantajları ve dezavantajları</i>	37
2.4.4. <i>TZP hazırlanması</i>	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. <i>Araştırmaya dahil etme kriterleri</i>	39
3.2. <i>TZP'nin hazırlanması</i>	39
3.3. <i>Semen örneklerinin hazırlanması</i>	45
3.4. <i>Simple washing metodu ile spermlerin hazırlanması</i>	46
3.5. <i>Spermlerin +23±2°C ve +4°C'de bir gece saklanması</i>	47
3.6. <i>Anilin mavisi boyama ile sperm kromatin yapısının değerlendirilmesi</i>	47
3.7. <i>İstatistiksel analizin yapılması</i>	51
4. BULGULAR	52
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. KAYNAKLAR	72
8. ÖZGEÇMİŞ	80
9. EKLER	81

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

°C: Santigrat derece

µl: Mikrolitre

Ad: Koyu boyanan tip A spermatogonyum

ADP: Adenozin difosfat

AKS: Açık kanaliküler sistem

AMH: Antimüllerian hormon

Ap: Açık boyanan tip A spermatogonyum

ATP: Adenozin trifosfat

A-TZP: Aktive edilmiş trombosit zengin plazma

bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

BSA: Bovin serum albümin

CaCl₂: Kalsiyum Klorür

CO₂: Karbondioksit

dk: Dakika

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DSÖ: Dünya sağlık örgütü (WHO, World health Organization)

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ER: Endoplazmik retikulum

FSH: Folikül stimüle edici hormon

FSP: Fallop tüplerine sperm perfüzyonu

g: Santrifüje yerleştirilen örneği bileşenlerine ayıran fiziksel etki

H₂O₂: Hidrojen peroksit

hCG: İnsan koryonik gonadotropin

HEPES: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit tampionu

HSA: İnsan serum albümini

HTF: İnsan tubal sıvısı (Human tubal fluid)

ICSH: İntertisyel hücreleri stimüle edici hormon

ICSI: İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IGF-I: İnsülin benzeri büyüme faktörü-I

IM: İmmotilite

IUI: İntra uterin inseminasyon

LH: Luteinizan hormon

MIS: Müllerian inhibitör madde

mm: Milimetre
mm³: Milimetre küp
mRNA: Mesajcı Ribonükleik asit
NP: Non-progresif motilite
NR: Total sperm motilitesi
OPU: Yumurta toplama (Oosit pick up)
p: İstatistiksel anlamlılık
PAS: Periyodik asit schiff
PBS: Phosphate buffared saline
PDAF: Trombosit kaynaklı anjiogenezis faktör (Platelet-derived angiogenesis factor)
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PF₃: Platelet tromboplastik faktör
pH: Hidrojen kuvveti
PPP: Trombositten fakir plazma
PR: Progresif motilite
PSA: Prostat spesifik antijen
PZD: Parsiyel zona disseksiyonu
ROS: Reaktif oksijen türleri
rpm: Santrifüjün dakikadaki dönme sayısı
SAS: İstatistik analiz yazılımı (Statistical analysis software)
SUZI: Subzonal sperm inseminasyonu
TBF: Testis belirleyici faktör
TGFb: Transforming büyüme faktörü b
TP: Özel geçiş proteini (Transition nuclear protein)
TPI: Transperitoneal inseminasyon
TZP: Trombositten zengin plazma (PRP, Platelet rich plasma)
UV: Ultraviyole ışınlar
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VITI: Vajinal yolla fallop tüplerine inseminasyon
vWf: Von Willebrand faktörü
YTS: Yoğun tübüler sistem
YÜT: Yardımcı üreme teknikleri
β (TGF-β): Transforming büyüme faktörü
μm: Mikrometre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Normal ve anormal morfoloji yapılarına sahip spermiler	21
Şekil 2: Swim up tekniğinin 37°C’de eğik açıyla inkübasyona bırakılması	29
Şekil 3: Trombositlerde yer alan granüllerin içerikleri	35
Şekil 4: 13.06.2019 tarihinde Pubmed üzerinden yapılan tarama	68

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Asit sitrat dekstroz içeren steril enjektöre alınan tam kan örneği	40
Resim 2: Santrifüj işlemi için kanın steril konik tüpe aktarılması	40
Resim 3: Tam kanın santrifüj işleminden geçirilmesi	41
Resim 4: Santrifüj uygulamasından sonra fazlara ayrılan kan	41
Resim5: Kanın trombosit içeren zengin plazma kısmının steril tüpe alınması	42
Resim 6: Hesaplanan %10'luk CaCl_2 miktarının elde edilen trombosit zengin plazma üzerine eklenmesi.....	42
Resim 7: Hafif çalkalama işlemiyle CaCl_2 'nin TZP içerisinde homojen bir şekilde dağıtılması	43
Resim 8: İnkübasyondan sonra jelleşen A-TZP ve jelin içerisinde oluşan fibrin-pıhtı	43
Resim 9: CaCl_2 ile muamele ve santrifüj işleminin sonrasında parçalanmış trombosit yapılarından oluşan pellet	44
Resim 10: Elde edilen A-TZP'nin dondurulmak üzere ependorflara dağıtılması ...	44
Resim 11: Semen analizinde kullanılan Makler kamarası	46
Resim 12: Sperm görüntülenmesi için kullanılan mikroskop	46
Resim 13: Anilin mavisi boyama testinde spermilerin görüntülenmesinde kullanılan Olympus BX43 mikroskobu.....	48
Resim 14: Anilin mavisi boyama testinden sonra spermier 20x	49
Resim 15: Anilin mavisi boyama testinden sonra spermier 40x	49
Resim 16: Anilin mavisi boyama testinden sonra boya alan ve almayan spermier 100x	50
Resim 17: Anilin mavisiyle boyanan ve boyanmayan spermier 100x	51

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: DSÖ kriterlerine göre en düşük semen analiz referans değerleri	14
Tablo 2: DSÖ 2010 sperm morfoloji parametreleri ve kriterleri	20
Tablo 3: Semen analizinde sperm değişkenleri terminolojisi	22
Tablo 4: Deney grubu ve kontrol grubunun zamana bağlı konsantrasyon değişiminin karşılaştırması	53
Tablo 5: Deney grubu ve kontrol grubunun zamana bağlı konsantrasyon karşılaştırmasının değerlendirilmesi	53
Tablo 6: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +1 değeri karşılaştırması	54
Tablo 7: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +2 değeri karşılaştırması	55
Tablo 8: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +3 değeri karşılaştırması	56
Tablo 9: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +4 değeri karşılaştırması	57
Tablo 10: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı toplam +3 ve +4 değişiminin değerlendirilmesi	59
Tablo 11: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı konsantrasyon değerleri karşılaştırması	59
Tablo 12: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı +4 değerlerinin karşılaştırması	60
Tablo 13: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +4 değerlerinin karşılaştırması	60
Tablo 14: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı +3 değerlerinin karşılaştırması	61
Tablo 15: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +3 değerlerinin karşılaştırması	61
Tablo 16: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı +2 değerlerinin karşılaştırması	62
Tablo 17: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +2 değerlerinin karşılaştırması	62

Tablo 18: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı +1 değerlerinin karşılaştırması	63
Tablo 19: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +1 değerlerinin karşılaştırması	63
Tablo 20: Kontrol ve deney gruplarının $+4^{\circ}\text{C}$ ve $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece saklanan örneklerine yapılan anilin mavisi (+) boyama sonuçlarının karşılaştırma değerlendirmesi	65
Tablo 21: $+4^{\circ}\text{C}$ ve $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ örneklerinin anilin mavisi (+) boyama değerlerinin karşılaştırması	65

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1: Deney grubu ve kontrol grubunun zamana bağlı konsantrasyon değişiminin grafiksel gösterimi	53
Grafik 2: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +1 değeri karşılaştırmasının grafiksel gösterimi	54
Grafik 3: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +2 değeri karşılaştırmasının grafiksel gösterimi	55
Grafik 4: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +3 değeri karşılaştırmasının grafiksel gösterimi	56
Grafik 5: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +4 değeri karşılaştırmasının grafiksel gösterimi	57
Grafik 6: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı toplam +3 ve +4 değişiminin grafiksel gösterimi	58
Grafik 7: Kontrol ve deney grubu +4°C ve +23±2°C örneklerinin anilin mavisi (+) boyama sonuçları karşılaştırması	65

ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA(TZP) İLE MUAMELE EDİLMİŞ SEMEN
ÖRNEKLERİNDE ODA ISISI (+23±2°C) VE SOĞUK ORTAM ŞARTLARININ (+4°C) SPERM
PARAMETRELERİ VE KROMATİN YAPISINA ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gül KARAKUŞ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ- KONYA 2019

Günümüzdeki yaşam şartlarında çeşitli birçok sebepten dolayı çiftlerin doğal yollarla gebelik elde etme şansları azalmaktadır. Gebelik elde etme imkanlarının sağlanabilmesi için birçok çiftin yardımcı üreme tekniklerine (YÜT) başvurusu sonrasında yapılan semen analizi ile bireyin fertilizasyonda önemli rolü olan sperm motilite, konsantrasyon ve morfoloji gibi kriterleri değerlendirilmektedir. Bu kriterlere ek olarak fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi ve sağlıklı bir embriyonun gelişimi için sperm deoksiribo nükleik asitinde (DNA) herhangi bir hasar bulunmaması ve DNA bütünlüğü oldukça önemlidir. Trombositler ise içerisinde yer alan granüllerin hemoostaz, inflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein ve büyüme faktörünü içermesi trombositlerin yoğunlaştırılarak klinikte yara, kemik iyileşmesi gibi alanlarda kullanımının gündeme gelmesine neden olmuştur. Trombositlerden yoğunlaştırılarak elde edilen trombosit zengin plazma (TZP), kandan elde edilmesinin kolay olması ve gerçekleştirilen araştırmalarda herhangi bir yan etkisinin ortaya çıkmamış olması sebebiyle günümüzde kullanımı mevcut, alternatif tedavi yöntemlerinden biri olarak araştırılmaktadır.

Çalışmamızda bu düşüncelere dayanarak basit yıkama yöntemine aktive edilerek hazırlanmış TZP (A-TZP) ilavesiyle hazırlanan semen örneklerindeki sperm motilite ve konsantrasyon değerlerinin değerlendirilmesi, hazırlanan örneklerin bir gece farklı ortam sıcaklıklarında saklanması sperm motilite parametreleri üzerine olası etkilerinin değerlendirilmesi, sperm DNA kromatin yapı hasarlarının uygulanan anilin mavisi boyaması ile incelenerek istatistiksel analizinin yapılmasıyla A-TZP'nin alternatif bir sperm yıkama medyum supplementi olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 20 sağlıklı gönüllüden kan alınıp manuel olarak A-TZP hazırlanmıştır. Gönüllü hastalardan semen için onam formları alındı ve spermiogram analizi sonucunda azospermi durumu göstermeyen 20 hasta örneği çalışmaya dahil edildi. Her bir semen örneği fosfat tamponlu tuz (PBS) ile muamele edeceğimiz kontrol grubu ve A-TZP ile muamele edeceğimiz deney grubu olarak iki gruba ayrıldı. Gruplara basit yıkama yöntemi uygulandı ve elde edilen son örneklerin Makler kamarasında sayımları yapıldı ve sperm konsantrasyon ve motilite verileri kaydedildi. Bu işlemlerden sonra +23±2°C ve +4°C'de bir gece bırakılmak üzere deney ve kontrol grubundan ikiyeşer örnek ayrıldı. Bir gece sonunda her bir gruptaki iki örneğin sperm konsantrasyon ve motilite verileri kaydedildi ve örnekler anilin mavisi ile boyanarak DNA kromatin yapıları incelendi. Örneklerin anilin mavisi boyamasından sonra sonuçları kaydedildi ve elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizleri yapıldı.

Yapılan değerlendirmede A-TZP ile muamele edilen deney grubu örnekleri hem basit yıkama işlemi sonrasında hem de bir gece saklama sonrasında kontrol grubu örneklerinin verileri ile karşılaştırıldığında motilite değerleri olarak daha anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Deney grubu içerisinde +23±2°C'de saklanan örneklerin motilite bulguları +4°C'de saklanan örneklerin bulgularına göre daha iyi çıkmıştır. Bir gece sonrasında anilin mavisi boyama üzerine elde edilen verilere bakıldığında deney grubu +4°C'ye bırakılan örneklerde anilin mavisi negatif boyanan spermiler daha fazla olup diğer örneklerle göre daha olumlu bulunmuştur ($p<0.05$).

Sonuç olarak; A-TZP kullanımının spermde hem motilite hem de sperm DNA kromatin yapısı üzerine artı yönde bir etkisinin olduğu çalışmamızla gösterilmiş oldu.

Anahtar Kelimeler: Anilin Mavisi; Deoksiribo Nükleik Asit (DNA); Trombosit Zengin Plazma (TZP).

ABSTRACT

REPUBLIC of TURKEY

NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

THE EVALUATION OF ROOM TEMPERATURE ($+23\pm 2^{\circ}\text{C}$) AND COLD ENVIRONMENT ($+4^{\circ}\text{C}$) SPERM PARAMETERS AND CHROMATIN STRUCTURE IN SEMEN SAMPLES PREPARED BY PLATELET RICH PLASMA (PRP)

Gül KARAKUŞ

DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY

MASTER THESIS- KONYA 2019

The chance of achieving pregnancy for couples with natural ways is decreased recently because of lots of various reasons under today's living conditions. After the appeal of lots of couples to assisted reproductive techniques for a possibility of achieving pregnancy, with semen analysis, the criteria like sperm motility, concentration and morphology which have a significant role in individual fertilization are evaluated. In addition to these criteria, it is very important that the sperm deoxyribonucleic acid (DNA) is not damaged and that the integrity of DNA is very important for successful fertilization and development of a healthy embryo. Thanks to granules inside thrombocytes, platelet includes a lot of protein and growth factor which are responsible for homeostasis, inflammation, bone and wound healing, so the idea to use platelets in clinics to heal bone and wounds after it is concentrated became popular. Platelet-rich plasma (PRP) obtained by concentration from platelets is being investigated as one of the alternative treatment methods available today because it is easy to obtain from blood and no side effects have been observed in the studies performed.

By considering these thoughts, in our work, the purposes are investigating the evaluation of sperm motility and concentration values in semen samples prepared by adding activated PRP(A-PRP) to simple washing method and the evaluation of possible impacts of prepared samples, which are waited a night in different ambient temperatures, on sperm motility parameters, also after statistical analysing of sperm DNA chromatin structure damages by implementing aniline blue painting, the usability of A-PRP as an alternative supplement for sperm washing medium.

In our study, blood was drawn from 20 healthy volunteers and A-PRP was prepared manually. Consent forms for semen were obtained from volunteer patients and 20 patients who did not show azoospermia status were included in the study. Each semen sample was divided into two groups. First one is the control group treated with phosphate buffered saline (PBS) and the other is the experimental group treated with A-PRP. Simple washing method was applied to the groups and the final samples were counted in the Makler chamber, also sperm concentration and motility data were recorded. After these procedures, two samples were separated from the experimental and control groups by living them overnight at $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $+4^{\circ}\text{C}$. At the end of the night, sperm concentration and motility data of two samples in each group were recorded and samples were stained with aniline blue to examine DNA chromatin structures. After the aniline blue staining of the samples, the results were recorded and all data were analysed statistically.

In the evaluation, the experimental group samples treated with A-PRP were found to be more significant as motility values when compared with the data of the control group samples after both simple washing and overnight storage ($p<0.05$). Motility findings of samples stored at $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ in the experimental group were better than those of samples stored at $+4^{\circ}\text{C}$. After a night, when the data of aniline blue staining obtained, aniline blue negative stained sperm was higher in the samples that were left to $+4^{\circ}\text{C}$ in the experimental group and it was found to be more positive than the other samples ($p<0.05$).

In conclusion, it has been shown in our study that the use of PRP has a positive effect on both motility and sperm DNA chromatin structure of sperm.

Key Words: Aniline Blue; Deoxyribonucleic Acid (DNA); Platelet-Rich Plasma (PRP).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde infertilite problemi yaşayan çiftlerin sayısı giderek artmaktadır. İnfertilite olgularının %50'si kadın, %40'ı erkek ve %10'u ise sebebi açıklanamayan nedenlerden dolayı oluşmaktadır. İnfertilite probleminin çözüme ulaştırılması için hem kadın hem de erkek bireylerde çeşitli araştırmalar sürdürülmektedir. İnfertilite tedavisinde yardımcı üreme teknikleri (YÜT) içerisinde; intra uterin inseminasyon (IUI, Aşılama), in vitro fertilizasyon (IVF) ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) olmak üzere birçok yöntemin kullanımı mevcuttur. Yardımcı üreme tekniklerinde erkeğe bağlı infertilite nedenlerini araştırmak ve tespit etmek amacıyla; semen analizi ile hem ejakülatın fiziksel özellikleri (volüm, viskozite, pH vb.) hem de sperm konsantrasyonu, sperm sayısı, sperm motilitesi, viabilitesi ve morfolojisi gibi sperm kriterleri değerlendirilmektedir. Bu kriterlere ilave olarak fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi ve sağlıklı bir embriyonun gelişimi için sperm DNA'sında herhangi bir hasar bulunmaması ve Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) bütünlüğü oldukça önemlidir (Budak 2014; Hatiboğlu 2014). Öyle ki, elde edilen spermlerin DNA yapılarının bilinmemesinin, kullanılan yöntemlerde hasarlı DNA'ya sahip spermlerle işlem yapılmasının başarı oranlarında düşüşe sebebiyet verdiği çeşitli çalışmalarca gözlemlenmiştir.

Trombositler, kemik iliğindeki megakaryositlerden gelişen çapları 2-4 µm olan çekirdeksiz, küçük, membranla çevrili sitoplazmik hücre fragmantlarıdır (Ross ve Pawlina 2014). Trombositlerde bulunan α granülleri içerisinde belli bir düzen içinde birlikte çalışarak inflamasyon, hücre farklılaşması-proliferasyonu ve doku rejenerasyonunu uyaran ve anjiyogenez, hemostazis gibi süreçlerde önemli rolü olan birçok molekülü içermektedir (Aydemir ve Karadağ 2009; Cansever 2017). Bunların dışında ise oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu azalttığı ve çeşitli antioksidan enzimlerin ekspresyonunu yukarı regüle ettiği yapılan araştırmalar sonucunda bildirilmiştir (Şekerci ve ark. 2017; Matz ve ark. 2018).

Normal bir kan örneğinde %6'lık bir trombosit dağılımı bulunmaktadır. Trombositten zengin plazma (TZP) ise otolog kandan elde edilen, trombosit bakımından daha yüksek konsantrasyona sahip plazma fraksiyonudur. TZP tedavisinin temel prensibi yüksek trombosit konsantrasyonunu hedef bölgeye uygulayarak insan vücudunun doğuştan gelen tamir yeteneğinin arttırılmasıyla hiperfizyolojik bir

büyüme faktörü konsantrasyonu oluşturarak hasar bölgesinde iyileşme potansiyelini hızlandırmaktır (Hancı ve ark. 2015; Epifanova ve ark. 2017). TZP; içeriğinde çeşitli büyüme faktörleri içermesi, kolay bir şekilde elde edilmesi ve herhangi bir yan etkiye sebebiyet vermemesi sayesinde son yıllarda süregelen çalışmalarda işlevlerinin araştırıldığı alternatif bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yardımcı üreme tekniklerinden olan IUI tekniği ile sperm hazırlamada kullanılan basit yıkama (Simple Washing) işlemi yüksek oranda sperm eldesi sağlamakta olup, semen numunelerinin kalitesi iyi olduğu takdirde, yeterli olmaktadır (WHO 2010). Sperm nükleusuna baktığımızda spermatogenez esnasında nükleer histonların sperme özgü protaminler ile birleşmesi ve protaminler arasında yer alan çapraz disülfid bağları sayesinde sperm DNA'sının hem kararlı bir hale getirilmesi hem de sıkıca paketlenmesi sağlanır. Anilin mavisi boyası ise lizinden zengin histonlarla, arjinin/sistein zengini protaminlerin ayrımında kullanılmaktadır (Wong ve ark. 2008; Tekden Kırgız 2015).

Bu bilgilerden yola çıkarak yaptığımız çalışmada aktive edilerek hazırlanmış TZP (A-TZP) katkılı basit yıkama metodumuzun ve kullanılan yöntem ile hazırlanan spermelerin bir gece farklı ortam sıcaklıklarında saklanması sperm konsantrasyon ve motilite parametreleri üzerine olası etkilerinin değerlendirilmesi ve bunların yanı sıra sperm DNA kromatin yapı hasarlarının uygulanan anilin mavisi boyaması ile incelenerek istatistiksel analizinin yapılmasıyla A-TZP'nin alternatif bir sperm yıkama medyum supplementi olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Erkek genital sistemi; skrotum içerisinde asılı, sperm üretilmesi ve sentezlenmesini sağlayan, androjenleri salgılayan iki adet testisten; üretilen spermlerin olgunlaşması, taşınması ve depo edilmesinde görevli dış genital kanallar olan epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus ve üretranın bir kısmından; ejakülata katılan karışık salgıları üreten, genital sistemin kanalları boyunca yerleşmiş aksesuar cinsiyet bezleri olan veziküla seminalis, prostat bezi ve bulboüretral bezlerden; son olarak da erektile doku özelliğindeki, idrar ve seminal sıvının dışarı atıldığı ve kopulasyonun sağlandığı ortak bir organ olan penisten oluşmaktadır (Birdal 2010; Koç 2015; Yokuş 2015). Bu dış ve iç organların bulunduğu erkek genital sistemi; spermlerin sürekli olarak üretimini, beslenmesini ve geçici olarak depo edilmesini, erkek seks hormonları olan androjenlerin sentezlenip salgılanmasını sağlamakta görevlidir (Javadova 2008; Birdal 2010; Tosumoğlu 2018).

2.1.1. Testis Gelişimi

Testislerin gelişimi; endokrin, parakrin, büyüme ve mekanik faktörlerinin yer aldığı kompleks bir etkileşim sayesinde sağlanmaktadır (Tuncel 2013). Fertilizasyon ile oluşan genetik cinsiyet döllenme sonrasında XX veya XY kromozomlarına sahip olup yedinci haftaya kadar birbirine benzeyen farklanmamış gonadlar olarak gözlenir (Satı 2005; Budak 2014). Yedinci haftayla birlikte gonad, testis ya da overe farklanmaya başlar (Birdal 2010; Tuncel 2013). Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölgede yer alan gen tarafından kodlanan testis belirleyici faktör (TBF), testiküler farklılaşmayı sağlayarak testis gelişimini başlatmış olur. TBF' nin etkisiyle primer cinsiyet kordonları uyarılarak farklanmamış gonadın medulla içlerine kadar iner ve kordonların dallanarak anastomozlaşan bir yapı haline gelmesiyle rete testis oluşturulur (Tuncel 2013; Budak 2014).

Fetüste testiküler gelişim için oldukça karakteristik olan tunika albugineanın gelişimiyle cinsiyet kordonlarının (seminifer=testiküler kordonların) yüzey epiteli ile olan bağlantıları son bulur. Testis genişlemesini sürdürerek mezonefrozdaki ayrılır ve mezorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar seminifer tübüllere farklanarak rete testis ve tubuli rekti ile bağlantı kurar (Şahin 2010; Budak 2014). Seminifer

tübüller intertisyel dokuda bulunan Leydig hücrelerini oluşturan mezenşimden ayrılırlar (Şahin 2010; Budak 2014). 8. haftayla birlikte Leydig hücreleri, mezonefrik kanalların ve dış genital yolların erkeklik yönünden farklılaşmasını tetikleyen androjenik hormonlar olan testosteron ve andosteronu salgılamaya başlar (Satı 2005; Şahin 2010; Budak 2014). İnsan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu testosteronun üretimini stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşır (Satı 2005; Şahin 2010). Destek hücre rolündeki Sertoli hücreleri antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) olarak adlandırılan bir hormon salgırlar. Puberte dönemine kadar salgılanan daha sonrasında ise seviyesi azalan bu hormon, paramezonefrik (Müllerian) kanalların uterovajinal primordiyum şeklinde gelişmesini engeller (Birdal 2010; Şahin 2010; Budak 2014). Seminifer tübüller, puberteye kadar olgunlaşmamış halde kalırlar, puberteden itibaren lümenleri meydana gelir. Daha sonraki gelişim esnasında testis yüzey epiteli düzleşerek erişkin testisinin dış yüzeyinde yer alan mezoteli oluşturur. Rete testis, epididimis ile bağlantılı olan mezonefrik kanalcıklardan gelişen efferent kanallarla devam eder. Epididimis distalinde kalın bir düz kas tabakası kazanan mezonefrik kanal deferens kanalını meydana getirir. Duktus deferensin ucundan dışa doğru seminal veziküller gelişir ve bunların kanalları ile üretra arasında kalan bölüme ejakülatör kanal adı verilir (Birdal 2010; Şahin 2010; Budak 2014).

2.1.2 Testisin Yapısı

Fetal dönemin erken safhalarında, karın boşluğunda böbreklerin yakınında gelişen testisler, fetüs gelişimini ilerlettikçe androjenlerin kontrolü altında aşağı doğru hareket ederek doğumdan hemen önce inguinal kanal aracılığıyla skrotuma inerler. Testisler, spermin üretimi, depolanması ve testosteron hormonunu salınımından sorumlu erkek üreme organıdır. Tubuli rekti ve rete testisi içerisinde yerleşik olarak bulunduran testisler; oval yapıda, 10-14 gr ağırlığında, 3 cm kalınlığında, 2-3 cm genişliğinde, 15-20 ml hacminde ve yaklaşık 4 cm uzunluğundadır. Testisler en dışta deri fibröz kılıf ve kas liflerinden oluşan skrotum ile çevrilidir. Skrotum içerisinde; testis, epididimis, duktus deferensin bir kısmı ve bu organlara gelen kan damarlarını ve sinirleri bulundurur. Ayrıca skrotumun kasılıp-gevşemesiyle testislerin vücut ısısından 2°-3° C daha düşük olan belirli bir ısıda kalması da sağlanır (Osaloğlu 2013; Budak 2014; Karamazak 2014; Üstüner 2014).

Abdomen dışında yer alan testisler, dıştan 3 tabakadan oluşan testiküler kapsül ile sarılıdır. Skrotuma iniş esnasında testislerin beraberlerinde sürüklediği periton kısmından köken alan tunika vaginalis bu kapsülün en dışta yer alan tabakasıdır. Visseral ve pariyetal tabakaları arasındaki seröz boşluk sayesinde testisin skrotum içerisinde hareket edebilmesini sağlar (Birdal 2010; Ross ve Pawlina 2014). Tunika albuginea, kapsülün en belirgin tabakası olmakla birlikte düz kas hücreleri ve kollajen lifler içeren sıkı bağ dokusu yapısındadır (Budak 2014; Karamazak 2014; Ross ve Pawlina 2014). Testiküler kapsülün en iç tabakası olan tunika vasküloza ince bir areolar bağ dokusu içerisine gömülmüş olan kan damarları ağlarından oluşmuştur. Aorta abdominalisin dalları olan arteria testikularisler tarafından testislerin beslenmesi sağlanır ve her bir testisin arka tarafından çıkan küçük venlerin birleşmesiyle pampiniform plexus adı verilen venöz ağ oluşturulur (Karamazak 2014; Kızıllan 2015).

Tunika albuginea testisin posterior yüzeyinde kalınlaşır ve mediastinum testis olarak organ içerisine sokulur. Mediastinum testisten kapsüle doğru ince, fibröz uzantılar uzanarak testisin iç kısmını sayıları 200-250 kadar olan piramidal kompartmanlara böler. Bu bölmelere lobuli testis (testis lobülleri) adı verilir. Testis lobüllerinin apeksleri mediastinuma doğrudur. Her bir lobülde sayıları 1 ile 4 arasında değişen oldukça kıvrıntılı seminifer tübüller yer alır. Seminifer tübüllerin mediastinum testiste bulunan düz kısımlarına tubulus recti (düz tübüller) denir. Tubulus recti mediastinum testiste rete testis denilen anastomoz gösteren kanallar sistemi ile devam eder. Bu kanallar sistemi testis sıvısını ve üretilen spermaozoonları epididimisin proksimal kısmına ulaştırır. Üretra ile birlikte testisleri vücut dışına bağlayan bölüm son bulmuş olur (Birdal 2010; Budak 2014; Karamazak 2014; Bilgiç 2015).

Testisler histolojik yönden iki kısımda incelenmektedir. Bu kısımlar spermilerin oluşum yerleri olan seminifer tübüller ve intertisyel doku içerisinde kan ve lenf damarları ile birlikte Leydig hücrelerini barındıran interstisyumdur (Bilgiç 2015).

2.1.2.1. İnterstisyum

İnterstisyum, seminifer tübüllerin arasını dolduran gevşek bağ dokusu içerisinde kan kapillerleriyle birlikte fibroblastları, makrofajları, mast hücrelerini ve bunların etrafında yer alan tek ya da gruplar halinde bulunan Leydig hücrelerini ve

kasılabilir özellikteki miyoid hücrelerini barındırır (Birdal 2010; Hatiboğlu 2014; Bilgiç 2015).

Leydig Hücreleri: İnterstisyel alanda düzensiz bir şekilde bol miktardaki kan damarları, lenf damarları ve sinirler arasında yer alırlar. Yuvarlak veya köşeli şekilli, testise özgü 15-20 µm çapında hücrelerdir. Steroidogenezin ve testis homeostasisının düzenlenmesinde önemli rol oynayan bu hücreler aynı zamanda erkek steroid hormonu olan testosteronun üretim ve salgılanmasından da sorumlu olan hücrelerdir (Tuncel 2013; Hatiboğlu 2014; Üstüner 2014). Vücutta bulunan testosteron hormonunun %95'i Leydig hücreleri içerisinde kolesterolden sentezlenerek üretilmektedir. Kalan %5'lik kısım ise adrenal korteks tarafından üretilmektedir. Testosteron üretimi, embriyonik gelişim, seksüel olgunlaşma ve üreme fonksiyonları için gereklidir. Testosteronla birlikte östrojen gibi etkisi bulunan östradiyol da Leydig hücrelerinden salgılanmaktadır. Hipofiz ön lobunun hormonu olan Folikül stimülan hormonun (FSH) ve interstisyel hücreleri stimüle eden hormon (ICSH) tarafından Leydig hücrelerinin denetlenmesi sağlanır. Puberte döneminde gonadotropik stimülasyona uğrayarak yaşam boyu aktif kalacak şekilde yeniden androjen salgılayan hücrelere dönüşürler (Birdal 2010; Oğuz 2013; Bilgiç 2015).

2.1.2.2. Seminifer Tübüller

Testis hacminin %85-90'ını oluşturan, spermatogenezin gerçekleştiği ve testislerin parankimasını oluşturan bölümdür (Satı 2005; Bilgiç 2015). Her iki testiste yaklaşık 1000 civarı bulunan, 150-200 µm çapta ve 20-80 cm uzunluğunda oldukça kıvrıntılı kanalcıklar yapısıdır. Seminifer tübüllerin, 4-8 tabakalı bir epiteli vardır ve tübül lümeni spermatogenik hücre biçimlerinin farklılığı nedeniyle düzensiz görünümündedir (Bilgiç 2015; Caner 2015). Tüm tübül boyunca döşeli destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve bazal lamina üzerinde yer alan spermatogonyal germ hücreleriyle birlikte gelişimin her evresindeki germ hücrelerini içeren seminifer tübüller; erkek üreme hücreleri olan spermatozoonların üretim yeridir (Satı 2005; Caner 2015; Şahin 2016).

Sertoli Hücreleri: Bazal membrandan lümene kadar seminifer tübülün tüm tabakalarında yer alan intra embriyonik sölom epitelinden gelişmiş hücrelerdir. Çoğalma özelliğinde olmayan, uzun, apikal ve yan yüz farklanmaları olan bu prizmatik

hücreler, tübüller arasındaki boşlukta ve tübül lümeni arasında köprü görevi yapmaktadır. Seminifer epitel siklusunun koordinasyonunu sağlayan Sertoli hücrelerinin işlevlerini şu şekilde sıralayabiliriz:

- Spermatogonyal germ hücrelerinden başlayarak spermatozoon oluşumuna kadar gelişen sperm hücrelerinin desteklenmesini, korunmasını ve beslenmesini sağlamak,
- Birbirleri ile yaptıkları sıkı bağlantı kompleksleri sayesinde kan-testis bariyerini oluşturarak kişinin kendi spermine karşı otoimmün cevap veya antikor oluşurmasını önlemek,
- Spermatogenez sonunda oluşan sitoplazma artıklarını ve apoptoza gidecek olan spermatogenik hücrelerin fagosit edilmelerini düzenlemek
- Seminifer tübül lümeninde olgun hale gelen spermin salınımını ve protein ve iyonlardan zengin bir sıvıyı salgılamak,
- Spermatogenez için önemli, testosteron konsantrasyonunu artırmayı sağlayan androjen bağlayıcı proteini üretmek ve salgılamak,
- Folikül stimulan hormonun hipofiz bezinden salınmasını önleyen inhibin hormonunu salgılamak
- Üreme organlarının gelişimi esnasında Müllerian kanalların gerilemesini sağlayan anti müllerian hormonu üretmek ve salgılamaktır (Aydiner 2008; Hatiboğlu 2014; Caner 2015).

Spermatogenik hücreler: Primordial germ hücrelerinden köken alarak gonositlerden kaynaklanan spermatogenik hücreleri; seminifer tübül epitelinin çoğunluğunda bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak şekilde 4-8 tabakalı halde bulunur ve düzenli bir şekilde bölünerek olgun spermlere farklılırlar. Olgunlaşmanın ve farklılaşmanın değişik evrelerindeki hücre tipleri bazaldan lümene doğru sırasıyla spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiyumlar olarak dizilmişlerdir (Mutlu 2013; Osalou 2013; Üstüner 2014). Seminifer tübüllerin bazal membranı üzerinde kan-testis bariyerinin dışında yer alan, yaklaşık 12 µm çapındaki spermatogonyal kök hücreler, küçük

diploid germ hücreleri olup puberteye kadar bölünmeye uğramazlar. Doğumdan önceki dönemde ortaya çıkan farklılaşmamış germ hücreleri çekirdekleri koyu ve açık olarak boyanan olmak üzere iki popülasyondan oluşur. Çekirdekleri koyu boyanan tip A (Ad) bazal membranı üzerinde kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürürken boyanmaları açık olan tip A (Ap) mitoz bölünme geçirip farklılaşarak primer spermatositlere süreklilik sağlayan öncül hücreler olan tip B spermatogonyumları oluşturur. Spermatogenik serinin en büyük hücreleri primer spermatositlerdir. Spermatogonyumlar fetal hayatta inaktif durumda olup mitotik hücre bölünme sürecine puberte döneminde başlarlar (Birdal 2010; Tuncel 2013; Önel 2016).

2.1.3. Spermatogenez

Spermatogenez; erkek üreme organında primitif erkek germ hücrelerinin oluşmasını, sayılarının artmasını ve olgun spermilere dönüşmesini sağlayan; spermatogonyumun birincil spermatosit, ikincil spermatosit ve spermatid evrelerini geçirerek spermatozoanın meydana getirildiği süreçtir. Karmaşık ve yüksek organizasyonlu bir süreç olup, her biri spesifik germ hücre tipiyle bağlantılı olan üç aşama içermektedir. Bu aşamalar; spermatogonyumların proliferasyon aşaması olan mitoz, spermatositlerin oluşturulma ve DNA rekombinasyonunun gerçekleştirildiği aşama olan mayoz ve son olarak spermatid farklılaşmasının gerçekleştirildiği spermiyogenez aşamasıdır. Bu üç aşama farklılaşmamış 46 kromozom içeren spermatogonyumların 23 kromozom içeren yüksek özellikteki sperm hücrelerine dönüşmesiyle sonuçlanır (Çankaya 2006; Oğuz 2013; Hatiboğlu 2014; Önel 2016).

Seminifer tübüller içerisindeki kök hücre rezervini oluşturan spermatogonyumlar düzensiz aralıklarla mitoz bölünme geçirerek koyu tip A spermatogonyum ve açık tip A spermatogonyumları oluşturur. Açık tip A spermatogonyumlar testosteronla uyarıldıktan sonra proliferasyon aşamasına geçerek tip A ve tip B spermatogonyumların üretilmesini sağlarlar. Seminifer tübül bazalinde en çok bulunan spermatogonyum olan tip B spermatogonyumlar büyür ve aşamalı bir gelişme sonrasında mitoz bölünme geçirerek primer spermatositlere dönüşürler. Mitoz aşamasından sonra her primer spermatosit indirgenme bölünmesi olan mayoz bölünme aşamasına girer. Mayoz bölünme sürecinde spermatositler Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar üzerinde bulunurlar ve mayoz bölünme kan-testis bariyeri içerisinde gerçekleşir. Mayoz bölünmenin ilk fazından sonra diploid yapıdaki 46 kromozomlu

primer spermatositler iki adet haploid yapıdaki sekonder spermatositi meydana getirir. Oluşan sekonder spermatositler mayoz bölünmenin ikinci aşamasını tamamlayarak dört adet 23 kromozom sayısına sahip spermatidler meydana getirir. Sekonder spermatositlerin yarı ebatında olan spermatidler yaklaşık 16-22 gün sürecek olan spermiyogenez aşamasına girerek dört adet olgun spermin oluşumunu sağlarlar. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşaması olmakla birlikte akrozom yapısının gelişmesi, flagellum (kamçı) gelişimi ve nükleer yoğunlaşma olmak üzere üç ana olay ile karakterizedir (Çankaya 2006; Doğan 2008; Hatiboğlu 2014; Karamazak 2014).

1. Akrozom yapısının gelişmesi: Akrozom yapısı, döllenme için gerekli son derece önemli hidrolitik enzimlerin depolandığı ve sürekli olarak sentezlerinin gerçekleştirildiği bir kesedir. Akrozom yapısı gelişimini; Golgi, kep, akrozomal ve olgunlaşma evresi olmak üzere dört evrede tamamlar (Hatiboğlu 2014; Bay 2015; Caner 2015).

Golgi evresi, spermatidlerin sitoplazmalarında nükleusa yaklaşık bir alanda belirgin bir şekilde Golgi kompleksi, mitokondriler, serbest halde ribozomlar, bir çift sentriol ve endoplazmik retikulum yer alır. Periyodik-asit schiff (PAS) ile boyanan glikoproteinlerden zengin proakrozomal granüller Golgi kompleksinde birikerek hemen sonrasında membranla sınırlanıp akrozomal vezikül içerisinde tek bir akrozomal granülü oluşturur. Akrozomal granül koyulaşarak büyürken sentriol çiftleri nükleusun karşısında hücre yüzeyine yakın bir yerde konumlanır, sitoplazmada yer alan mitokondriler de hücre çeperine doğru yerleşirler (Hatiboğlu 2014; Bay 2015; Caner 2015).

Kep evresi, akrozomal vezikülün akrozomal granülden yoğunlaşmasıyla nükleusun ön kısmını kaplayan akrozom başlığı oluşur. Oluşan akrozomal başlık akrozom içeriğini sararak akrozomun iç ve dış zar yapılarını meydana getirir. Nükleus zarıyla akrozomun iç zarı arasında granüler-filamentöz bir madde oluşur. Akrozom bölgesinde bulunan nükleus zarı porlarını kaybeder ve iç tarafındaki kromatinlerin yoğunlaşması sebebiyle daha yoğun bir görünüme sahip olur (Hatiboğlu 2014; Bay 2015; Caner 2015).

Akrozomal evre, spermatid morfolojisinin oldukça çok sayıda değişikliğe uğradığı bir evredir. Hyalüronidaz, asit fosfat, akrozin, nöraminidaz ve tripsin

benzeri proteaz yapıdaki hidrolitik enzimleri içeren akrozomun yer aldığı hücrenin ön kutbu seminifer tübül bazaline doğru yönelir bu esnada nükleus daha yoğun hale gelir ve incelişip uzayarak hafifçe düzleşir. Hücre zarının üzerine doğru yaklaşan nükleus tam bir sperm başını oluşturur. Akrozomal evre tamamlandığında Golgi kompleksi nükleusun ön tarafından sitoplazmanın yoğunlaştığı yere doğru ilerler (Hatiboğlu 2014; Bay 2015; Caner 2015).

Matürasyon evresi, spermatogonyum bölünmeleri sırasında sitoplazmik köprüler ile birbirine bağlı kalan hücreler spermatogenez sürecini tamamladıklarında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerini dökmeye başlarlar. Sertoli hücreleri tarafından artık cisimcikler fagositte edilir. Daha sonra geç evredeki spermatidler Sertoli hücrelerince seminifer tübül lümenine doğru bırakılarak serbest hale getirilir. Geç evredeki spermatidler olan spermelerde sperm başı, sentriol ve mitokondrilerden şekillenen kuyruk kısımları şekillenir. Sertoli hücrelerinden ayrılan spermelerin metabolik ihtiyaçları ve beslenmeleri epididim ve sekonder seks organlarından salgılanan maddeler ile sağlanır (Hatiboğlu 2014; Bay 2015; Caner 2015).

2. Flagellum (kamçı) gelişimi: Keratin içeren yoğun dış lifler ve fibröz kılıf ile sarı aksonem denilen yapının uzaması ile oluşan flagellum distal sentriyolden çıkan mikrotübüllerden gelişir. Flagellumun proksimal parçası etrafında toplanan mitokondriler matürasyon aşaması esnasında gelişip flagellum gelişimi boyunca dizilimlerini tamamlayarak sarmal bir kılıf halinde orta parça olan kalınlaşmış bölgeyi meydana getirirler. Meydana gelen bu kılıf sperm için gerekli enerjinin sağlanmasında görevlidir (Hatiboğlu 2014; Bay 2015; Caner 2015).

3. Nükleer yoğunlaşma: Sperm genomik DNA'sının stabilize edilerek korunması için sperm DNA'sında yer alan somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve sisteinden zengin bazik proteinler olan protaminlerle yer değiştirir. Bu protamin değişiminden sonra nükleer yoğunlaşmanın başlamasıyla nükleozomların kaybolması, nükleus materyalinin kondenzasyonu için de düz kromatin liflerin yan yana dizilimi gerçekleşir ve transkripsiyon sona erdirilir. Spermatogenez sırasında nükleer yoğunlaşmayla nükleus, somatik hücre yapısında olan nükleozomu spermium yapısındaki nükleoprotamine dönüştürmüş olur (Hatiboğlu 2014; Bay 2015; Caner 2015).

Spermatogenezin gerçekleştirilmesinde FSH, Luteinizan Hormon (LH), testosteron ve androjen taşıyıcı hormonların büyük rolleri vardır. Sertoli hücrelerinin androjen taşıyıcı proteinleri sentezlemeleri, spermatogonyal hücrelerinin proliferasyonunun uyarılması FSH hormonu ile sağlanırken; Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması LH hormonu ile sağlanır. Testosteron ise spermatogenezin sürekliliğini sağlarken buna ilave olarak sekonder seks karakter görünümünü, seksüel olgunlaşmayı, genital duktuslar ve yardımcı bezlerin fonksiyonlarının devamlılığını kontrol eder. Spermiyogenez süreci de dahil olarak spermatogenez yaklaşık 72 gün sonra spermilerin kaudal epididimise ulaşmalarıyla sona erer. Epididimise ulaşan hücreler morfolojik olarak matür; fakat fonksiyonel olarak incelendiğinde immatür haldedirler. İmmotil ve fertilizasyon kapasitesi düşük olan spermier epididime geldiklerinde gelişimlerini tamamlayarak hareketlilik ve yumurtayı tanıyarak onu fertilize edebilme kabiliyetlerini kazanırlar. 4-10 günlük sperm olgunlaşması olarak tanımlanan bu süreçten sonra spermier, ejakülasyon ile farklı kanallardan geçerken seminal veziküller ve prostattan salgılanan sıvılarla karışarak vücut dışına bırakılır (Javadova 2008; Karamazak 2014; Şaylan 2015; Önel 2016).

2.1.4. Sperm Yapısı

Vücuttaki çoğu hücre ve yumurta hücresinden daha küçük boyutlara sahip olan sperm hücresi işlevine göre şekillenmiş bir yapıya sahiptir. Morfolojik ve fonksiyonel olarak olgunlaşmasını tamamlayan sperm; yumurtayı dölleyebilmek için serbest bir şekilde yüzebilen, nükleusunda 23 kromozom bulunduran, sitoplazması az, ince, uzun, hareket kabiliyeti bulunan bir hücredir (Ok 2005; Mutlu 2013; Fidan 2018; İsak 2018). Baş ve kuyruk olmak üzere iki ana komponentten oluşan silindirik biçimli sperm 56-65 µm total uzunluğundadır. Genetik materyali taşıma görevini baş kısım üstlenirken oosite doğru spermi yönlendirerek hareket edebilmeyi de kuyruk kısmı sağlar (Durak 2015; Sözen 2017; Fidan 2018).

1) **Sperm Başı:** Fusiform şekilli, uzunluğu 4-5 µm, genişliği 3 µm, kalınlığı 1 µm olan, sperme ait DNA'yı içirme, koruma ve fertilizasyon esnasında bu içeriğini oosite aktarma gibi fonksiyonları bulunan sperm başı; kondanse nükleus, akrozomal kese ve post akrozomal kılıftan oluşmuştur.

Akrozomal kese; nükleusun apikal kısmının üçte ikisini kaplayan, glikoprotein yapıda olan, dış akrozomal membran ve iç akrozomal membran ile birlikte bunların arasında yer alan birçok hidrolitik enzimin paketlenmiş olarak depolandığı akrozomal matriksten oluşmaktadır. Spermiyogenez sırasında Golgi aygıtından farklılaşan akrozomal kese, spermin oosit membranına penetre olmasını ve zona pellusidaya nüfuz edip delerek geçmesini sağlayan önemli enzimler olan; hiyalüronidaz, proakrozin, akrozin, esteraz, nöraminidaz, asit fosfataz, fosfolipaz, arilsülfataz B, N-asetil glukozaminidaz, arilamidaz, kollajenazı içermektedir (Ok 2005; Satı 2005; Şaylan 2015).

Post akrozomal kılıf; nükleusun apikal kısmının 1/3'lük bölümünü oluşturan, fertilizasyon esnasında oosit zarı ile temas halinde olacak olan önemli bir bölgedir. Post akrozomal kılıf, nükleus ile ayrılmasını sağlayan ince bir tabaka olan peri-nükleer maddeden oluşmuştur. Peri-nükleer madde, akrozom ile nükleus arasında kesintisiz bir tabakayla sert bir yapı meydana getirerek çekirdeğin üzerini kaplar (Ok 2005; Satı 2005; Şaylan 2015).

Kondanse nükleus; sperm rahatça hareket edebilmek için en az hacimde, oldukça sıkıca paketlenmiş, yazılıma kapalı genomik bir DNA'yı içerir. Genomik DNA protaminlerle bir kompleks halinde bulunur ve bulundurduğu sistein miktarı sebebiyle nükleusa sağlamlık ve dayanıklılık kazandıran disülfid çapraz bağlarından zengindir. Oosite giriş olmadan ve protaminler nükleustan ayrılmadan DNA'nın aktive olması sağlanamaz (Ok 2005; Satı 2005; Şaylan 2015).

2) **Sperm Kuyruğu:** Ortalama 45-50 µm uzunluğunda ve 0.4-0.5 çapındaki bu kısım, sperm hareketliliğinden sorumlu enerji üretim bölgesi olup proksimalden distale doğru kuyruğun ince yapısı; bağlantı parçası, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört bölümden meydana gelmektedir. Sperm bağlantı parçası; sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapan bir çift sentriolün bulunduğu, uzunluğu yaklaşık 0.5µm olan sperm başı ve kuyruk orta parçası arasındaki bağlantıyı sağlayan kısa segmenttir. Orta parça; içerisindeki mitokondriyal yapı sarmal bir şekilde düzenlenmiştir. Bu bölgede yer alan mitokondriler sperm metabolizması ve hücre enerjisi için gerekli olan Adenozin Trifosfat (ATP)'ı üretmektedir. ATP'den elde edilen enerjinin motiliteye dönüştürülmesini ise aksonem düzenler. Orta parça distale doğru incelerek mitokondriyal sarmalın son halkası olan

annulus ile sonlanırken esas parça ile birleşim gösterir (Hatiboğlu 2014; Üstüner 2014; Bay 2015; Caner 2015; Erimşah 2017; Sancar 2018).

Kuyruğun en uzun bölümü olan esas parça 40 µm uzunluğunda, aksonem ve esas parçaya özel olan dış yoğun fibrillere ek destek sağlayan fibröz kılıftan meydana gelir. Dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf sperm hareketliliğinde yardımcı olur. Sadece plazma membranı ile çevrili aksonem çiftlerini içeren, kuyruğun terminal kısmını oluşturan son parça yaklaşık 5-7 µm'dir. Son parçayı saran plazma membranı, sperm iyon ve moleküllerinin transmembran hareketini kontrol eden özelleşmiş bir membrandır. Son parçada kuyruk ucuna gelindikçe aksonemin mikrotübüler yapısı ortadan kalkar (Üstüner 2014; Bay 2015; Caner 2015; Ürgüplüoğlu 2016; Erimşah 2017; Sancar 2018; Uğurlu 2018).

2.1.5. Semen Analizi (Spermiogram)

Seminal sıvı, üretilen sperm hücrelerinin testis ve epididimisten gelen salgılarla birlikte ejakülasyon esnasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretral bezlerin sekresyonlarıyla birleşerek meydana gelir.

Semen analizi, erkekteki fertilité potansiyelini tespit etmek amacıyla bireyden alınan ejakülatta seminal plazmanın, sperm dışı hücrelerin ve spermin; sayımı, hareketliliği, morfolojisi, viabilitesi gibi parametrelerinin ve daha birçok faktörün değerlendirildiği bir biyobelirteçtir (Gökçe 2011; Hatiboğlu 2014). Semen analizinde incelenecek olan ejakülat, en az süreyle 48 saat ve en uzun süreyle 7 günlük cinsel perhiz sonrasında en güvenilir ve kabul edilebilir yol olan mastürbasyon ile steril, sperm üzerinde toksik etkisi bulunmayan, kuru, geniş ağızlı tek kullanımlık bir kap içerisine, muayenenin yapıldığı laboratuvarı veya evde toplanır. Evde toplanan numune, nakil süresince vücutla temas edecek şekilde muhafaza edilerek en geç 30 dk içerisinde tetkikin yapılacağı laboratuvara getirilmiş olmalıdır.

Yapılan cinsel perhiz süresinin iki günden az olması verilen numunenin yoğunluğunu ve volümünü; yedi günü geçmiş olması da yine semenin yoğunluğunu, volümünü, sperm hareketliliğini ve morfolojisini olumsuz yönde etkileyecektir. Ejakülatın verilmesi aşamasında; lubrikan maddeler veya koitus interruptus (geri çekme) gibi yöntemler, sabun kullanımı, glans penisin ıslak bir mendille silinmesi vb. gibi semene yabancı madde bulaşımına neden olacak yollara başvurulmamalıdır.

Toplanan numune ejakülatın verilmesi sonrasında ilk bir saat içerisinde değerlendirilmeli ve iki saati geçmiş, kontamine olmuş numuneler kullanılmamalıdır. İnfertil çiftlerin araştırılmasında, yapılan analizden daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi açısından Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) önerisine bakılarak en kısa 7 gün en uzun süreyle ise 3 ay arayla alınan en az iki semen örneği mutlaka değerlendirilmelidir (Satı 2005; Aktaş 2007; Ercan 2015; Kızılkın 2015; Şen 2015; İpek 2016; Tanrıöver 2017).

Semen analizi yani spermiogramın standart olarak makroskobik ve mikroskobik inceleme olarak iki alt başlıkta değerlendirilmesi yapılır. Koagülasyon, likefiye olma süresi, renk, koku, volüm, pH, viskozite gibi semenin görünümü üzerine tanımlayıcı özellikteki değerlendirmeler makroskobik incelemeye girerken, sperm konsantrasyonu, motilite, viabilite, morfolojik yapı, aglütinasyon ve agregasyon varlığının derecelendirilmesi, sperm dışı hücrelerin sayımı gibi parametreler mikroskobik incelemeye girmektedir (Satı 2005; Aktaş 2007; Birdal 2010; Gökçe 2011).

Semenin steril bir kaptan toplanması işleminden sonra 15-60 dk arasında likefiye olması beklenir. Semen likefiye olmasıyla makroskobik ve mikroskobik incelemelerin analizlerine geçilir (Tablo 1) (Ok 2005; Koç 2015; Kayan 2016).

Tablo 1: DSÖ kriterlerine göre en düşük semen analiz referans değerleri (WHO 2010)

Sperm Parametreleri	En Düşük Referans Değerleri
Semen Volümü (ml)	1.5
Semen pH'ı	≥7.2
Vitalite (Canlılık) Testi	58 (55-63)
Total Sperm Sayısı (10^6 /ejakülat)	39 (33-46)
Sperm Konsantrasyonu (10^6 /ml)	15 (12-16)
Sperm Progresif Motilitesi (PR, %)	32 (31-34)
Sperm Total Motilitesi (PR, NR, %)	40 (38-42)
Sperm Morfolojisi (Normal Formlar, %)	4 (3.0-4.0)
Peroksidaz Pozitif Lökosit	<1

2.1.5.1. Semen Makroskopik Olarak İncelenmesi

Koagülasyon; semenin koagüle olmasını seminal vezikül ve epididimal kaynaklı faktörler etkilemektedir. Ejakülasyon sonrasında ejakülatın sıvı durumdan semisolid duruma geçmesi koagülasyon olarak adlandırılır. Koagülasyon gerçekleşmemesi durumu vas deferens ya da seminal veziküllerin bulunmamasına işaret edebilir (Gökçe 2011; İpek 2016; Tanrıöver 2017).

Likefaksiyon; prostat kaynaklı ve veziküler proteinlerin etkileşmesi sonucunda ortaya çıkan; proteolitik enzimler (fibronilizin, fibrinokinaz, aminopeptidaz), plazminojen faktörleri ve prostat spesifik antijen (PSA) semenin likefiye olmasını yani tekrar sıvılaşmasını sağlarken bu likefaksiyon, numunenin verilmesinden itibaren ortalama 15 dk içerisinde gerçekleşir. Normal şartlar altında likefiye süresi 15 dk ila 60 dk arasındadır. Likefaksiyon süresinin kısaltılması ve kolaylaştırılması için verilen semen 37°C’de inkübe edilebilir. Sıvılaşmanın gerçekleşmediği durumlarda mekanik ya da enzimatik yolla çözme sağlanabilir. Amorf veya uzamış süredeki likefaksiyonda prostat sekresyonunun azalmış olmasından ya da ejakülatör kanal obstrüksiyonu oluşumundan şüphelenilebilir (Gökçe 2011; Ercan 2015; Yokuş 2015).

Renk; semen likefiye olmadan önce bakıldığında homojen yapıda, mat beyaz-gri ve opak bir görünümdeydir. Semen konsantrasyonunun düşük olması opak görünümü azaltır. Semen veren kişi ikterik ise bu görünüm sarı, üretral bir kanaması varsa pembe olabilmektedir. Cinsel perhiz süresinin artmış olması sarımsı bir görünüme, ejakülatta lökosit varlığı beyaz bir renk, eritrositlerin varlığı da kırmızı-kahverengi bir renk oluşumuna sebebiyet verir (Gökçe 2011; Yokuş 2015; İpek 2016; Tanrıöver 2017).

Koku; semenin kendine özgü bir kokusu vardır ve bu koku kestane çiçeği kokusuna benzemektedir. Semen kokusunun prostat sekresyonlarından kaynaklanan sperm oksidasyonu sebebiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir (Gökçe 2011; Dinç 2015; Ercan 2015).

Volüm; ağırlıklı olarak seminal vezikül, prostat bezi, küçük bir oranla bulboüretral bezler ve epididimis semen volümünün oluşumuna katkıda bulunur. Total sperm hücre sayısının ve sperm dışı hücrelerin sayısının hesaplanması için volümün

bilinmesi oldukça önemlidir. DSÖ'den baz alınan kriterlere göre semen volümü veya hacmi 1.5 ml veya üzerinde olmalıdır. Cinsel perhiz süresinin kısa olması, retrograd ejakülasyonu, ejakülatör kanalındaki darlık ya da toplanma esnasında örneğin dökülmüş olma riski gibi nedenler sonrasında semen volümünün 1 ml'den az olması beklenebilir ve bu durum hipospermik olarak adlandırılmaktadır (Gökçe 2011; Dinç 2015; Ercan 2015; Yokuş 2015; İpek 2016; Tanrıöver 2017).

pH; semenin normal değerlerdeki pH'sı hafif bazik özellikte ve 7.2-8.0 arasındadır. pH ölçümünde homojenize edilen numuneden bir damla pH kağıdı üzerine konularak 30 saniye içerisindeki renk değişimi kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılır. Ejakülatın verilmesinden yaklaşık 30 dk içerisinde veya en fazla 1 saat içerisinde semen pH'sının ölçümü yapılmalıdır. Seminal vezikül sekresyonları alkali özellikteyken prostat sekresyonları asidik özelliktedir. Semen pH'sının normal değerde olabilmesi için bu sekresyonların dengeli bir halde olması gerekmektedir. Semen pH'sının 7 altında bir değerde olması idrar karışması ya da enfeksiyon olasılıklarını düşündürebilir. Akut enfeksiyon veya ölçümün geç yapılmış olması nedeniyle de pH yüksek çıkabilmektedir (Gökçe 2011; Kaya 2016).

Viskozite; semenin gösterdiği karşı direnç veya yapışkanlık demektir ve normal özellikte kabul edilen bir semen visküz olmalıdır. Semen yüksek viskozite halinde olması motilite ve konsantrasyonu etkileyebilir. Likifiye olmuş bir semenden geniş ağızlı bir pipetle veya enjektörle alınan örnek yerçekimi etkisi ile damlatılarak damla ile pipet ya da enjektör arasında oluşan ince iplikçiğin uzunluğuna bakılır. Viskozitenin anormal olduğu durumlarda uzunluk 2 cm'yi geçmektedir. Oluşan iplikçiğin damla damla akması beklenir. Viskozitenin artmış olduğu durumlarda prostatit, vezikülit gibi kronik enfeksiyonlar irdelenebilir (Birdal 2010; Gökçe 2011; Caner 2015; Ercan 2015; Şaylan 2015, Yokuş 2015; İpek 2016; Kaya 2017).

2.5.1.2. Semen Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Taze semenin makroskopik incelenmesinin tamamlanmasından sonra bir damla semen örneğinin; faz-kontrast mikroskobu ile semen incelenmesi için genellikle geliştirilmiş Neubauer hemositometresi ya da Makler sayım kamarası kullanılarak mikroskopik incelenmesi gerçekleştirilir. Bunların dışında microcell, Cell UV, Standard Count gibi sayım yöntemleri de kullanılabilir. Semen morfoloji ve viabilite

incelenmesinin yapılması için temiz lam üzerine alınan bir damla örnek yayma yapılarak supravital boyalar kullanılarak boyanır ve mikroskopta incelenir (Aksoy 2008; Şaylan 2015; Koç 2015; İpek 2016; Sözen 2017).

- **Makler kamarası ile sayım:** ikili optik cam sistemi esasına dayalı Makler kamarası 10 mikron derinliğinde olup merkezinde her biri 0,1x0,1 mm'lik 100 kareden oluşan ince kılavuz çizgiler bulunmaktadır. Üst cam kapak görevi görürken aradaki boşluk kuvars pimler kullanılarak sağlam bir şekilde sabitlenmiştir. x20 objektifli mikroskopta bir pipet ya da enjektör yardımıyla semenden alınan örnek kamaranın cam orta kısmına kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek damlatılır ve üst cam kapak saat 12 veya saat 6 hizasına gelecek şekilde sıkıca kapatılarak sayım yapılır. 10 kare üzerinde sayım yapılarak bulunan sayı 106 ile çarpılarak sperm sayısı belirlenir. Sperm sayısının düşüklüğünde tüm sahanın sayımı yapılır. Sonuç doğruluğundan emin olabilmek için aynı sayım 10 farklı kare üzerinde en az 4 kez tekrarlanır (Dinç 2015; Şaylan 2015; Yiğit 2015; Can Karagöz 2018).

- **Neubauer hemositometresi ile sayım:** iki adet 3x3'lük sayım kamarasının bulunduğu hemositometrede her kamara 1x1'lik 9 adet kare içerir. Bu karelerin derinliği 100 µm olup 1, 3, 7 ve 9 numaralı kareler 16 tane; 2, 4, 6 ve 8 numaralı kareler 20 tane; ortada yer alan 5 numaralı kare ise 25 tane küçük kareden oluşmuştur. 190 µl distile su ya da metilen mavisi ilave edilmiş 10 µl semene %1'lik formalin solüsyonu eklenerek karıştırılır ve kamaranın lamel kıyısından 10 µl sızdırılarak konulur. Merkezde yer alan 5 kare semenin 2-3 dk yerleşmesi beklendikten sonra sayılır. Sayımı tamamlanan hücrelerin $\times 10^6$ ile konsantrasyon değeri bulunur. Sayım hatalarını önleyebilmek için iki kere yapılan sayımın her birinde 200 adet sperm sayılmalıdır (Yiğit 2015; Kayan 2016).

Sperm Konsantrasyonu; semen volümünde her bir ünite başına düşen sperm sayısını ifade eder ve en düşük referans değeri 15 x milyon/ml'dir. Total sperm sayısı ise ejakülatın tümündeki sperm sayısını ifade eder ve semen analizinde bulunan sperm konsantrasyonundan elde edilir. Total sperm sayısının en düşük değeri 39×10^6 olup obstrüksiyon olmaması durumunda ya da perhiz süresi uzun değilse testis volümü ile korele haldedir. Mikroskobik incelemenin ilk konsantrasyon sayımında kamarada sperm hücresi gözlenmediği takdirde ejakülatın tümü 3000g'de 15 dk santrifüj edilerek pellet elde edilir. Oluşan pelletten 10 µl alınarak lam lamel arasında incelenir.

Sperm hücresinin görülmesiyle sayı, motilite, belirgin morfolojik özellikleri kaydedilir. Hiç sperm hücresi görülmemesi üzerine hasta azoospermi olarak adlandırılır (Gökçe 2011; Yokuş 2015; İpek 2016).

Motilite; elde edilen sperm konsantrasyonunda hareketli spermelerin yüzdesi olarak ifade edilmektedir. Semen verilmesinden itibaren ilk 30 dk içerisinde oda ısısı veya 37°C’de genellikle Faz-kontrast mikroskobu kullanılarak x200 büyütmede birden çok örnek damlası bakılarak motilite tayin edilmektedir. Işık mikroskobu altında oda ısısı düzeyinde Makler kamerası ile değerlendirilen sperm motilitesi; a tipi (hızlı doğrusal ilerleyici hareket), b tipi (yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan ilerleyici hareket), c tipi (yerinde hareket) ve d tipi (hareketsiz) olmak üzere dört tip sperm hareketi baz alınarak hesaplanmaktadır (Ercan 2015; Şaylan 2015; Tanrıöver 2017).

- a tipi (+4) motilite, doğrusal bir düzlemde ileri hareketlilik gösteren sperm motilitesidir.
- b tipi (+3) motilite, a tipi motilite özelliğinde yalnızca ileri hız gözlenmeyen ya da hızlı hareketi bulunup doğrusal yönde ilerlemeyen sperm motilitesidir.
- c tipi (+2) motilite, ileri hareketi bulunmayıp yerinde hareketlilik gösteren sperm motilitesidir.
- d tipi (+1) motilite, immotil halde bulunan sperm grubudur (Durak 2015; Uğurlu 2018).

Subjektif olarak yapılan motilite tayini kişiler ve laboratuvarlar arası farklı sonuçlar ortaya konulmasına neden olmaktadır. Bu nedenle DSÖ hızı referans olarak almadığı kriterlerde sperm motilitesini değerlendiren üç grup belirlemiştir. Bunlar:

- Progresif motilite (PR), doğrusal ya da geniş bir daire içerisinde hareketli olan sperm hareketidir.
- Nonprogresif motilite (NP), daha küçük daireler içerisinde ilerlemenin olmadığı, baş hareketinin zorlukla olduğu veya olmadığı kuyruk hareketini gözlemlendiği spermiler ile tanımlanmaktadır.
- İmmotilite (IM), hareketin olmadığı spermileri ifade eder.

DSÖ’de alınan karara göre normal olarak belirlenen bireyin progresif hareketli sperm yüzdesi minimal %32, totalde bulunan hareketli sperm yüzdesinin de %40 olmalıdır (Hatiboğlu 2014; Yokuş 2015; Demirel 2018).

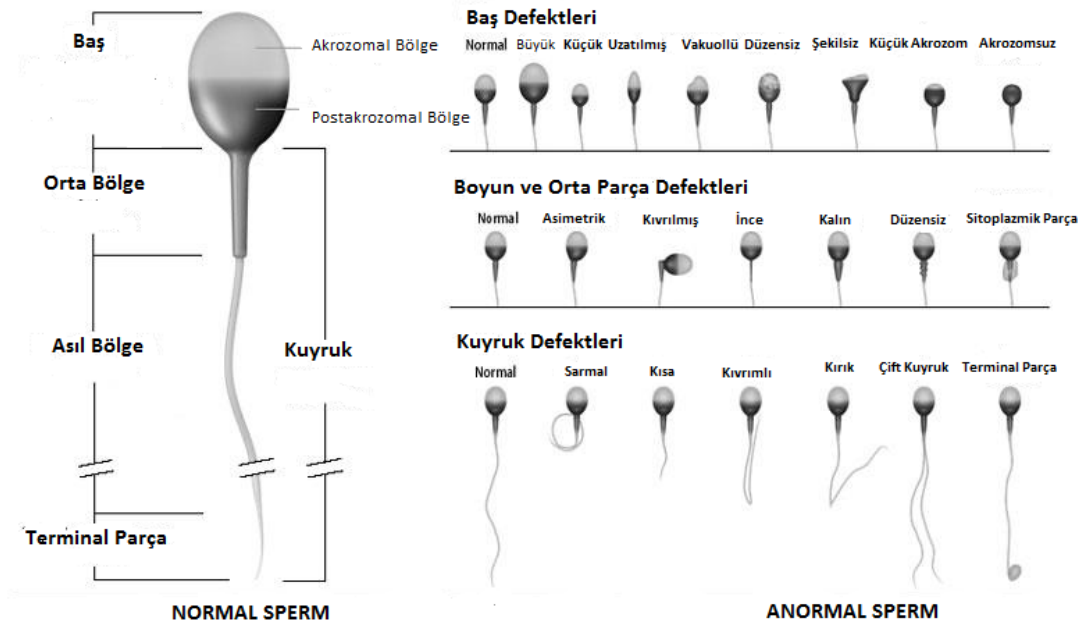
Viabilite; sperm viabilitesi yani canlılığı spermin hücre membranının bütünlüğüyle ifade edilir ve hipoozmotik şişme testi ya da boyama yapılarak canlı hücreler tespit edilir. Eosin-nigrosin veya eosin-Y boyama testlerinde membran bütünlüğünü kaybederek canlılığını yitirmiş spermier eklenilen boyayı içine alır ve boyanmış bir halde görünürler. Hipoozmotik şişme testinde ise hipoozmolar sıvının membran bütünlüğü bulunan hücreler tarafından hücre içine alınmasıyla spermierin şişerek kuyruklarının kıvrıklaşması beklenir. Viabilitenin belirlenmesi için alanda en az 200 sperm sayılması istenmektedir. İmmotil olarak bulunan spermierin canlılığı klinik açıdan önemli olup canlı hücre sayısı motil hücre sayısından fazladır ve ölü hücre sayısı immotil hücre sayısını aşmamalıdır. DSÖ’nün belirlediği kriterlere göre viabilite için minimum değer %58’dir (Gökçe 2011; Koç 2015; Şaylan 2015; Yokuş 2015).

Morfolojik Yapı; morfolojik olarak değerlendirildiğinde insan spermi değişkenlikler gösterebilmektedir fakat zona pellusida yüzeyinden ve postkoital mukus içerisinden elde edilen spermierin incelenmesiyle sperm hücresi için morfolojik olarak normal kabul edilen kriterler belirlenmiştir. Spermierin morfolojik yapılarının belirlenmesi için hazırlanan semen smearı havada kurutulduktan sonra Papanicolaou, Shorr, Diff-Quick, Spermac, Hematoksilen-Eosin ve Giemsa gibi sperm boyaları ile boyanır ve immersiyon yağıyla 10x100 büyütmede inceleme yapılır. Toplamda sayılan en az 200 sperm baş, orta parça-boyun, kuyruk yapılarına bakılarak analiz edilir ve normal morfolojili spermierin yüzdesi hesaplanır (Tablo 2). Normal morfolojideki spermierin olması gereken yüzdesi minimum %4 tür (Ok 2005; Durak 2015; Şaylan 2015).

Tablo 2: DSÖ 2010 sperm morfoloji parametreleri ve kriterleri (WHO 2010).

Morfoloji parametreleri		DSÖ 2010 SPERM MORFOLJİ KRİTERLERİ
Baş	Genişlik	2.8 µm
	Uzunluk	4.1 µm
	Boy/ En	1.5 µm
	Akrozomal Bölge	Başın %40-70'ini kaplamalıdır.
Orta parça-Boyun	Genişlik	0.6 µm
	Uzunluk	4.0 µm
Kuyruk	Genişlik	< orta parça
	Uzunluk	45 µm
Sitoplazmik Artıklar		< Normal baş alanı 1/3'ü

Spermin normal morfolojik özelliklerinin belirlendiği günümüzde kullanımı mevcut bir diğer kaynakta Kruger kriterleri'dir. Kruger kriterlerine göre baş yapısı; oval şekilli, uzunluğu 3-5 µm, genişliği ise 2-3 µm, eni uzunluğun 3/5'i veya 2/3'ü arasında değişmeli ve akrozom bölgesi başın ön kısmının %40 ila %70'i arasında olmalıdır. Orta parça ve boyun; sperm başına uzun eksenin hizasında bağlanmış, eni 1 µm, boyu uzunluğun 1.5 katı olacak biçimde, silindirik şekilli olmalı ve boyun bozulmamış bir halde bulunmalıdır. Sitoplazmik artıklar, baş büyüklüğünün 1/2'sini aşarsa anormal kabul edilmektedir. Kuyrukta ise; uzunluk 34-45 µm arasında, düzgün yapılı ve orta kısımdan kıvrım ya da bükülme göstermeyecek biçimde olmalıdır (Gökçe 2011; Tuncel 2013).



Şekil 1: Normal ve anormal morfoloji yapılarına sahip sperm (WHO 2010).

Aglütinasyon ve Agregasyon Varlığının Derecelendirilmesi; hareketsiz halde bulunan spermilerin ortamdaki debris materyali ya da sperm dışı hücrelerle yapışması durumuna sperm agregasyonu; hareketli spermilerin birbirleri arasında baş-baş, kuyruk-kuyruk veya karışık bir şekilde yapışmasıyla oluşan duruma ise sperm aglütinasyonu adı verilmektedir. Sperm aglütinasyonunun grade 1-4 olarak sınıflandırılması yapılmaktadır. Grade 1 (izole), aglütinasyon başına ayrılan sperm sayısı 10 spermatozoonun altında olup spermilerin çoğu serbest haldedir. Grade 2 (orta), aglütinasyon başına 10-50 adet sperm sayılır. Grade 3 (geniş), aglütinasyon başına düşen sperm sayısı 50'nin üstündedir ve sadece bazı spermatozoonlar serbest halde bulunur. Grade 4 (bütün), tüm spermier aglütine olmuştur ve aglütinasyon bağlantıları arasında görülür (Ercan 2015; Şaylan 2015; Koç 2015; İpek 2016).

Sperm Dışı Hücrelerin Sayımı; semen içerisinde epitel hücreleri, spermatogenik seriye ait hücreler ve inflamatuvar hücreler olan lökositler gibi yuvarlak hücreler bulunabilmektedir. Semen analizinde bu yuvarlak hücrelerin sayısının 5×10^6 değerinde ya da bu değerin altında bulunması beklenir. 1 ml semen içerisindeki lökosit konsantrasyonu 1×10^6 'nın üzerinde olmamalı, olması durumunda ise örnek lökospermi olarak değerlendirilir ve enfeksiyon varlığından şüphelenilir. Sperm dışındaki hücreler mikroskopik gözlem ile sayılabileceği gibi Leucoscreen testi ile de tespit edilebilmektedir. Semende lökosit varlığının tespiti için peroksidaz

boyama kullanılmalıdır. Lökositler semen içerisinde bulunduklarında oksidatif stress oluşumuna sebebiyet verip ROS üretimini artırarak sperm DNA'sı ve sperm hareketi üzerine olumsuz etki ederler (Yokuş 2015; İpek 2016; Kayan 2016; Sözen 2017; Can Karagöz 2018; Moshfeghi 2018).

Tablo 3: Semen analizinde sperm değişkenleri terminolojisi (WHO 2010).

Normozoospermi	Sayı, motilite ve morfoloji ve diğer sperm parametrelerinin DSÖ alt referans değerlerine uygun olmasıdır.
Oligozoospermi	Sperm konsantrasyon değerinin baz alınan referans değerden daha düşük olmasıdır.
Polizoospermia	Sperm konsantrasyonunun üst referans değerinde bir değerde olmasıdır.
Astenozoospermi	Konsantrasyon değerinin normal olmasına rağmen motil durumdaki sperm sayısının referans değerden az olmasıdır.
Oligoastenoteratozoospermi	Konsantrasyon, morfoloji ve motilite parametrelerindeki defektlerin bir arada görülmesi durumudur.
Teratozoospermi	Konsantrasyon ve motilite açısından normal değerlerde olan semenin morfoloji değerinin referans altında olmasıdır.
Kriptoospermi	Verilen taze semen içerisinde hiç sperm görülmezken santrifüj sonrası semende sperm görülmesidir.
Nekrozoospermi	Semen içerisinde bulunan tüm sperm hücrelerinin ölü olmasıdır.
Lökospermi	Semendeki lökosit sayısının ml'de 1×10^6 'dan fazla olmasıdır.
Azoospermi	Verilen semen içerisinde hiç sperme rastlanılmaması durumudur.
Aspermi	Ereksiyon sonrası seminal plazma üretiminin hiç olmamasıdır.
Globozoospermi	Sperm hücresinde akrozom bulunmamasıdır.
Hipospermi	Semen volümünün 1 ml'den az miktarda olmasıdır.
Hiperspermi	Semen volümünün 6 ml'den fazla miktarda olmasıdır.

2.2. İNFERTİLİTE

İnfertilite, en az bir yıl süreyle hiçbir korunma yöntemi kullanılmadan düzenli cinsel ilişkiye rağmen çiftlerin çocuk sahibi olamamaları olarak tanımlanmaktadır (Sezgin ve Hocaoglu 2014; Tekden Kırgız 2015). Dünya çapında yaklaşık olarak 72.4 milyona yakın çifti etkileyen infertilite; fizyolojik, psikolojik sosyolojik yönleri ile önemli bir şekilde ortaya çıkan ciddi bir sağlık sorunudur. İnfertiliteye sebebiyet verebilecek; yaş, cinsiyet, meslek, çevre faktörleri, beslenme şekli, hormonal bozukluklar, genetik nedenler, üriner sistem enfeksiyonları vb. gibi faktörler olmakla beraber bunlara ek olarak kadında; oosit kalitesinin kötü olması, ovulatuvar bozukluklar görülmesi, tubal ve uterin patolojilerin oluşumu, menstural siklusa düzensizlikler gözlenmesi, endometriumda oluşan sıkıntılar, erkekte ise çoğu zaman bilinmeyen nedenlerle birlikte; varikosel, inmemiş testisler, testis torsiyonu gibi etkenler bulunmaktadır. Bu etkenler tek başlarına ya da birbirleriyle kombine bir şekilde infertilite oluşturabilmektedir. İnfertilite olgularının %50'sinden kadın, % 40'ından ise erkek sorumludur. Sebeplerinin açıklanamadığı durumlardan dolayı oluşan infertilite ise %10'luk bir oranı kapsamaktadır (Hassa 2003; Aksu 2010; Hatiboğlu 2014; İpek 2016; Song ve ark. 2016; Can Karagöz 2018).

2.2.1. İnfertilitede Erkek Faktörü

Üreme çağındaki erkek bireylerin yaklaşık %8'i için infertilite önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Normal bir fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için spermin bazı basamakları tamamlaması gerekmektedir. Bu basamaklar; spermin maturasyon ve kapasitasyonunu tamamlaması, hiperaktivasyon kazanması, zona pellusidaya bağlanması, akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi, sperm ile oosit membranının kaynaşması, kromatin dekontansasyonu ve son olarak da erkek ve dişi pronükleuslarının birleşimidir. Hormonal aksın düzgün bir şekilde işlemesi ve normal genetik yapıya sahip spermin bulunması bu basamakların gerçekleşmesi için önemliyken erkek bireyde infertilite; konjenital, edinsel ya da sistemik bozukluk nedenleri sonucu meydana gelebilmektedir. Erkekte nedenleri ile ele alındığında infertilite; non-obstrüktif, obstrüktif ya da idiyopatik infertilite olarak gruplandırılmaktadır. Non-obstrüktif infertilite, testisler tarafından yeterli sayı ve harekette sperm üretilmemesi sonucu görülmektedir ve hormonal bozukluklar, genetik nedenler, varikosel, üriner sistem enfeksiyonları, prostatit, epididimit ve orşit

gibi nedenlerden dolayı oluşmaktadır. Obstrüktif infertilite, sperm üretiminin normal olarak gerçekleşmesine rağmen üriner sistemdeki farklı bir kısımda tıkanıklık meydana gelmesi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. İnmemiş testisler, gonadal toksinlere maruz kalma, testis torsiyonu, testis tümörleri, otoimmün infertilite gibi ve çeşitli tanımlanamayan nedenler sonucunda ortaya çıkan infertilite ise idiyopatik infertilite olarak bilinmektedir (Oğuz 2013; Lipovac ve ark. 2014; Şaylan 2015; İpek 2016; Can Karagöz 2018).

Erkek bireyin fertilité düzeyi sistematik bir şekilde yapılan çeşitli incelemelerin değerlendirilmesi sonucu belirlenmektedir. Bu incelemeler; anamnez, fiziksel muayene ve laboratuvar da semenin analiz edilmesi olmakla birlikte değerlendirme sonucuna ve bireyin infertilite etiyolojisine göre ek semen analizi, endokrin değerlendirme, postejakülatuar idrar analizi, ultrasonografi, semen ve spermle ilgili özel testler ve genetik tarama gibi ek testlerden yararlanılabilir. Bireye infertilite tanısının konulmasının ardından yardımcı üreme tekniklerinden yararlanacak olan subfertil birey, klinik tablosuna ve semen analiz sonuçlarına göre uygun yöntem e yönlendirilir (Aktaş 2007; Satar ve Gençdal 2013; Bay 2015; Şaylan 2015; Erımşah 2017).

2.2.2. Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT)

İnfertilite nedenli başvuran çiftlerde gebelik oluşmasını sağlama amacına yönelik insan oosit, sperm veya embriyosu üzerine geliştirilen birçok tedavi ve prosedürler yardımcı üreme teknikleri olarak bilinmektedir. Yardımcı üreme tekniklerinde infertilite sorunu; hasta yaşı, infertilite etiyolojisi, infertilite süresi, önceki reproduktif performans gibi faktörlerin dikkate alınmasıyla en avantajlı teknik seçilerek çiftlere çözüm oluşturmaya çalışılmaktadır. Bu yardımcı üreme tekniklerinden en yaygın kullanılanları in vitro fertilizasyon (IVF), intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ve intra uterin inseminasyon (IUI) uygulamalarıdır. İnfertilite sorununa çözüm sağlamak için günümüzde yapılan araştırmalarda alternatif teknikler üzerine çalışmalar devam etmektedir (Hassa 2003; Aktaş 2007; Oğuz 2013; Ercan 2015; Şaylan 2015; Erımşah 2017).

2.2.2.1. İntra Uterin İnseminasyon (IUI)

İnfertil çiftlerin tedavisinde genellikle tercihe ve daha önceki alınan sonuçlara göre öncelikli olarak IUI tekniğine başvurulmakta tedavi sonucunda gebelik elde edilemeyen durumlarda ya da IUI tekniğinin çözümsüz kalacağı durumlarda IVF tekniğine başvurulmaktadır (Delibaşı 2008; Ercan 2015). İnfertilite tedavisinde sıklıkla kullanılan IUI tekniği, tedavinin uygulanacağı çiftlerde sperm sayı ve kalitesini fazlalaştırarak normal yolla elde edilecek döllenmenin oluşum olasılığını arttırmak amacıyla uygulanmaktadır. Teknik, çeşitli yöntemler ile istenilen konsantrelerde hazırlanmış olan motil hareketteki spermilerin takip edilen ovulasyon döneminde bir katater yardımıyla direkt olarak uterin kaviteye verilmesi aşamalarını içerir (Delibaşı 2008; Karamazak 2014; Yiğit 2015; Çakır 2017). Kullanılan diğer yardımcı üreme teknikleriyle karşılaştırıldığında daha ucuz ve daha az invaziv bir teknik olmasıyla birlikte; idiyopatik infertilite, düşük ve orta düzeydeki sperm bozukluklarında (düşük sperm sayısı, zayıf motilite, zayıf penetrasyon yeteneği vb. gibi), servikal uterus problemleri gibi durumlarda gebelik oluşturulma başarısı yüksektir (Yazıcı Yılmaz 2011; Karamazak 2014; Kızıllan 2015; Ökten 2015; Çakır 2017).

Kullanımına başlandığı zamanlarda işlenmemiş semen örneğinin vajina üst kısımlarına bırakılmasıyla gerçekleştirilen teknik daha sonralarda işlenerek hazırlanan spermilerin intraservikal inseminasyonla uygulanmasıyla daha yüksek başarı oranı elde etmiştir. Günümüzde ise IUI tekniğinden yola çıkılarak geliştirilen; spermilerin fallop tüpüne perfüzyonu (FSP), vajinal yolla fallop tüplerine inseminasyon (VITI), transperitoneal inseminasyon (TPI), subzonal sperm inseminasyonu (SUZI) gibi yöntemler uterus yerine spermilerin oositle karşılaşabileceği farklı yerlere verilmesini baz almaktadır. Kullanılabilen bu yöntemler; kullanılacak sperm konsantrasyonu ve inseminasyon medyum miktarı, inseminasyon zamanı ve spermilerin bırakıldığı anatomik yerleşimler gibi farklılıklar göstermektedir (Delibaşı 2008; Oğuz 2013; Kızıllan 2015; Çakır 2017).

2.2.2.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

İlk olarak tubal hasarı bulunan çiftlerde çözüm oluşturmak için geliştirilmiş olan IVF uygulaması günümüzde birçok endikasyon için kullanılmaktadır. Genel

olarak ele aldığımızda IVF, elde edilen gametlerin vücut dışındaki ortamda bir araya getirilmesiyle oluşan zigot ya da embriyonun dişi bireyin genital sistemine verilmesi uygulamasıdır. Döllenme sonucunda oluşan zigot ya da embriyoların, gelişim evreleri göz önünde bulundurularak genital sistem içerisinde verilecekleri farklı yerler belirlenir. Kadında çeşitli ajanlar ile ovulasyon indüksiyonu sağlanır ve oosit pick up (OPU) denilen yumurta toplama işlemiyle laboratuvar ortamında oositler overlerden toplanır. Daha sonra in vitro ortamda sperm tarafından oositin fertilizasyonunun sağlanmasıyla oluşan embriyolar transfer edilir (Aktaş 2007; Delilbaşı 2008; Osalou 2013; Ercan 2015).

IVF uygulamalarının yetersiz kaldığı durumlarda ve erkek infertilitesinin şiddetli bir şekilde baş gösterdiği durumlarda çiftlere alternatif çözüm yolları oluşturmak üzere çeşitli mikromanipülasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerden Parsiyel Zona Disseksiyonu (PZD); zona pellusida üzerinde sperm geçişi için açıklık oluşturularak oositin inseminasyonunun sağlanması işlemi olup günümüzde en sık kullanılan tekniklerden olan İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu; tek bir spermın özel mikro manipülatörler kullanılarak oosite ya da sperme zarar verilmeksizin oosit sitoplazması içerisine enjekte edilmesi uygulamasıdır. ICSI tekniğinde spermın direkt oosit içerisine bırakılmasıyla kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, sperm ve yumurtanın füzyonu gibi fertilizasyon aşamaları geçirilmez. ICSI tekniğinin geliştirilmesi erkek infertilitesinde önemli bir yere sahip olup oosit ve sperm üzerine çalışmaların daha yakından incelenebilmesine olanak tanımıştır (Aktaş 2007; Delilbaşı 2008; Ercan 2015; Ertekin 2015; Ürgüplüoğlu 2016; Uğurlu 2017; Uzun 2017).

2.2.3. Sperm Hazırlama ve Yıkama Yöntemleri

Yardımcı üreme tekniklerinde IUI, IVF, ICSI gibi uygulamalarda kullanılacak olan spermaların verilen ejakülatın hazırlanması ve yıkanması işlemleri başarı olasılığının artışı sağlamada oldukça önemlidir. Bu hazırlama ve yıkama işlemleri için farklı prosedürleri içeren yöntemler mevcuttur. Kullanılacak yöntemin seçilmesinde yapılan spermioqram analiz verileri, hastaya uygulanacak tedavi yöntemi gibi etkenler belirleyici olabilmektedir (Oğuz 2013; Buran 2015; Yiğit 2015; Uzun 2017).

Ejakülattaki seminal plazma ve plazma içerisinde yer alan prostaglandinler, sitokinler, antijen ve enfeksiyon ajanları, oksijen radikalleri, lökosit, hücre artıkları ve bunların yanında kalitesiz spermatozoonlar spermilerin hazırlanma aşamasıyla ayrıştırılır. Spermilerin hazırlanması; doğal fertilizasyondaki servikal mukus içerisinde seminal plazmadan spermilerin ayrılması işlemini sağlayarak; hızlı ve kaliteli bir şekilde sperm popülasyonu eldesi oluşturur. Bu sayede IUI tekniği kullanılacak ise, erkek bireye ait sperm harici içeriklerin kadının kavitesine verilmesi önlenir, gelişebilecek olan rahim kasılmalarının ve enfeksiyon oluşma riskinin önüne geçilmiş olunur. Servikal kanal ya da uterin kavite içerisinde spermilerin in-vivo olarak oositi dölleyebilmesini sağlayan kapasitasyon yeteneği ise in-vitro ortamda seminal plazmadan ayrılan spermilerin yıkanması aşamasıyla kazandırılır. Tüm bu işlemler sonucunda yıkanmış ve arındırılmış olan spermier hem sayı hem de hareket kabiliyeti bakımından nitelikli duruma getirilmiş olur (Ökten 2015; Şaylan 2015; Yüce 2015; Erimşah 2017).

Sperm hazırlama ve yıkamada kullanılan yöntemlere göre gerçekleştirilen işlemler esnasında %10 ila %50 arasında bir sperm kaybı söz konusu olmaktadır. İn-vivo ortam şartlarını ve oluşumlarını takip ederek bunları in-vitro ortamda gerçekleştirebilmek ve fertilizasyon olasılığını arttırabilmek için sperm hazırlığında birçok farklı kimyasal madde ve biyolojik sıvıların eklendiği çeşitli kültür solüsyonlarından yararlanılmaktadır. Bu kültür solüsyonları tamponlanmış izotonik tuz solüsyonları olup tampon bileşiğı solüsyondaki pH sürekliliğini kontrol eder. pH devamlılığı için CO₂'li inkübatör varlığında bikarbonat tamponu, yokluğunda ise 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit (HEPES) tamponu kullanılmaktadır. Tampona protein kaynağı olarak insan serum albümini (HSA, human serum albümin) ya da bovin serum albümini (BSA, bovine serum albümin) eklenerek inkübasyon süresinin uzatılması ve kapasitasyonun uyarılması sağlanır. Kapasitasyon oluşumu için Ca⁺² ve K⁺¹ iyonları gerekmektedir. Sperm hazırlığında kullanılan solüsyonlara örnek olarak human tubal fluid (HTF), Hams F10 sık kullanılanlar arasında gösterilebilir (Yiğit 2015; Yüce 2015). Spermilerin hazırlığında günümüzde birçok farklı yöntem kullanımı mevcut olmakla birlikte bunlardan bazıları; basit yıkama (simple washing), sperm yüzdürme (swim up/swim down) ve density gradient santrifügasyonu'dur (Delilbaşı 2008; WHO 2010; Oğuz 2013; Uğurlu 2017).

2.2.3.1. Basit Yıkama (Simple Washing)

Bu yöntem; verilen ejakülat kalitesinin iyi olduğu durumlarda yeterli olmakla birlikte semene yalnızca yıkama işlemi uygulayarak en yüksek oranda sperm elde edilmesini sağlamaktadır. Basit yıkama yöntemi genel olarak, semen örneğinin kültür medyumu ile dilüe hale getirilip santrifüj edilmesi ve dibe çöken pelletin farklı bir kültür medyumu ile muamelesi sonrasında bir süspansiyon oluşturulmasını baz almaktadır (Erimşah 2017; Uzun 2017).

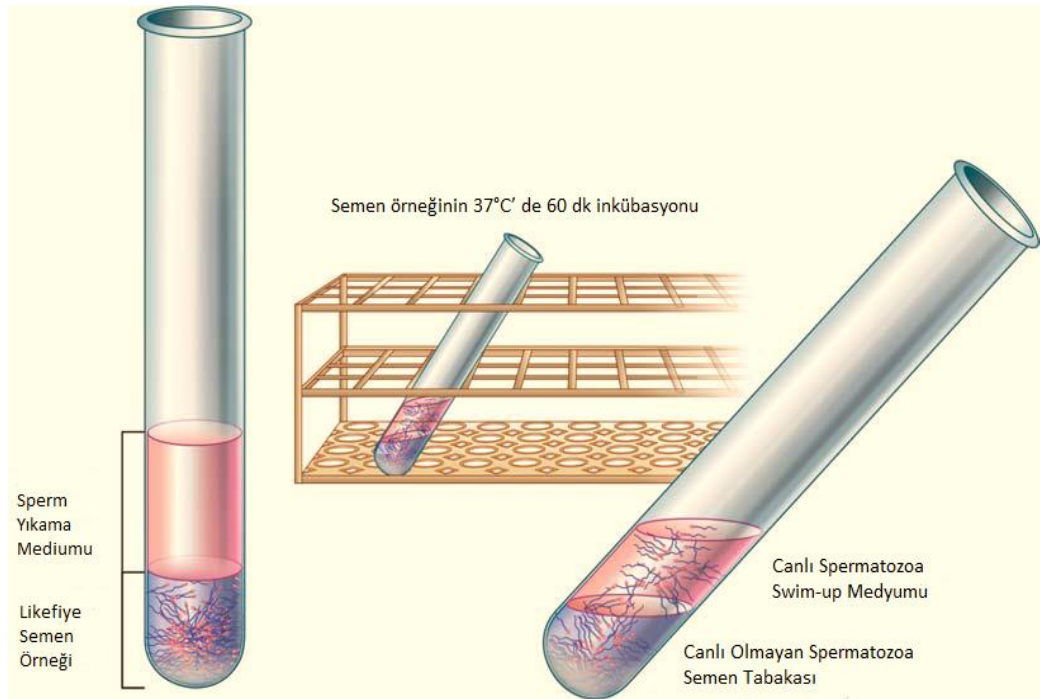
Yöntemde semen, tüpe alınır miktarına göre belirlenen oranda albümin içeren steril bir kültür medyumu ile yıkanarak 10 dk 300 g'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında elde edilen pellet medyumla homojenize edilerek santrifüj işlemi 300 g'de 5 dk olarak tekrarlanır. Sperm, süpernatantın uzaklaştırılıp pelletin HSA ya da hasta serumu içeren kültür solüsyonuyla işlemde geçirilmesi ile kullanıma hazırlanır (Boomsma ve ark. 2007; Natali 2011; Ökten 2015; Şaylan 2015; Yüce 2015).

Bu yöntemle hazırlanan sperm, yüksek oranda hücre izolasyonu sağlanırken son aşamada elde edilen örnekte hücresel artıkların (debris), ölü sperm hücrelerinin ve lökositlerin kalabilmesi ihtimali bulunmaktadır. Lökositlerin ya da defektli sperm, salgılamış oldukları bileşiklerin motil sperme ya da oosite zararlı olabileceği düşüncesiyle basit yıkama yöntemi; sperm motilitesinin yeterli ve lökosit konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda veya yardımcı üreme tekniklerinde geliştirilmiş farklı yöntemlerle kombine bir şekilde kullanımı mevcuttur. Ucuz ve çabuk bir yöntem olması avantajıyla basit yıkama günümüzde de kullanılmaktadır (Delilbaşı 2008; WHO 2010; Yüce 2015; <http://www.embriyologferhatcengiz.com/sperm-hazirlama-yontemleri/> (10 Nisan 2019)).

2.2.3.2. Sperm Yüzdürme (Swim Up/Swim Down)

IVF, IUI ve ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinde sperm hazırlanması için kullanılan swim up yönteminin uygulanabilmesi için yeterli miktarda ileri hareketli motil sperm varlığı gerekmektedir. Normal viskozitede ve yüksek motilitedeki semen örneği steril bir tüpe alınarak üzerine kültür medyumu eklenip homojenize edilir ve sonrasında karışımın üzerine 45°'lik eğimle sperm yıkama medyumu eklenir. Sperm yıkama medyumu yavaş bir hareketle alttaki tabakayı sarsmadan üst kısımda ayrı bir

faz oluşturulacak şekilde konulur ve hazırlanan örnek 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde 45°'lik açıyla 30-60 dk bekletilir (Şekil 2). Son aşamada üst faza yüzmesi beklenen sperm dikkatli bir şekilde steril yeni bir tüpe toplanarak kullanıma hazır hale getirilir. Swim up yöntemi, sperm motilitesine göre seçim yapılmasına olanak sağlasa da basit yıkama yöntemine göre daha az sperm elde edilir. Elde edilen sperm sayısındaki düşüklükten dolayı erkek infertilitesinin şiddetli olduğu durumlarda kullanımı kısıtlıdır. Verilen semen örneğinin viskozitesinin uygun olmadığı durumlarda da yöntemle iyi sonuç alınamıyor oluşu bir diğer kısıtlamadır (Oğuz 2013; Buran 2015; Şaylan 2015; Yüce 2015).



Şekil 2: Swim up tekniğinin 37°C’de eğik açıyla inkübasyona bırakılması (Beydola ve ark. 2013).

Bir diğer sperm yüzdürme tekniği de swim down yöntemidir. Yöntem, sperm hücrelerinin doğal taksisinden yararlanılarak geliştirilmiş olup semen örneğinin alt kısmına konulan kültür medyumuna sperm hücrelerinin hareket etmesi şeklinde gerçekleşir. Verilen semen örneği daha yoğun bir solüsyon üzerine 45°'lik açıyla eklenir ve 37°C’de %5 CO₂'li inkübatörde 30-60 dk arasında bir süreyle inkübe edilerek spermelerin alt tabakadaki medyuma yüzmesi beklenir. Bekleme süresinin sonunda alt fazdaki bir miktar örnek aspire edilerek yapılacak olan YÜT’de kullanılır. Basit ve santrifüjsüz bir yöntem olmasının yanında elde edilen progresif hareketteki sperm miktarı düşük düzeydedir (Aktaş 2007; Buran 2015).

Standart sperm yüzdürme yönteminde, basit yıkama ve sperm yüzdürme yöntemleri kombine halde kullanılmaktadır. Konik tüpe alınan semen örneği yıkama medyumu ile belirli oranda karıştırılarak santrifüj işlemine tabi tutulur. Süpernatant atılarak pellet üzerine yıkama medyumu 45° açıyla eklenir ve üste yüzen spermeler toplanır ve IUI, IVF ve ICSI uygulamalarında kullanılır (Oğuz 2013; Yiğit 2015; Özkoçer 2018; <http://www.embriyologferhatcengiz.com/sperm-hazirlama-yontemleri/> (10 Nisan 2019).

2.2.3.3. Dansity Gradient Santrifügasyon

Dansity gradient yöntemi ağır oligozoospermi, teratozoospermi ya da astenozoospermi vakalarında fazla sayıda motil sperm elde edilmesi yönüyle YÜT’de oldukça tercih edilen bir yöntemdir. Birbirinden farklı yoğunluklardaki solüsyonlarla ve semen örneği ile steril santrifüj tüpünde üç ayrı faz oluşturularak hazırlanan tüp santrifüj işlemine tabi tutulur. İzotonik solüsyonların kullanımıyla eldeki semen örneğinden, semenin içinde bulundurduğu immotil ya da defektli spermeler, beyaz küreler ve diğer tüm hücresel atıklardan motil ve morfolojik olarak sağlıklı spermelerin ayrıştırılmasını sağlayan bir yöntemdir. Dansity gradient santrifügasyon yönteminde gerçekleştirilen ayıklama ve yıkama işlemlerinde kullanılan solüsyonların non-toksik özellikte olması sperm hücreleri, oosit ve endometriuma zarar vermemesi yönünden bir avantaj sağlamaktadır. Yöntemde kullanılan solüsyonlar, gelen semen örneğinin spesifik özelliklerinin daha iyi bir şekilde seçilebilmesi için değişiklik gösterebilmektedir. Bunun yanı sıra spermelerin alacağı mesafenin kısaltımı için materyal hacmi azaltılabilir veya viskozitesi sıkıntılı örnekler için santrifüj süresi artırılabilir (Aktaş 2007; Yüce 2015; Ermiş 2017; Özkoçer 2018).

2.3. SPERM DNA HASARI

Fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi için sperm DNA’sında herhangi bir hasar bulunmaması ve DNA bütünlüğü oldukça önemlidir. Semen analiz edilmesi sonrası bulunan morfoloji, motilite ve spermatozoon konsantrasyon değerleri; fertilité potansiyelinin değerlendirilmesi açısından eksiklik içermektedir (Budak 2014; Durmuş 2018). Sperm nükleusunda ortaya çıkan DNA hasarları ile DNA bütünlüğünün seviyesinin infertilite ve fertilizasyon potansiyeli arasında bir ilişki

olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Esteves ve Schneider 2011; Aydın 2018; Durmuş 2018).

Sperm DNA hasarının ortaya çıkmasında önemli olarak görülen üç mekanizma bulunmaktadır. Bunlar; olgun spermdeki anormal kromatin paketlenmesi, spermatogenez esnasında hasarlı DNA bulunduran sperm hücrelerinin apoptoza uğramamış olması ve semen kalitesindeki düşüklükle beraber reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi olarak ele alınmaktadır. Sperm DNA hasarının yüksek oranda anormal kromatin paketlenmesi nedeniyle olduğu gerçekleştirilen birçok çalışmayla ortaya konmuştur. Hasarlı DNA'ya sahip spermatozoonlar spermatogenezde fonksiyonel olarak genetik havuzdan elimine edilirler. Ancak bu ayırmadan kurtulabilen hasarlı germ hücreleri istenmeyen özellikteki sperm hücrelerinin varlığını artırır. Spermilerin muhafazası için oluşturulan semenin kalite kötülüğü ve üretimi artmış ROS mevcudiyeti spermde protaminasyon ve çapraz disülfid bağlarının oluşumunu azaltmaktadır (Bianchi ve ark. 1996; Lopes ve ark. 1998; Shen ve Ong 2000; Sakkas ve ark. 2003; Aydın 2018; Durmuş 2018).

Bu mekanizmaların yanı sıra DNA hasarı görülmesine; bireyin ilerleyen yaşı, kanser hastalarına uygulanan ışın ve kemoterapi tedavileri, sperm hazırlama yöntemlerinde başvuru yüksek hızlı santrifüj işlemleri, lökosperrinin beraberinde görülen genital sistemdeki enfeksiyonlar, sperm üretilme sürecinde etkili olan çeşitli toksik ajan ya da ilaçlar ve oksidatif stress vb. gibi etmenler sebebiyet verebilmektedir (Potts ve ark. 1999; Mortimer ve Menkveld 2001; Aydın 2018; Durmuş 2018).

2.3.1. Sperm Kromatin Kondenzasyonu

Kromatin yapısı ve kompozisyonu incelendiğinde memelilerin sperm yapısı somatik hücrelerden farklılık göstermektedir. Erkek ve dişi üreme kanallarından geçme esnasında paternal genomun genetik bütünlüğünü muhafaza edecek biçimde sperm kromatininin yapılandığı gözlenir (Evenson ve ark. 2002; Durmuş 2018).

Sperm nükleusunda, spermatogenez esnasında nükleer histonların sperme özgü protaminler ile birleşmesi ve protaminler arasında yer alan çapraz disülfid bağları sayesinde sperm DNA'sının hem kararlı bir hale getirilmesi hem de sıkıca paketlenmesi sağlanır (Wong ve ark. 2008; Tekden Kırgız 2015). Sperm nükleus yapısı bu şekilde paketlenerek mitotik kromozomlardan altı kat yoğun bir hale gelir ve

nükleer yapının tümünü kaplar (Ward ve Coffey 1991; Fuentes ve ark. 2000; Durmuş 2018). Sperm hücresinde kromatin paketlenmesi; kromozomların sıkı bir şekilde bağlanması, sperm DNA'sının DNA halka bölgesini meydana getirmesi, histon-protein yer değişimi, DNA yoğunlaşması ile kromozom yerlerinin belirlenmesi olarak 4 farklı şekilde gerçekleşmektedir. Paketlenme işleminde yoğunlaşan kromatinden histon proteinlerinin yerlerinden ayrılmasını sağlayan özel geçiş proteinleri (Transition Nuclear Protein- TP: T1, T2) görev alır ve böylece ayrılan histonların yerine protaminler yerleşir (Ward ve Coffey 1991; Aydın 2018; Durmuş 2018). Sperm olgunlaşmasında kromatin yapılanmasının son aşaması epididimde görülür. Epididimde protaminler arasında disülfid bağları oluşarak çapraz bağlanma sağlanır ve spermin kromatin kondensasyonu meydana getirilir (Zini ve ark. 2001; Durmuş 2018).

2.3.2. Anilin Mavisi

Anilin mavisi boyası lizinden zengin histonlarla, arjinin/sistein zengini protaminlerin ayrımında kullanılan, sperm kromatin değerlendirilmesini sağlayan asidik bir boyadır. Spermde histon proteinlerinin çokluğu lizin proteinlerinin de fazla olduğunu göstermektedir. Anilin mavisi ile boyama, spermdeki temel protein farklarını ortaya çıkararak lizin için pozitif bir reaksiyon gereksinimini karşılayan bir teknik olarak kullanılır ve DNA protein yapısının belirlenmesinde yardımcı olur. Hasarlı DNA içeren spermler rezidüel histonları ortaya çıkararak anilin mavisi boyasına bağlanma yatkınlığına sebebiyet verir. İmmatür spermatozoonun lizinden zengin histon taşıyan nükleusu sonuç olarak mavi rengi alacaktır. Matür spermatozoonun arjinin-sistein zengini protaminli nükleusu çok düşük lizin içerdiğinden dolayı anilin mavisile boyanmayacaktır (Hammadh ve ark. 2001; Wong ve ark. 2008; Tekden Kırgız 2015; Durmuş 2018).

2.4. TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (TZP)

Tam kanın santrifüje tabi tutulmasıyla, kandaki konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonda trombosit hücrelerinden zengin olarak elde edilen plazma kısmına TZP denilmektedir (Yılmaz ve Kesikburun 2013). Fibrin-pıhtı oluşumundan sonra hazırlanan TZP, içerisinde bulundurduğu trombositlerin aktivasyonu sayesinde alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıda büyüme faktörünün ve diğer uyarıların ortama salınımıyla uygulama sahası içerisinde büyüme faktörlerinden zengin bir mikro

çevrenin oluşmasını sağlamaktadır. Bu büyüme faktörlerinden zengin mikro çevre sayesinde TZP'nin kullanımıyla; hücrelerin büyüme ve farklılaşmaya uyarılması, yara iyileşmesinin hızlanması vb. gibi olumlu sonuçlar gözlenmektedir (Erşen 2011; Öztürk 2015).

2.4.1. Trombosit Yapısı ve İçeriği

Trombositler, disk benzeri yapılar şeklinde çapları 2-4 µm olan, mitokondri ve mRNA bulundurdıkları halde çekirdek içermeyen, küçük membranla çevrili sitoplazmik hücre elemanları olup kemik iliğindeki dev poliploid hücreler (kromozomların çoklu setlerini içeren, nükleus bulunduran hücreler) olan megakaryositlerden gelişirler. Dinlenme süresince diskoid yapıda görülen trombositler, aktive hale geçtiklerinde psödopodları olan globüler bir şekil alırlar ve boyutları 5 µm'ye kadar artabilir. Üretiliş süreçleri 10-12 gün, periferik kan dolaşımına geçişlerinden sonraki ömürleri ise 8-10 gün sürmektedir. 1 mm³ kandaki sayıları 300000 µl olan trombositler, damar yaralanmalarında kanamanın durdurulmasında ve kanın pıhtılaşmasının sağlanmasında görevlidirler. Başlıca karaciğer tarafından üretilen trombopoietin hormonu trombosit yapımını uyarır ve çoğalmasını kontrol eder. Boyanmış kan yaymalarında kümeler halinde gözlenirler ve tek tek incelendiklerinde soluk mavi boyanan bir periferleri ve koyu mor renkli boyanan bir merkezi bölgeleri görülür. Bu şeffaf periferik kısımlara hyalomere, granüllerin yerleşmiş olduğu merkezi bölgelere ise granülomer ismi verilir (Erşen 2011; Sağlam 2012; Ross ve Pawlina 2014; Öztürk 2015).

Trombositler organizasyonel ve fonksiyonel olarak 4 zonda incelenirler.

- **Periferik Zon:** Kalın bir tabaka glikokaliksle kaplı hücre membranından meydana gelir. Glikokaliks, glikoproteinler, glikozaminoglikanlar ve plazmadan adsorbe edilen çeşitli koagülasyon faktörlerinden oluşur. İntegral membran proteinleri trombositlerin reseptörleri olarak işlev görürler (Ross ve Pawlina 2014).
- **Yapısal Zon:** Plazma membranında destekleyici bir ağ oluşturan mikrotübülleri, aktin filamentleri, miyozin ve aktin-bağlayıcı proteinleri içerir (Ross ve Pawlina 2014).

- **Organel Zonu:** Trombosit merkezini oluşturan zondur. Mitokondri, peroksizomlar, glikojen partikülleri ve sitoplazmaya dağılmış halde bulunan en az 3 tip granül içerirler. En fazla bulunan granüller, esas olarak fibrinojen, pıhtılaşma (koagülasyon) faktörleri, plazminojen, plazminojen aktivatör inhibitörü, platelet kökenli büyüme faktörünü (PDGF) içeren α granülleridir. Platelet agregasyonunda, kan koagülasyonunda, damar tamirinin başlangıç safhalarında önemli rol oynarlar. δ granülleri daha az sayıda ve daha küçüktür. adenosin difosfat (ADP), adenosin trifosfat (ATP), serotonin ve histamin içerirler. Platelet adezyonunu ve hasarlı damarın vazokonstriksiyonunu kolaylaştırırlar. γ granülleri çeşitli hidrolitik enzimler içeren hücrelerdeki lizozomlar gibidirler. λ granülleri damar tamirinin ileri evrelerinde pıhtı rezorpsiyonunda (geri emiliminde) işlev görürler (Ross ve Pawlina 2014).
- **Membran Zonu:** İki tip membran kanalı içerirler. Açık kanaliküler sistem (AKS) birinci tip membran kanalı olup platelet demarkasyon membranlarının gelişimsel kalıntılarıdır. Plazma membranının sitoplazma içine invajinasyonu ile oluşan megakaryosit membranlarının bölünmesine katkısı olmayan membran kanalıdır. İkinci membran kanalı ise yoğun tübüler sistem (YTS)' dir. YTS, megakaryositin granüllü endoplazmik retikulum (gER)' undan köken alan elektron-yoğun bir materyal içerir. Kalsiyum iyonları için depo alanıdır ve platelet yüzeyi ile bağlantılı değildir. Açık ve kapalı membran sistemleri sıklıkla birleşerek kompleks oluştururlar. Bunlar trombosit içi kalsiyum düzenlenmesinde önemlidir (Ross ve Pawlina 2014).

Yoğunluk ve içeriklerine göre üç değişik granül tariflenmiştir:

1. **Delta Granüller (Yoğun Cisimler):** Kalsiyum, pirofosfat, ADP, ATP gibi molekülleri içerip, serotonin deposu olarak görev yapan granüllerdir.
2. **Lambda Granüller (Lizozomlar):** İçinde asit hidrolazlar gibi lizozomal enzimler olan granüllerdir. Bakterisidal etkisi olan glikozidaz, proteaz gibi proteinleri de içerirler.
3. **Alfa Granüller:** Tek kat membranlı büyük organeller olup sayısal olarak trombositlerin majör granülleridir. Bu granüllerin koyu renkli boyanan alanlarında proteoglikanlar, açık renkli bölümlerinde von Willebrand faktörü (vWF), albümin gibi

proteinler ve tübüler yapılar vardır. Bu granüller; yapışma proteinlerini, pıhtılaşma faktörlerini ve inhibitörlerini, fibrinolitik faktörleri ve bu faktörlerin inhibitörlerini, proteazları ve anti-proteazları, çeşitli büyüme faktörlerini ve mitojenik faktörleri, kemokinleri, sitokinleri ve antimikrobiyal proteinleri içerdiklerinden salgılanan proteinler için esas depolanma yeridir (Nurden 2011; Akeda ve ark. 2019). Alfa granüllerin hemoostaz, inflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein ve büyüme faktörünü içermesi, trombositlerin yoğunlaştırılarak klinikte yara, kemik iyileşmesi gibi alanlarda kullanımının gündeme gelmesine neden olmuştur (Sağlam 2012; Ross ve Pawlina 2014).

Dens Granül (δ Granüller) 'Pro-agregan moleküller'	Alfa Granül 'Adezyon ve yenilenme molekülleri'	Lizozomlar (λ Granüller) 'Temizleyen moleküller'
Nükleotidler: - Adenin:ATP, ADP - Guanin:GTP, GDP Aminler: - Serotonin (5-HT) - Histamin Bivalan katyonlar: - Kalsiyum - Magnezyum - Pirofosfat	Proteoglikanlar: - Trombosit özgül: β TG, PF4 - Serqlisin - PBP (Trombosit Temel Protein) - NAP-2 Adezif glikoproteinler: - Fibronektin,Vitronektin, Thrombospondin, vWF, Hemostaz ile ilgili faktör ve kofaktörler: - Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII - Kininojenler,Plazminojen,ProteinS, Hücrel mitojenler: - PDGF, TGFβ, ECGF, EGF, VEGF, IGF, İnterlökin-β Proteaz inhibitörleri: α2-makroglobülin,α2-antitripsin vb... Ayrıca - İmmünglobülinler: IgG, IgA, IgM - Albümin	Asit proteazlar: - Katepsin D, E - Karboksepeptidaza, B - Kolajenaz - Asit fosfataz - Ariksülfataz Glikohidrolazlar - Heparinaz - N-asetil-glukozaminidaz β-glukuronidaz β-galaktozidaz β-glycerophosphatase - Glukozidaz - Fukoizidaz - Arabinoizidaz, mannoizidaz

Şekil 3: Trombositlerde yer alan granüllerin içerikleri (Rendu ve ark. 2001).

Yüzeylerinde bulunan reseptörleri; trombin, Tromboksan A2, ADP, kollajen, konvulksin, Ca⁺² vb. etkinleştirici moleküllerin uyarılmasıyla aktive olan trombositler, sitoplazmalarındaki aktif molekülleri barındıran α ve δ granüllerini ve platelet tromboplastik faktör (PF₃) gibi pıhtılaşma faktörlerini açık kanallıküler sistem yoluyla dışarı bırakırlar. Böylelikle α granülleri içerisinde yer alan birçok büyüme faktörü ve sitokinler bulundukları ortama salınır. Ayrıca salınan ADP ve Tromboksan A2 gibi moleküller de diğer trombositlerin aktive edilmesini uyararak trombositlerin birbirine yapışmasını sağlar ve trombotik tıkaç oluşumuyla pıhtılaşmada görev alırlar (Erşen

2011; Sağlam 2012). Yaralanmalara karşı cevap olarak aktivasyonları sağlandığında homeostazis, doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi, anjiogenez gibi süreçlerde rol oynarlar.

Trombositlerde bulunan α granülleri içinde doku iyileşmesi ve hemostazisde önemli rolü olan birçok molekül içerir. Yapılan son çalışmalardaki analizler trombositlerin aktive edilmesi sonucunda yaklaşık 3000'den fazla biyoaktif proteinin salındığını göstermiştir (Nurden 2011; Akeda ve ark. 2019). Bu moleküllere örnek olarak: Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), trombosit kaynaklı büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı epitelyal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), trombosit kaynaklı anjiyogenez faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), platelet faktör 4, interlökin 1 ve diğer pek çok faktör gösterilebilir. Tüm bu moleküller belli bir düzen içinde birlikte çalışarak inflamasyon, hücre farklılaşmasını-proliferasyonunu ve rejenerasyonunu uyarmaktadır. Bunların dışında ise oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı ve çeşitli antioksidan enzimlerin ekspresyonunu yukarı regüle ettiği bildirilmiştir (Anitua ve ark. 2004; Aydemir ve Karadağ 2009; Cansever 2017; Şekerci ve ark. 2017; Matz ve ark. 2018).

2.4.2. TZP Tanımı ve Sınıflandırılması

Normal bir kan örneğinde hücresel elemanların dağılımı: %93 kırmızı kan hücresi, %6 trombosit, %1 beyaz kan hücresi şeklindedir. Trombositten zengin plazma, otolog kandan elde edilen, yüksek trombosit ve büyüme faktörü konsantrasyonuna sahip plazma fraksiyonu olarak tanımlanır. TZP tedavisinin temel prensibi insan vücudunun doğuştan gelen tamir yeteneğini arttırmak, yaralanma sonrası iyileşmeyi hızlandırmaktır. TZP içinde trombosit oranı normale göre artmış olup hücresel dağılım %94 oranında platelet, %6 oranında ise beyaz küre ve kırmızı küre şeklindedir. Bu yüksek trombosit konsantrasyonu hedef bölgeye uygulandığında hiperfizyolojik bir büyüme faktörü konsantrasyonu oluşturarak hasar bölgesinde iyileşme potansiyelini artırır (Hancı ve ark. 2015; Epifanova ve ark. 2017). Deneysel toksik yaralanma durumunda TZP'nin kullanımı sonrasında; hücre büyümesinin ve farklılaşmasının uyarılması, anjiyogenez ve kollajen sentezinin artması, antiapoptotik etki, hücre göçünü hızlandırması vb. etkiler sayesinde yapısal işlevsellik bakımından yenilenme görülmüştür (Kon ve ark. 2011; Alsosou ve ark. 2013; Xie ve ark. 2014).

Trombosit açısından zengin plazma kullanımının, toksik hasardan sonra gonadların durumunu geri getirmenin etkili bir yöntemi olduğu varsayılmıştır (Valeriya ve ark. 2014).

Ehrenfest ve arkadaşlarının yapmış oldukları TZP sınıflandırması TZP hazırlığındaki fibrin içeriğine ve lökosit sayısına göre oluşturulmuş olup dört çeşittir. Bu sınıflandırmalar;

- **P-TZP**; düşük sayıda lökosit ve fibrin yoğunluğu içeren trombositten zengin plazma,
- **L-TZP**; yüksek sayıda lökosit ve düşük fibrin yoğunluğu içeren trombositten zengin plazma,
- **P-TZF**; az sayıda lökosit içeriğiyle birlikte yüksek yoğunlukta fibrin içeren trombositten zengin fibrin,
- **L-TZF**; yüksek miktarda lökosit ve fibrin yoğunluğu bulunduran trombositten zengin fibrin, olarak yapılmıştır (Dohan Ehrenfest 2009).

TZP; kalsiyum klorür (CaCl_2), trombin ilavesi, donma-çözülme ya da kollajene maruz bırakılma gibi işlemlere tabi tutulması sonucu aktive edilerek trombositlerin degranüle olması ve α granüllerinden büyüme faktörlerinin salınması sağlanır (Cavallo ve ark. 2016; Wasterlain ve ark. 2016; Akeda ve ark. 2019). TZP'nin aktivasyonunda kullanılan işlemin farklılığı büyüme faktörlerinin salınımında değişikliklere sebebiyet verebilmektedir. Kullanılan işlemlerdeki bu farklılıklar klinik uygulamalarda araştırma sonuçlarının net ve doğru bir şekilde değerlendirilmesinde sıkıntı oluşturmaktadır (Cavallo ve ark. 2016; Akeda ve ark. 2019).

2.4.3. TZP Avantajları ve Dezavantajları

TZP, içerisindeki büyüme faktörlerinin yanı sıra fiziksel ve kimyasal özellikleri ile de rejenerasyonda etkili olmaktadır. İçeriğinde bulundurduğu yüksek fibrinojen ile TZP hazırlanmasından sonra trombositlerin aktive olmasıyla fibrin ağı oluşturulur ve bu 3 boyutlu fibrin ağ pıhtının istikrarını sağlayarak birlikte uygulandığı materyallerin uygulanmasını kolaylaştırır. Fibrin ağ, bölgeye gelen yenilenme kapasitesi olan hücrelerin tutunabilmesi için de bir iskele (scaffold) rolü üstlenmektedir (Sonnleitner ve ark. 2000; Lekovic ve ark. 2002; Utku 2014).

TZP ile tedavide; TZP haricinde başka bir ilaç, ürün vb. gibi ek bir madde kullanılmadan, ekonomik bir şekilde sadece bireyin kendi kanından hazırlanan TZP uygulanarak herhangi bir doku uyumsuzluğu, alerji ve enfeksiyon bulaşma riski ortadan kaldırılmış olmaktadır. TZP uygulanması öncesinde ağrı miktarını azaltabilmek için uygun miktarda anestezi solüsyonlar kullanılabilir. TZP uygulandığı bölgede tedavi sonrasında morarma, kanama, kızarıklık, yanma, ağrı ve şişmeye sebebiyet verebilmektedir. Bu etkiler birkaç gün içerisinde kendiliğinden geçebilir. Bu gibi durumlarda TZP'nin uygulandığı kişilerde buz uygulaması yapılabilir (Akeda ve ark. 2019; <http://doctormuratbas.blogspot.com/2014/05/prp-hakkinda-hersey.html/> 10.06.2019). Otolog üretilebiliyor olmaları nedeni ile yeterli hayvan deneyi yapılmadan klinik kullanıma giren TZP, teorik olarak çok şey vaat etmesine rağmen; yeterli kontrollü çalışma olmaması nedeni ile sonuçlarının hala tartışıldığı bir alandır (Öztürk 2015).

2.4.4. TZP Hazırlanması

TZP hazırlama teknikleri genel olarak ortak özelliklere sahiptir. Öncelikle kan antikoagülanlı tüplere alınır ve santrifüj uygulanır. Yapılan tekniğe göre zaman değişimi olsa da yaklaşık bir saat içerisinde TZP'nin hazırlığı tamamlanır. Tek santrifüj yönteminde santrifüj dönme hızına ve santrifüj süresine bağlı olarak kanın plazma ve şekilli elemanlar olarak katmanlarına ayrılması sağlanır. En altta kırmızı kan hücreleri tabakası, üstünde trombositlerin yoğun olarak yer aldığı buffy coat tabakası ve en üst katmanda ise asellüler ya da trombositten fakir plazma (PPP) yer alır. Sonrasında elde edilen TZP, direkt yaralı bölgeye ya da dışarıda trombosit aktivatörleri ile aktivasyonu sağlandıktan sonra ortaya çıkarılan büyüme faktörleri aracılığıyla ilgili dokuya uygulanır (Dohan Ehrenfest ve ark. 2009; Engebretsen ve ark. 2010; Utku 2014).

TZP hazırlığında kişiden uygulama yapılacak bölgeye gerekli miktar kadar kan antikoagülan içeren steril enjektöre steril ortam şartlarında alınarak santrifüj cihazında uygun dönme hızında döndürülür ve trombositlerin tüpün dibine çöktürülen kanın diğer şekilli elemanlarından ayrılması sağlanır. Tüpün üst kısmında plazma içerisinde trombositlerden 2-8 kat daha zengin bir tabaka elde edilir (Dhurat ve Suresh 2014; <http://doctormuratbas.blogspot.com/2014/05/prp-hakkinda-hersey.html/> 10.06.2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmaya Dahil Etme Kriterleri

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesine Ocak 2019- Nisan 2019 tarihleri arasında başvuran hastalardan azoospermi tanısı konulmamış toplam 20 hastaya ait semen örneği çalışmaya dahil edilmiştir. TZP eldesinde kullanılacak kan örnekleri gönüllülük esasınca başvuran 20 hastadan alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılım bireylerin çalışma hakkında bilgilendirilerek gönüllü onam formlarının doldurulması ile gerçekleştirilmiştir (Ek-1, Ek-2). Çalışmamız Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 2018/1562 sayılı karar ile onay almıştır (Ek-3).

3.2. TZP'nin Hazırlanması

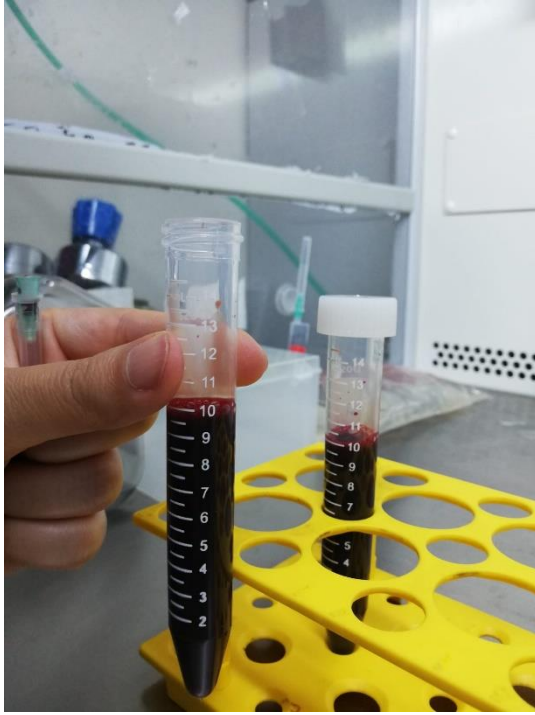
Onam formları doldurularak onay alınan gönüllülerden asit sitrat dekstroz- A (ACD-A) içeren steril enjektör ile 10 cc kan alındı. Alınan kan miktarınca çekilen ACD-A miktarı 1:5 oranındadır. Alınan kan örneği santrifüj tüplerine eşit miktarda dağıtılarak 1100 dakikadaki dönme sayısında (rpm) 22 dk süreyle soğutmalı santrifüje konuldu. Santrifüj sonrasında tüpte üst kısımda trombositten zengin plazma, alt kısımda diğer kan hücrelerinin bulunduğu iki faz oluştu. Üst kısımdaki plazma ince uçlu spiralli enjektör ile pellet üzerinde bir miktar süpernatant bırakılarak çekildi ve temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Çıkan plazma miktarına göre eklenecek olan %10'luk CaCl_2 miktarı 550µl örneğe 27.5µl CaCl_2 olacak şekilde hesaplandıktan sonra hesaplanan miktar steril mikro pipet yardımıyla çekilerek plazma üzerine eklendi. Oluşturulan karışım yavaş hareketlerle köpürtü oluşturulmadan çalkalanıp trombositlerin aktive olması amacıyla 37°C'de veya oda ısısında fibrin pıhtı görülünceye kadar inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla 2700 rpm'de 15 dk santrifüje konuldu. Oluşan süpernatant kısmı eşit hacimde (1.5 ml'lik) steril ependorflara alındı. Kullanım aşamasına kadar hazırlanan numuneler -20° C'ye kaldırılarak muhafazası sağlandı.



Resim 1: Asit sitrat dekstrozu içeren steril enjektöre alınan tam kan örneği

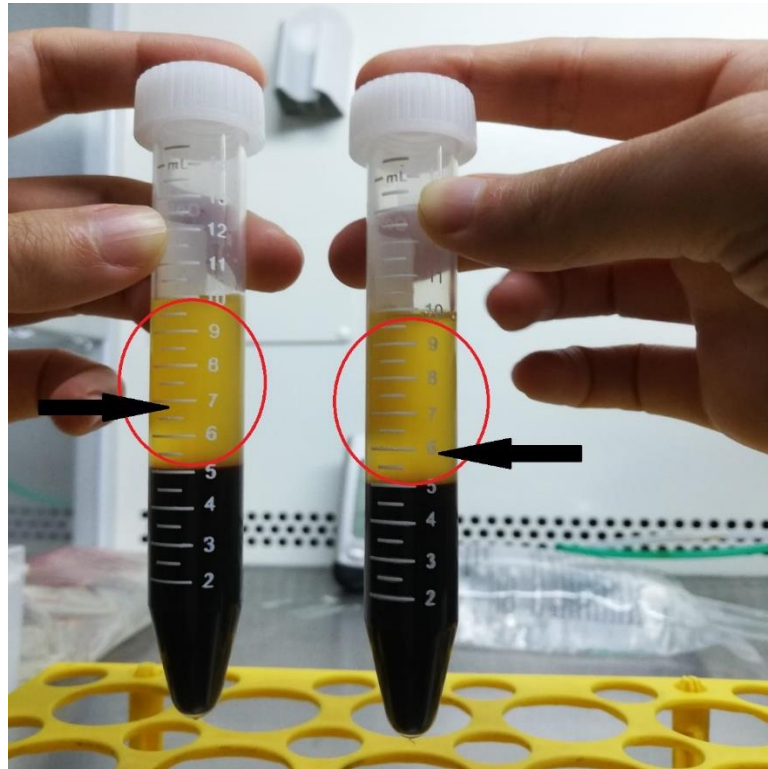


Resim 2: Santrifüj işlemi için kanın steril konik tüpe aktarılması

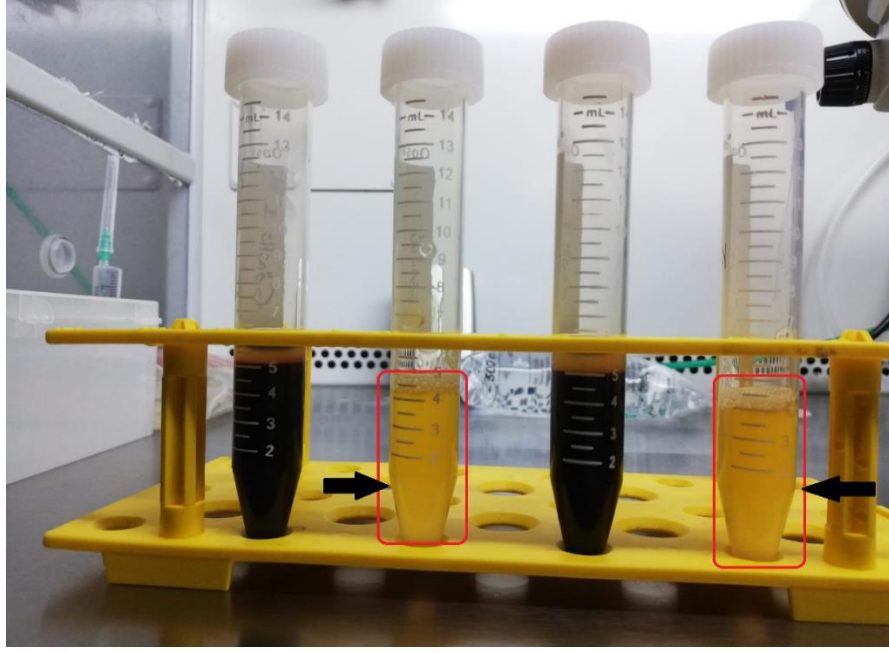


Resim 3: Tam kanın santrifüj işleminden geçirilmesi

Asit sitrat dekstroz- A içeren steril enjektör ile alınan 10 cc kan steril tüplere aktarılarak kan örneğinin fazlara ayrılması için soğutmalı santrifüje yerleştirilir (Resim 1, Resim 2 ve Resim 3).



Resim 4: Santrifüj uygulamasından sonra fazlara ayrılan kan (siyah oklar: trombositleri içeren plazma fazları)

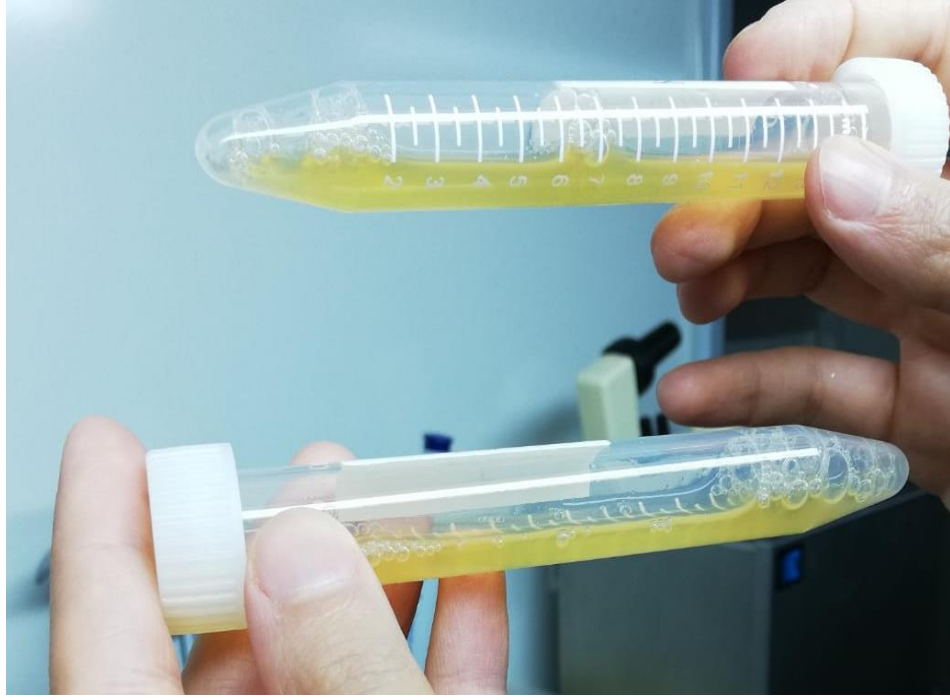


Resim 5: Kanın trombosit içeren zengin plazma kısmının steril tüpe alınması (siyah oklar: TZP)

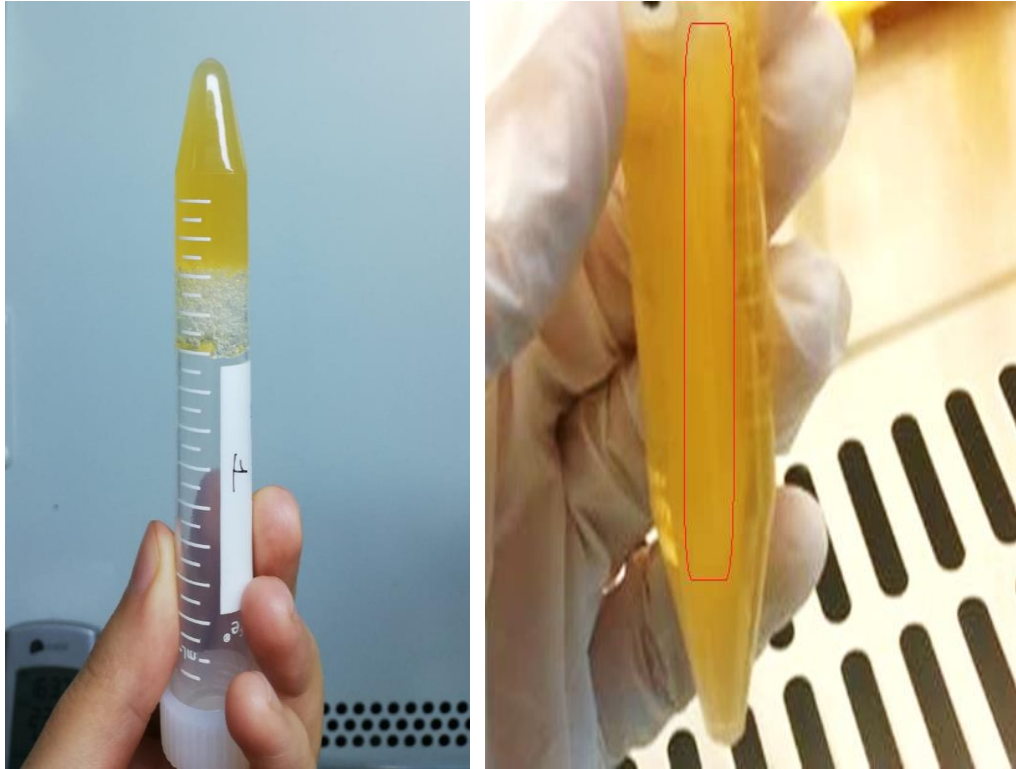
Alınan kanın santrifüj edilmesinin ardından tüplerde oluşan fazlardan trombositlerin yer aldığı süpernatant kısmı alt fazdaki diğer kan hücrelerinden ayrılarak steril bir tüpe aktarılmıştır (Resim 4, Resim 5).



Resim 6: Hesaplanan %10'luk CaCl_2 miktarının elde edilen trombositten zengin plazma üzerine eklenmesi



Resim 7: Hafif çalkalama işlemiyle CaCl_2 'nin TZP içerisinde homojen bir şekilde dağıtılması



Resim 8: İnkübasyondan sonra jelleşen A-TZP ve jelin içerisinde oluşan fibrin-pıhtı (Fibrin-pıhtı oluşumu: kırmızı kutucuk içerisinde gösterilen kısım)



Resim 9: CaCl_2 ile muamele ve santrifüj işleminin sonrasında parçalanmış trombosit yapılarından oluşan pellet



Resim 10: Elde edilen A-TZP'nin dondurulmak üzere ependorflara dağıtılması

İkinci santrifüjün tamamlanmasından sonra oluşan süpernatant içerisinde trombositlerin aktivasyonu sonucu açığa çıkan büyüme faktörleri, alt pellet kısmında ise aktivasyonla parçalanmış trombositlerin kalan membranlarının parçacıkları yer almaktadır (Resim 9). Büyüme faktörlerini bulunduran süpernatant kısmı çekilerek eşit hacimlerdeki steril ependorflara dağıtıldıktan sonra kullanıma kadar -20°C’de saklanmıştır (Resim 10).

3.3. Semen Örneklerinin Hazırlanması

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesinde onam formları alınarak işleme tabi tutulan tüm semen örnekleri 3 günlük cinsel perhizden sonra mastürbasyon yoluyla toksik etki bulundurmeyen steril kaplara toplandı. Toplanma işlemi her hastanın protokol numarası ve semen verme saati verilen kap üzerine not alınarak gerçekleştirildi. Toplanan semen örneklerinin oda sıcaklığında 30 dk ila 60 dk arasında bir süreyle bekletilerek likefiye olmaları sağlandı.

Likefiye olma işleminin tamamlanmasından sonra DSÖ 2010 yılı laboratuvar el kitabı baz alınarak semen örneklerinin spermiogram analizleri gerçekleştirildi. Spermiyogram işlemi yapılırken öncelikle semenin makroskopik analizindeki renk, volüm ve viskozite parametreleri değerlendirildi. Sonrasında Makler kamarasına 10 µl semenden alınan örnek konularak ışık mikroskopunda semenin mikroskopik analizi yapıldı (Resim 11). Sperm konsantrasyonu kamarada görülen iki satır bir sütun ya da iki sütun bir satır üzerindeki sperm hücrelerinin sayılması ve ortalamalarının alınmasıyla gerçekleştirildi. Motilite değerlendirmesinde toplamda 100 sperm hücresi sayıldı ve sayılan sperm hareket özelliklerine göre +4, +3, +2 ve +1 olarak değerlendirildi (Resim 12). Yapılan analizler sonucunda azospermik olmayan semen örnekleri çalışmada kullanıldı.



Resim 11: Semen analizinde kullanılan Makler kamarası



Resim 12: Sperm görüntülenmesi için kullanılan mikroskop

3.4. Simple Washing Metodu ile Spermilerin Hazırlanması

Spermigram işlemi tamamlanan uygun sonuçlar taşıyan örnekler, verildiği semen kabı içerisinde steril ortamda mikro pipet kullanılarak homojenize edildi. Gelen

semen örneğinden 900 µl miktarında biri kontrol biri deney grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu.

Kontrol grubu için ayrılan semen örneği santrifüj tüpüne alınarak 1/1 oranında PBS ile muamele edilip homojenize edildi. Homojenize edilen örnek 1500 rpm’de 10 dk süre santrifüj edildi ve santrifüj bitiminde pellet alınarak üzerine 900 µl kadar PBS eklendi. 1500 rpm’de 10 dk ikinci bir santrifüje tabi tutularak pellet eldesi sağlandı. Süpernatanttan uzaklaştırılan pellet üzerine 900 µl PBS eklenerek süspanse hale getirildi. En son halde elde edilen kontrol grubundan 10 µl alındı ve Makler kamerasında sayımı yapıldı.

Deney grubu için ayrılan örnek santrifüj tüpüne alınarak ve üzerine 1/1 oranda yıkama solüsyonu olarak PBS eklendi ve homojenizasyonu sağlandı. Süspanse edilen örnek 1500 rpm’de 10 dk santrifüje tabi tutuldu. Santrifüjden sonra elde edilen örneğin süpernatant kısmı atıldı. Tüpün dibinde kalan pellet, 900 µl kadar A-TZP ile muamele edildi ve 37°C’de 45 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi tamamlanan örnek tekrar homojenize edilerek 1500 rpm’de 10 dk santrifüje konuldu. Oluşan süpernatant kısmı atıldıktan sonra pellet 900µl A-TZP ile süspanse edildi. Homojenize edilen örnekten 10 µl alınarak Makler kamerasında sayımı yapıldı ve verileri kaydedildi.

3.5. Spermilerin +23±2°C ve +4°C’de Bir Gece Saklanması

Deney ve kontrol gruplarının örneklerin ikinci santrifüj sonrası elde edilen son durumu Makler kamerasında sayımlarının yapılmasından sonra her iki grupta ayrı şekilde oda ısısı +23±2°C ve +4°C olmak üzere iki gruba ayrıldı. Steril ependorf tüplere ayrılan örnekler oda ısısına +23±2°C ve +4°C’ye bir gece boyunca bırakıldı. Bir gece sonunda her grubun +23±2°C ve +4°C’ye bırakılan örneklerinden 10 µl alınarak Makler kamerasında konsantrasyon ve motilite ölçümleri yapıldı. Değerlendirilmesi tamamlanan grupların boyama aşamasına geçildi.

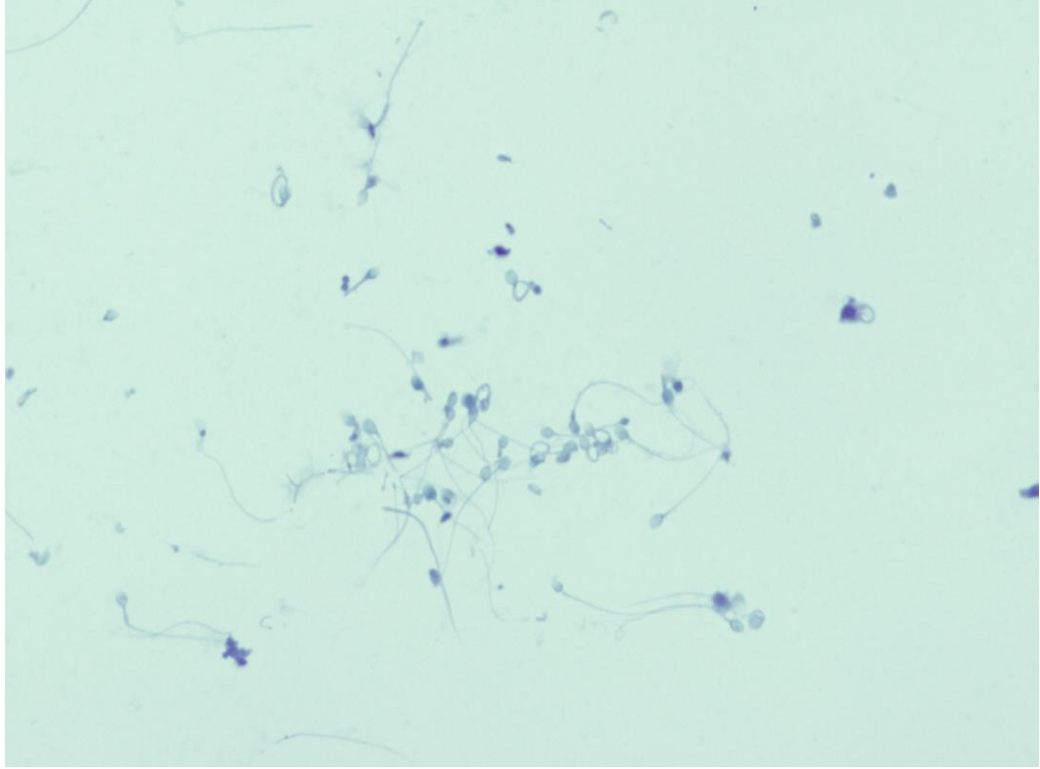
3.6. Anilin Mavisi Boyama ile Sperm Kromatin Yapısının Değerlendirilmesi

Boyama aşamasına geçilen grupların +23±2°C ve +4°C’de bekletilen örneklerinin her birinden 10 µl örnek alınarak bir lam üzerine damlatıldı. Temiz bir lamel yardımıyla damlatılan örnek lam üzerine yayıldı. Açık havada 10-15 dk kurumaya bırakıldı. Kurumanın gerçekleşmesinden sonra 30 dk süreyle

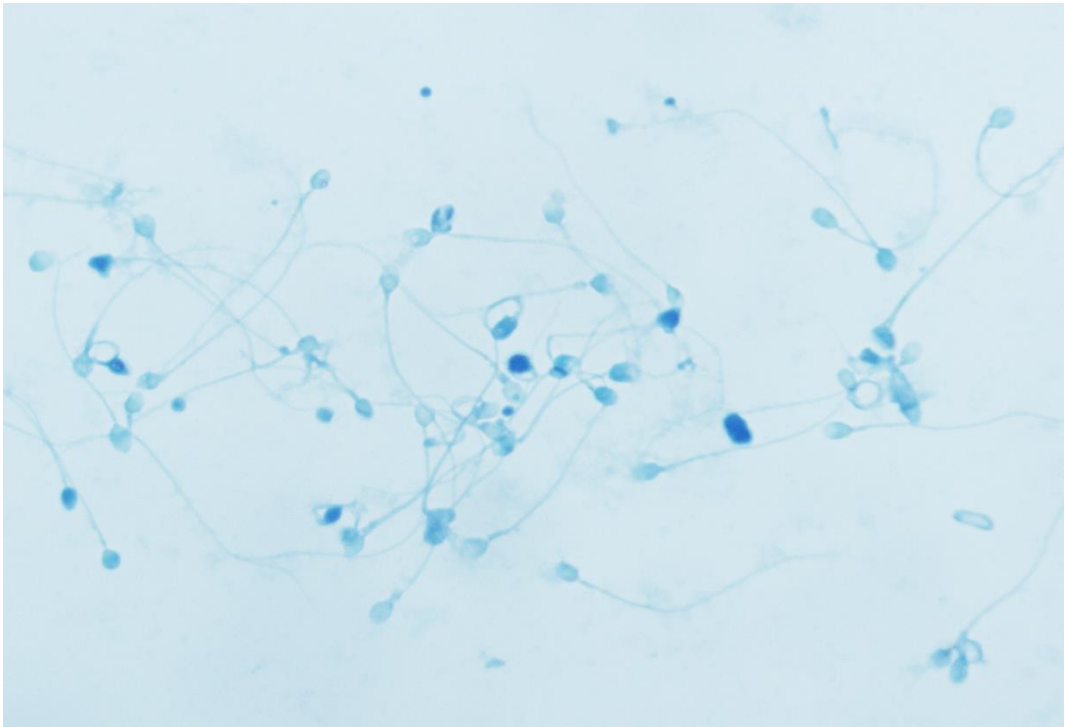
hazırlanan %4'lük formaldehit içerisinde fikse edildi. Fiksatiften çıkarılan örnek distile su içinde 1 dk süreyle iki defa durularak açık havada 10 dk kurumaya bırakıldı ve ardından 10 dk boyunca daha önceden %4'lük asetik asit ile karıştırılarak hazırlanan %5'lik asidik anilin mavisi (pH= 3.5) içerisine konuldu. Boyama işleminin gerçekleştirilmesi ile lam boyadan çıkartılarak üç defa 1 dk süreyle distile su içerisinde durulandı. Açık havada kurutulan örnek immersiyon yağı damlatılarak Olympus BX43 mikroskopunda 100x büyütmede görüntülendi. Görüntülenen spermier boya alma durumlarına göre boya alan koyu mavi görüntülenen spermier anilin mavisi pozitif; boya almayan açık mavi renkte görüntülenen spermier anilin mavisi negatif olarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar kaydedildi. Her preperatta boya alan ve almayan 100 sperm sayılarak anilin mavisi pozitif olan spermierin kromatin kondensasyonunun %'lik değeri hesaplandı.



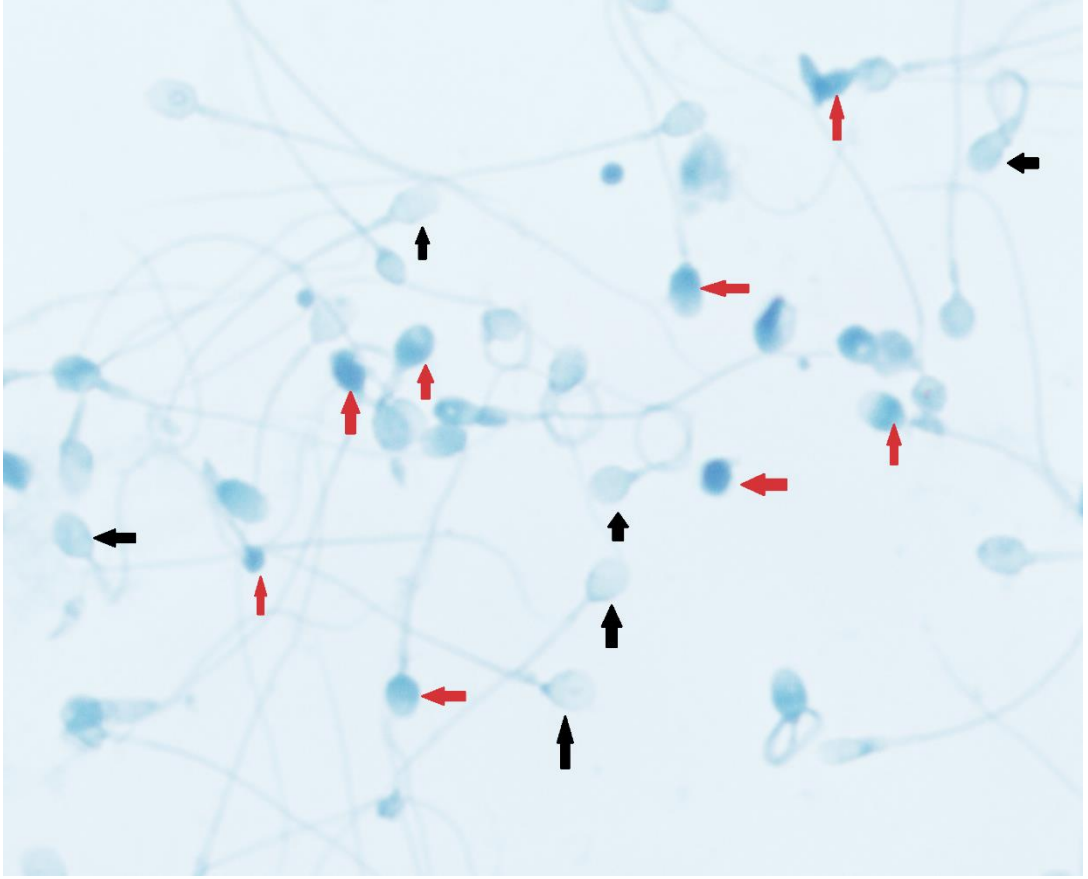
Resim 13: Anilin mavisi boyama testinde spermierin görüntülenmesinde kullanılan Olympus BX43 mikroskopu



Resim 14: Anilin mavisi boyama testinden sonra spermler 20x



Resim 15: Anilin mavisi boyama testinden sonra spermler 40x



Resim 16: Anilin mavisi boyama testinden sonra boya alan ve almayan spermler 100x (kırmızı ok: boya alan anilin blue (+) spermier, siyah ok: boya almayan anilin blue (-) spermier



Resim 17: Anilin mavisiyle boyanan ve boyanmayan spermeler 100x (Kırmızı yuvarlak içerisinde alınan boya almış bir sperm ve siyah ok içerisinde alınan boya almamış sperm)

3.7. İstatistiksel Analizin Yapılması

Çalışma sonucunda her grubun konsantrasyon, motilite ve anilin mavisi boyama parametre değerleri kaydedildi. Tüm verilerin karşılaştırılmasında ve analizlerinin yapılmasında istatistik analizi yazılımı SAS (Statistical analysis software) University Edition 9.4 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Kandan A-TZP eldesi için çalışmaya dahil edilen tüm hastalar bilgilendirilerek onam formları alındı ve steril bir şekilde kan alma işlemleri gerçekleştirildi. Sperm için ise Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesine spermiyogram testi yaptırmak üzere başvuran hastalardan onam formlarıyla bilgilendirilerek olurları alınanlar çalışmaya dahil edildi. Spermiyogram testleri tamamlanan, azoospermi olmayan 20 hastanın semen örneği çalışmamızda kullanıldı. Semen analizinden elde edilen veriler ham değer olarak kaydedildi.

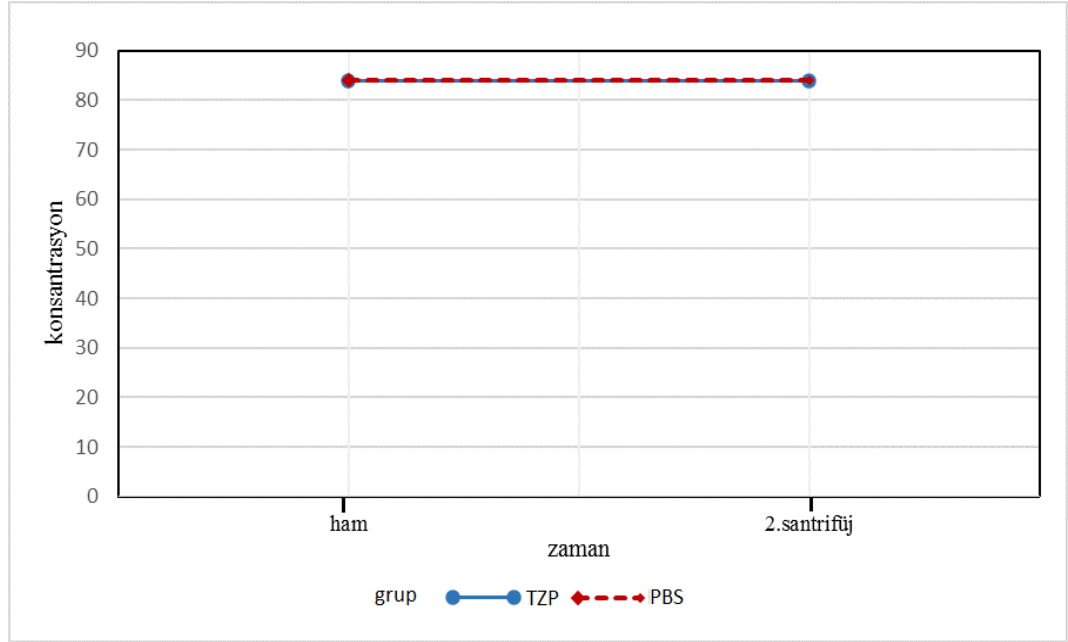
Semen örnekleri eşit hacimde iki tüpe ayrılarak tüplerden biri sadece PBS ile muamele edilen kontrol grubu olarak diğeri ilk olarak PBS ile yıkaması yapıldıktan sonra A-TZP ile muamele edilen deney grubu olarak adlandırıldı. İlk olarak kontrol ve deney grubu PBS ile homojenize edildi ve 1500 rpm'de 10 dk süre santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj bitiminde elde edilen süpernatant kısımları atıldı ve kontrol grubunun pelleti üzerine PBS; deney grubunun pelleti üzerine A-TZP eklenerek pelletler homojenize edildi.

Kontrol grubu 1500 rpm'de 10 dk ikinci bir santrifüje tabi tutuldu. Elde edilen pellet üzerine PBS konularak süspanse edildi ve 10 µl örnek Makler kamarasına konularak kontrol grubunun konsantrasyon ve +4, +3, +2, +1 olarak motilite değerlendirmesi yapıldı.

Deney grubu A-TZP ile homojenizasyondan sonra inkübatörde 45 dk süresince bekletildi. 45 dk sonunda 1500 rpm'de 10 dk santrifüje konuldu. Elde edilen pellet üzerine A-TZP eklendi ve örnekten 10 µl alınarak Makler kamarasında konsantrasyon ve motilite analizi yapıldı. Kontrol grubu ve deney grubu için elde edilen verilerin istatistiksel analizi yapıldı.

Deney grubu ve kontrol grubunun zamana bağlı konsantrasyon değişimi Grafik 1 ve Tablo 4'te gösterildi. Deney grubu ve kontrol grubu arasında ham değerler ve 2. santrifüjden sonra elde edilen değerler arasında yapılan istatistiksel analiz sonucu $p < 0.05$ değerini taşımadığı için anlamsız bulunmuştur. Tablo 5'te gösterildiği gibi zaman değerinin istatistiksel bir anlam ($p < .0001$) taşımasına rağmen grupların zamana bağlı karşılaştırmasında anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Grafik 1: Deney grubu ve kontrol grubunun zamana bağlı konsantrasyon değişiminin grafiksel gösterimi



Tablo 4: Deney grubu ve kontrol grubunun zamana bağlı konsantrasyon değişiminin karşılaştırması

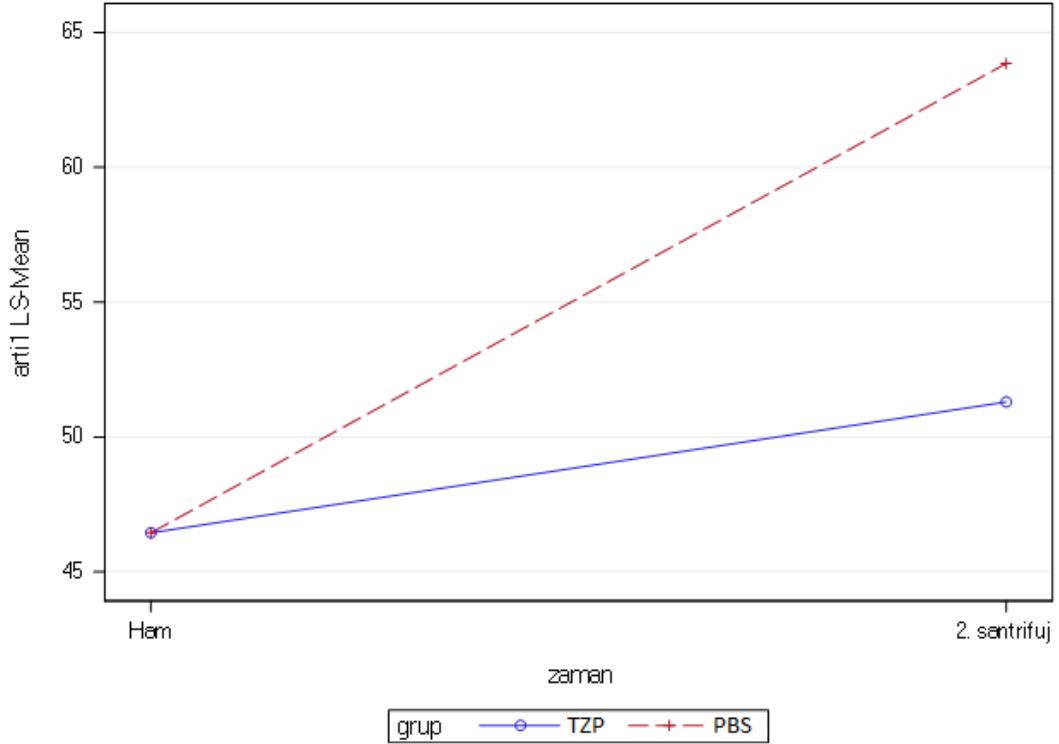
Deney grubu ve kontrol grubunun konsantrasyon karşılaştırması								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
zaman Ham	TZP	PBS	-133E-17	3.2641	57	-0.00	1.0000	1.0000
zaman 2. santrifüj	TZP	PBS	2.4500	3.2641	57	0.75	0.4560	0.4560

Tablo 5: Deney grubu ve kontrol grubunun zamana bağlı konsantrasyon karşılaştırmasının değerlendirilmesi

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
grup	1	57	0.28	0.5977
zaman	1	57	45.54	<.0001
grup*zaman	1	57	0.28	0.5977

Deney grubunun kendi içerisindeki zamana bağlı ölçümleri ve ham değeri arasındaki sperm konsantrasyon değerlendirmesinde deney grubunun ham ve 2. santrifüj zamanlarının kendi arasındaki değerlendirmesinde konsantrasyon %'leri aynı olduğu için ve istatistik sonucu $p > 0.05$ olduğundan anlamlı bulunmadı.

Grafik 2: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +1 değeri karşılaştırmasının grafiksel gösterimi

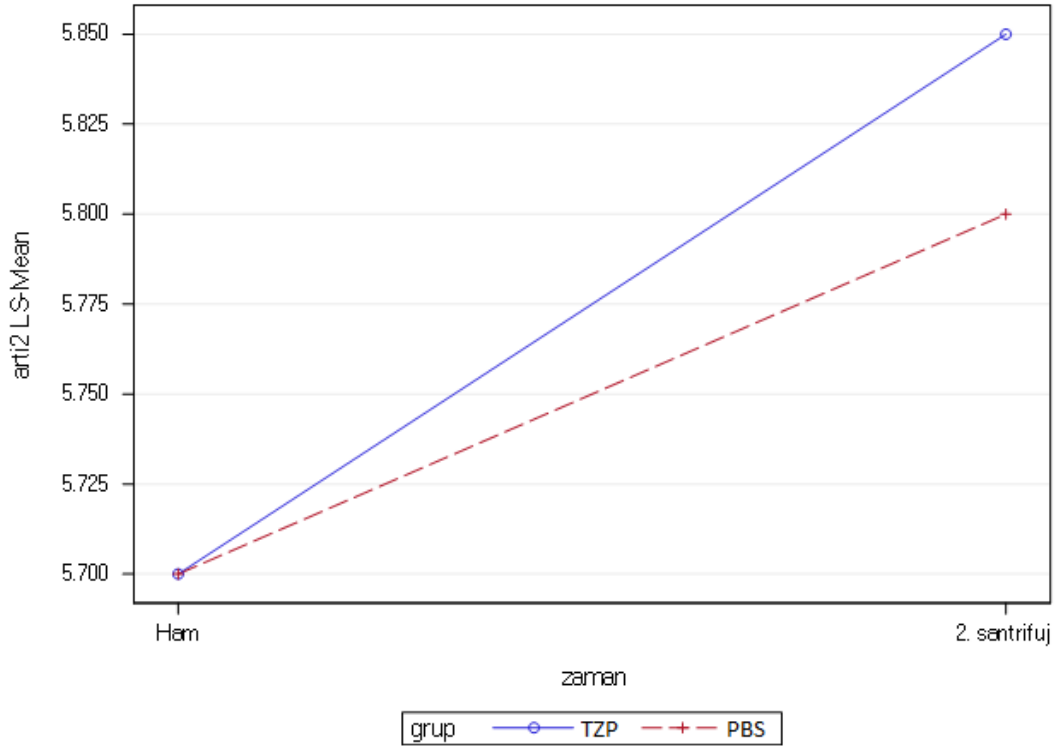


Tablo 6: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +1 değeri karşılaştırması

Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +1 değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
zaman Ham	TZP	PBS	-711E-17	2.4004	57	-0.00	1.0000	1.0000
zaman 2. santrifüj	TZP	PBS	-12.5500	2.4004	57	-5.23	<.0001	<.0001

Deney ve kontrol gruplarının Grafik 2 ve Tablo 6’da gösterilen ham ve 2. santrifüj değerleri arasındaki karşılaştırmada ham değerler aynı olduğundan gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı ($p>0.05$). Deney ve kontrol grubu arasında 2. santrifüj +1 verileri karşılaştırıldığında yaklaşık %65 olan kontrol grubu yaklaşık %50 olan deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<.0001$). Bu anlamlılık; +1 değeri immotil spermleri ifade ettiğinden A-TZP’li grup olan deney grubunda kontrole göre olumlu yönde bulgular elde edildiğini göstermektedir.

Grafik 3: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +2 değeri karşılaştırmasının grafiksel gösterimi

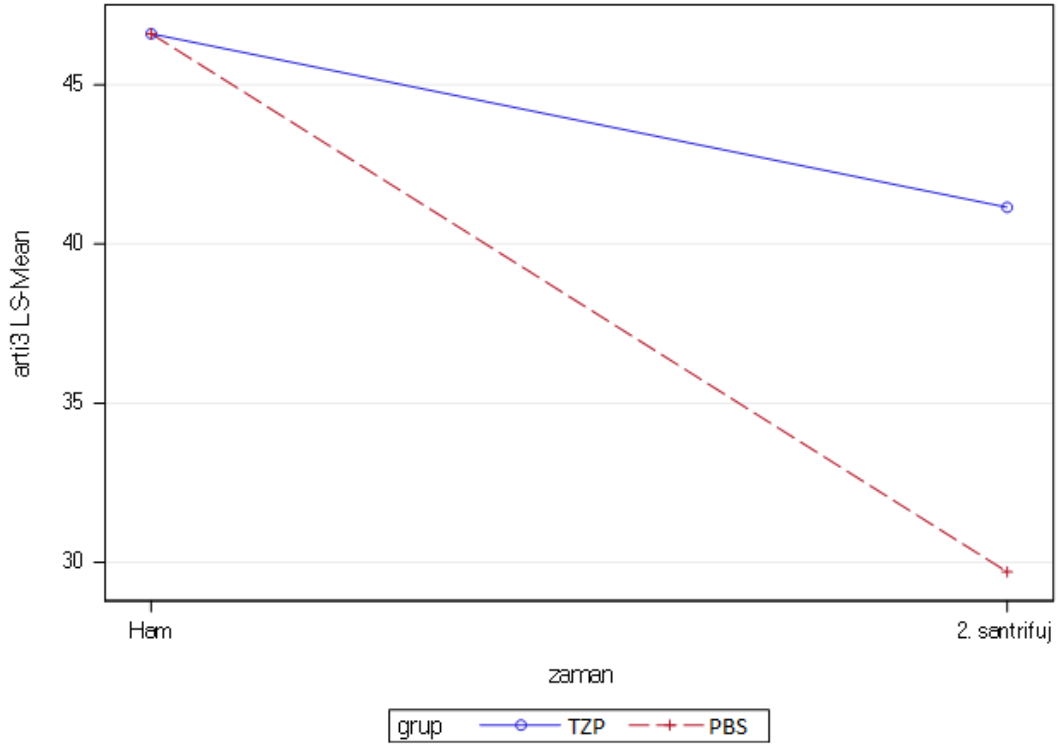


Tablo 7: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +2 değeri karşılaştırması

Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +2 değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
zaman Ham	TZP	PBS	1.39E-16	0.6701	57	0.00	1.0000	1.0000
zaman 2. santrifüj	TZP	PBS	0.05000	0.6701	57	0.07	0.9408	0.9408

Deney ve kontrol gruplarının ham ve 2. santrifüj +2 değerlerinin karşılaştırması Grafik 3 ve Tablo 7 üzerinde gösterildi. Gösterilen karşılaştırmalar arasında grupların ham değerleri değerlendirmesi anlamlılık göstermemektedir ($p > 0.05$). 2. santrifüj değerlerinin karşılaştırmasında ise gruplar arasındaki fark 0.05 olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.05$).

Grafik 4: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +3 değeri karşılaştırmasının grafiksel gösterimi



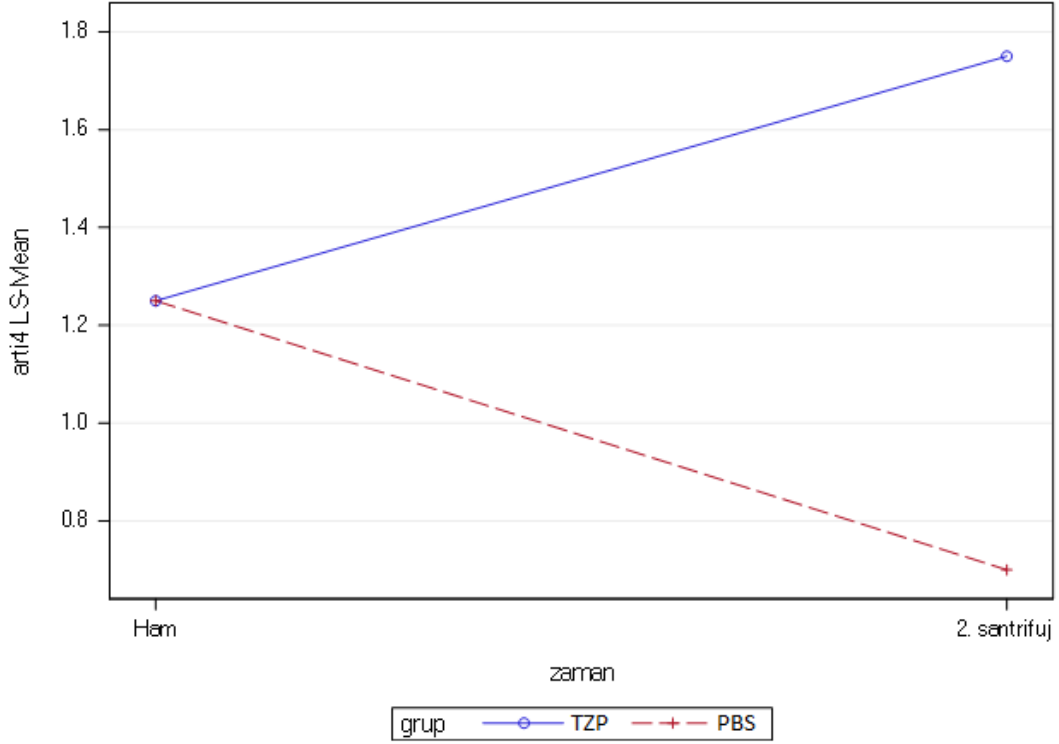
Tablo 8: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +3 değeri karşılaştırması

Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +3 değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
zaman Ham	TZP	PBS	1.07E-14	2.3855	57	0.00	1.0000	1.0000
zaman 2. santrifüj	TZP	PBS	11.4500	2.3855	57	4.80	<.0001	<.0001

Grafik 4 ve Tablo 8 üzerinde ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı +3 değerlerinin deney ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırması gösterildi. Ham değerleri deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p > 0.05$) Gruplar arasındaki 2. santrifüj karşılaştırmasında yaklaşık %40 üzeri olan deney grubu yaklaşık %30 olan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < .0001$). Deney grubunun kendi içerisindeki +3 karşılaştırmasında yaklaşık %45 üzerinde olan ham değeri yaklaşık %40 üzerindeki 2. santrifüj değerine

göre anlamlılık göstermektedir. Kontrol grubu içerisinde %45 üzerinde olan ham değeri %30 değeri yakınlarındaki 2. santrifüj değerine göre anlamlı bulunmuştur.

Grafik 5: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +4 değeri karşılaştırmasının grafiksel gösterimi

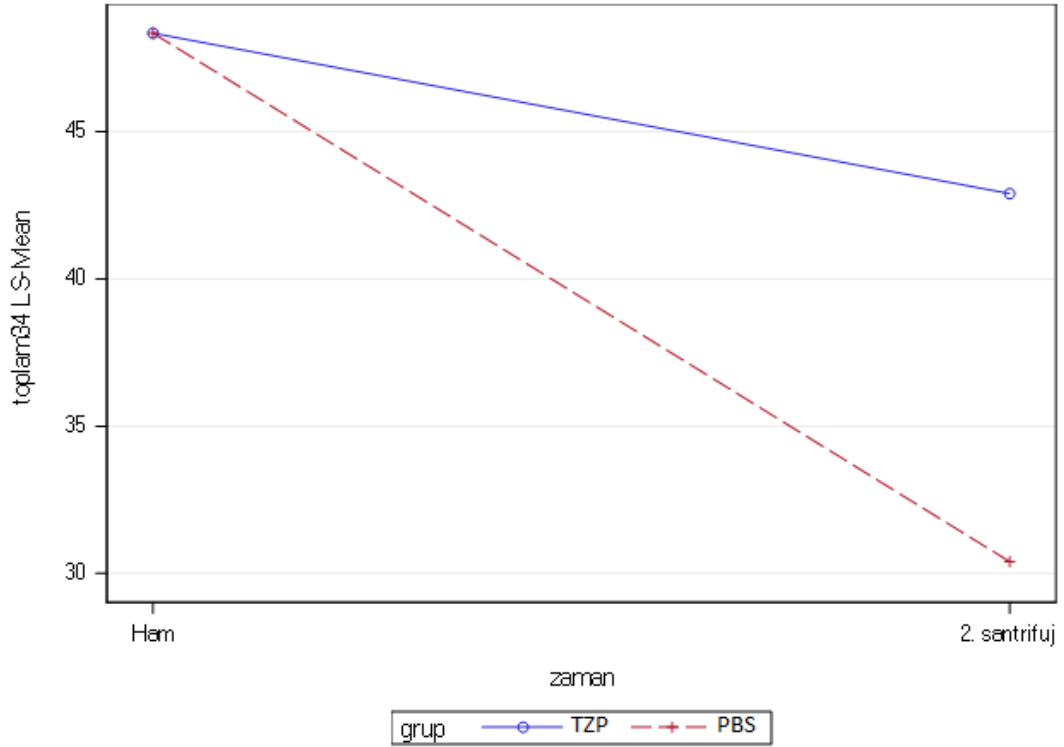


Tablo 9: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +4 değeri karşılaştırması

Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin +4 değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
zaman Ham	TYP	PBS	6.66E-16	0.4535	57	0.00	1.0000	1.0000
zaman 2. santrifüj	TYP	PBS	1.0500	0.4535	57	2.32	0.0242	0.0242

Deney ve kontrol gruplarının Grafik 5 ve Tablo 9’da gösterilen ham ve 2. santrifüj değerleri arasındaki karşılaştırmada ham değerler aynı verileri içerdiğinden gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı ($p > 0.05$). Deney ve kontrol grubu arasında 2. santrifüj +4 verileri karşılaştırıldığında $p = 0.024$ bulunduğundan deney grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Grafik 6: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı toplam +3 ve +4 değişiminin grafiksel gösterimi



Tablo 10: Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı toplam +3 ve +4 değişiminin değerlendirilmesi

Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin toplam +3 ve +4 değerleri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
zaman Ham	TYP	PBS	1.07E-14	2.3954	57	0.00	1.0000	1.0000
zaman 2. santrifüj	TYP	PBS	12.5000	2.3954	57	5.22	<.0001	<.0001

Deney grubu ve kontrol grubunun ham ve 2. santrifüj değerlerinin zamana bağlı toplam +3 ve +4 değişimleri arasındaki karşılaştırma Grafik 6 ve Tablo 10'da gösterildi. Ham değerleri arasında deney ve kontrol grubu ham değeri verileri aynı olduğundan istatistiksel olarak bir anlam gözlenmedi ($p=1.00$). 2. santrifüj değerleri arasındaki kontrol ve deney grubu karşılaştırmasında ise toplam +3 ve +4 değeri yaklaşık %40'tan fazla olan deney grubu toplam +3 ve +4 değeri yaklaşık %30 olan kontrol grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0.05$).

2. santrifüj sonrasında elde edilen örneklerin son verileri kaydedildikten sonra kontrol grubu eşit hacimde ayrılarak steril iki ependorf tüpe dağıtıldı. Aynı şekilde deney grubunun da steril iki ependorf tüpe eşit miktarlarda dağıtımı yapıldı. Kontrol ve deney grubundan ayrılan ependorflardan birer taneleri bir gece bırakılmak üzere $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de oda ısısına, ependorfa alınan diğer örnekler de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de soğuk buzdolabı ortamına kaldırıldı. Bir gece sonunda kontrol ve deney grubunun $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklerinden ayrı ayrı 10 µl alınarak Makler kamarasında konsantrasyon ve motilite (+1, +2, +3 ve +4) tayinleri yapıldı ve verileri kaydedildi. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan örnekler ise steril hava kabinine ilk çıkartıldıkları zaman yapılan Makler kamarası değerlendirmelerinde %100 immotil sonuçlar alındığı için değerlendirmeleri 30 dk inkübatörde bekletilme ardından gerçekleştirildi. Makler kamarasında konsantrasyon ve motilite tayinleri yapılan $+4^{\circ}\text{C}$ örneklerinin verileri kaydedildi ve tüm örnekler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 11: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı konsantrasyon değerleri karşılaştırması

Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin konsantrasyon değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Zaman	Zaman	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
islem*derece TZP 23	4	5	-4.0500	2.8650	209	-1.41	0.1590	0.3357
islem*derece TZP 4	4	5	-4.5500	2.8650	209	-1.59	0.1138	0.2530
islem*derece PBS 23	4	5	-4.8000	2.8650	209	-1.68	0.0953	0.2171
islem*derece PBS 4	4	5	-5.0500	2.8650	209	-1.76	0.0794	0.1848

Tablo 11'de gösterilen konsantrasyon karşılaştırmalarında $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklerin kendi içerisindeki 4. zaman olan 2. santrifüj değerleri ve 5. zaman olan bir gece saklama sonrası değerleri arasında $p<0.05$ değerini taşımadığından yapılan karşılaştırmalar anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 12: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı +4 değerlerinin karşılaştırması

Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin +4 değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Zaman	Zaman	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
islem*derece TZP 23	0	5	0.6000	0.4540	209	1.32	0.1877	0.3847
islem*derece TZP 23	4	5	1.1000	0.4540	209	2.42	0.0162	0.0427
islem*derece TZP 4	0	5	1.2500	0.4540	209	2.75	0.0064	0.0176
islem*derece TZP 4	4	5	1.7500	0.4540	209	3.85	0.0002	0.0005
islem*derece PBS 23	0	5	1.1500	0.4540	209	2.53	0.0120	0.0321
islem*derece PBS 23	4	5	0.6000	0.4540	209	1.32	0.1877	0.3847
islem*derece PBS 4	0	5	1.2500	0.4540	209	2.75	0.0064	0.0176
islem*derece PBS 4	4	5	0.7000	0.4540	209	1.54	0.1246	0.2735

Tablo 13: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +4 değerlerinin karşılaştırması

Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +4 değeri karşılaştırması						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
islem*derece *zaman	23 vs 4 islem=pbs zaman=5	-0.1000	0.4540	209	-0.22	0.8259
islem*derece *zaman	23 vs 4 islem=tzp zaman=5	-0.6500	0.4540	209	-1.43	0.1537

$+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan deney ve kontrol grubu örneklerinin +4 değeri karşılaştırmaları Tablo 12 ve Tablo 13'te verilmiştir. Deney grubu (A-TZP) ve kontrol grubunun (PBS) kendi içlerindeki +4 değerlerinin karşılaştırması deney grubunda $p=0.15$, kontrol grubunda $p=0.82$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. A-TZP grubunun $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki ham ve 5. zaman değerleri arasında, PBS grubunun $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki 2. santrifüj ve 5. zaman değerleri arasında ve PBS grubunun $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki 2. santrifüj ve 5. zaman değerleri arasında $p<0.05$ değerini taşımadığından istatistiksel olarak anlamlı değildir. A-TZP ve PBS gruplarının diğer karşılaştırmalarında p değeri 0.05'in altında olduğundan istatistiksel olarak anlamlıdır.

Tablo 14: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı +3 değerlerinin karşılaştırması

Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin +3 değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Zaman	Zaman	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
islem*derece TZP 23	0	5	19.1500	2.5296	209	7.57	<.0001	<.0001
islem*derece TZP 23	4	5	13.7000	2.5296	209	5.42	<.0001	<.0001
islem*derece TZP 4	0	5	30.0500	2.5296	209	11.88	<.0001	<.0001
islem*derece TZP 4	4	5	24.6000	2.5296	209	9.72	<.0001	<.0001
islem*derece PBS 23	0	5	31.2000	2.5296	209	12.33	<.0001	<.0001
islem*derece PBS 23	4	5	14.3000	2.5296	209	5.65	<.0001	<.0001
islem*derece PBS 4	0	5	39.2500	2.5296	209	15.52	<.0001	<.0001
islem*derece PBS 4	4	5	22.3500	2.5296	209	8.84	<.0001	<.0001

Tablo 15: Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +3 değerlerinin karşılaştırması

Deney ve kontrol gruplarının +23±2°C ve +4°C'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +3 değeri karşılaştırması						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
islem*derece *zaman	23 vs 4 islem=pbs zaman=5	-8.0500	2.5296	209	-3.18	0.0017
islem*derece *zaman	23 vs 4 islem=tzp zaman=5	-10.9000	2.5296	209	-4.31	<.0001

+23±2°C'ye ve +4°C'ye bırakılan deney ve kontrol grubu örneklerinin +3 değerlerinin karşılaştırmaları Tablo 14 ve Tablo 15'te verilmiştir. Deney grubu (A-TZP) ve kontrol grubunun (PBS) kendi içlerindeki +3 değerlerinin karşılaştırması sonucu deney grubunda ve kontrol grubunda $p < 0.05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulundu. A-TZP grubunun +23±2°C ve +4°C'deki örneklerinin zamana bağlı karşılaştırmaları ve PBS grubunun +23±2°C ve +4°C'deki örneklerinin zamana bağlı karşılaştırmaları $p < 0.05$ değerini taşıdığından istatistiksel olarak anlamlıdır.

Tablo 16: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı +2 değerlerinin karşılaştırması

Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin +2 değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Zaman	Zaman	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
islem*derece TZIP 23	0	5	0.5000	0.7404	209	0.68	0.5002	0.7781
islem*derece TZIP 23	4	5	0.6500	0.7404	209	0.88	0.3810	0.6549
islem*derece TZIP 4	0	5	0.05000	0.7404	209	0.07	0.9462	0.9975
islem*derece TZIP 4	4	5	0.2000	0.7404	209	0.27	0.7873	0.9606
islem*derece PBS 23	0	5	0.4500	0.7404	209	0.61	0.5440	0.8161
islem*derece PBS 23	4	5	0.5500	0.7404	209	0.74	0.4584	0.7383
islem*derece PBS 4	0	5	1.0000	0.7404	209	1.35	0.1783	0.3690
islem*derece PBS 4	4	5	1.1000	0.7404	209	1.49	0.1389	0.2999

Tablo 17: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +2 değerlerinin karşılaştırması

Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +2 değeri karşılaştırması						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
islem*derece*zaman	23 vs 4 islem=pbs zaman=5	-0.5500	0.7404	209	-0.74	0.4584
islem*derece*zaman	23 vs 4 islem=tzp zaman=5	0.4500	0.7404	209	0.61	0.5440

$+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan deney ve kontrol grubu örneklerinin +2 değerlerinin karşılaştırmaları Tablo 16 ve Tablo 17'de verilmiştir. Deney grubu (A-TZIP) ve kontrol grubunun (PBS) kendi içlerindeki +2 değerlerinin karşılaştırması sonucu deney grubunda ve kontrol grubunda $p < 0.05$ değeri sağlanmadığından istatistiksel olarak anlamsız bulundu. A-TZIP grubunun $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklerinin zamana bağlı karşılaştırmaları ve PBS grubunun $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklerinin zamana bağlı karşılaştırmaları değerlendirildiğinde $p < 0.05$ değerini taşımadığından istatistiksel olarak anlamsızdır.

Tablo 18: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin zamana bağlı +1 değerlerinin karşılaştırması

Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin +1 değeri karşılaştırması								
Simple Effect Level	Zaman	Zaman	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
islem*derece TZP 23	0	5	-20.3000	2.4706	209	-8.22	<.0001	<.0001
islem*derece TZP 23	4	5	-15.4500	2.4706	209	-6.25	<.0001	<.0001
islem*derece TZP 4	0	5	-31.3500	2.4706	209	-12.69	<.0001	<.0001
islem*derece TZP 4	4	5	-26.5000	2.4706	209	-10.73	<.0001	<.0001
islem*derece PBS 23	0	5	-32.8000	2.4706	209	-13.28	<.0001	<.0001
islem*derece PBS 23	4	5	-15.4000	2.4706	209	-6.23	<.0001	<.0001
islem*derece PBS 4	0	5	-41.5500	2.4706	209	-16.82	<.0001	<.0001
islem*derece PBS 4	4	5	-24.1500	2.4706	209	-9.77	<.0001	<.0001

Tablo 19: Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +1 değerlerinin karşılaştırması

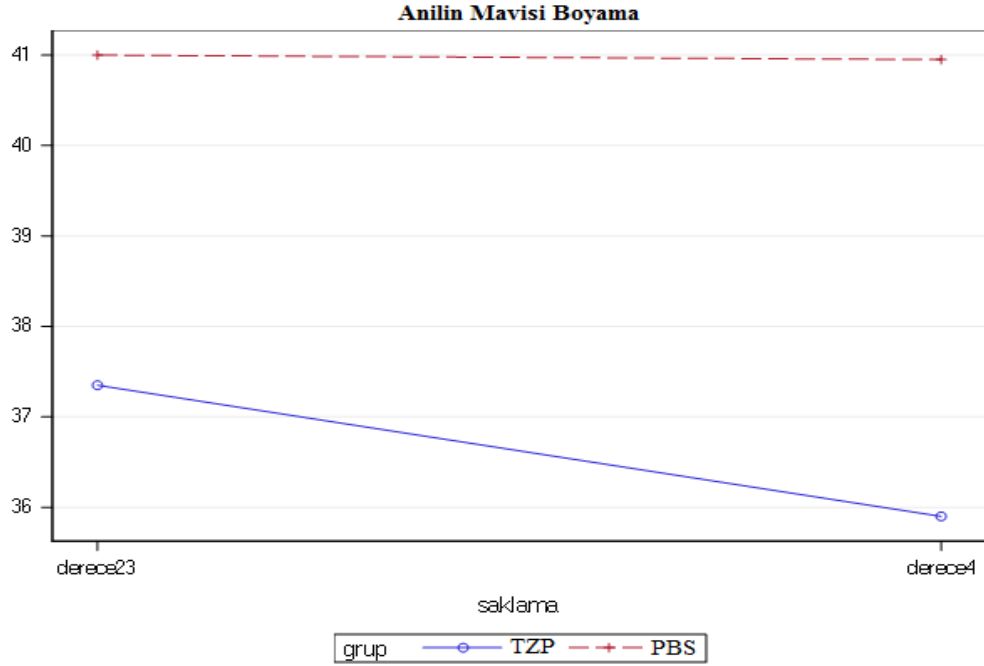
Deney ve kontrol gruplarının $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneklerinin kendi içindeki +1 değeri karşılaştırması						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
islem*derece *zaman	23 vs 4 islem=pbs zaman=5	8.7500	2.4706	209	3.54	0.0005
islem*derece *zaman	23 vs 4 islem=tzp zaman=5	11.0500	2.4706	209	4.47	<.0001

$+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan deney ve kontrol grubu örneklerinin +1 değerlerinin karşılaştırmaları Tablo 18 ve Tablo 19'da verilmiştir. Deney grubu (A-TZP) ve kontrol grubunun (PBS) kendi içlerindeki +1 değerlerinin karşılaştırması sonucu $p < 0.05$ değeri sağlandığından deney grubunda ve kontrol grubunda yapılan karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. A-TZP grubunun $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklerinin zamana bağlı karşılaştırmaları ve PBS grubunun $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklerinin zamana bağlı karşılaştırmaları değerlendirildiğinde $p < 0.05$ değerini taşıdığından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Bir gece sonrasında verileri kaydedilen deney ve kontrol grubunun $+4^{\circ}\text{C}$ ve $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ örneklerinin ayrı ayrı boyama işlemleri yapılarak kromatin yapıları değerlendirildi. Her bir örnekten 10 μl alındı ve steril bir şekilde lam üzerine 45° 'lik açı tutularak lamel yardımıyla yayma preparat hazırlandı ve açık havada 10-15 dk kurumaya bırakıldı. Hazırlanan preparatlar ilk önce 30 dk süreyle hazırlanan %4'lük formaldehit içerisinde fikse edildi. Fiksatiften çıkarılan preparat distile su içinde 1dk süreyle iki defa durulanarak açık havada 10 dk kurumaya bırakıldı. Ardından 10 dk boyunca daha önceden % 4'lük asetik asit ile karıştırılarak hazırlanan %5'lik asidik anilin mavisi ($\text{pH}= 3.5$) içerisine konuldu. Boyamadan sonra preparat boyadan çıkartılarak üç defa 1dk süreyle distile su içerisinde durulandı. Açık havada kurutulan preparat immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta 100x büyütmede görüntülendi. Görüntülenen spermier boya alma durumlarına göre boya alan koyu mavi görüntülenen spermier anilin mavisi pozitif; boya almayan açık mavi renkte görüntülenen spermier anilin mavisi negatif olarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar kaydedildi. Her preperatta boya alan ve almayan 100 sperm sayılarak anilin mavisi pozitif spermierin %'lik değeri hesaplandı.

$+4^{\circ}\text{C}$ ve $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece saklanan kontrol ve deney grubu örneklerinin toplam sayılan 100 spermdeki anilin mavisi pozitif sperm verileri karşılaştırıldı (Grafik 7, Tablo 20, Tablo 21). Örneklerimizde boyanma sonrası anilin mavisi pozitif değerinin düşük çıkması kromatin yapısı olarak daha iyi düzeyde olduğunu göstermektedir. Deney grubunda $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan örneğin anilin mavisi pozitif değeri (35.90), daha yüksek yüzdede çıkan (37.35) $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye bırakılan deney grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Deney ve kontrol grubu $+4^{\circ}\text{C}$ örnekleri karşılaştırıldığında yaklaşık %36 olan deney grubu %41 olan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<.0001$). $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklere bakıldığında yaklaşık %37 olan deney grubu %41 olan kontrol grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubunun kendi içerisindeki karşılaştırmasında $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki değeri 41.00, $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki değeri 40.95 olduğundan herhangi bir anlamlılık bulunmadı.

Grafik 7: Kontrol ve deney grubu +4°C ve +23±2°C örneklerinin anilin mavisi (+) boyama sonuçları karşılaştırması



Tablo 20: Kontrol ve deney grubu +4°C ve +23±2°C örneklerinin anilin mavisi (+) boyama sonuçlarının karşılaştırması

Kontrol ve deney grubu +4°C ve +23±2°C’de bir gece saklanan örneklerinin anilin mavisi (+) boyama sonuçları karşılaştırması								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
saklama derece23	TZP	PBS	-3.6500	1.0396	57	-3.51	0.0009	0.0009
saklama derece4	TZP	PBS	-5.0500	1.0396	57	-4.86	<.0001	<.0001

Tablo 21: +4°C ve +23±2°C örneklerinin anilin mavisi (+) boyama değerlerinin karşılaştırması

Kontrol ve deney grubu +4°C ve +23±2°C örneklerinin anilin mavisi (+) boyama karşılaştırması								
grup	saklama	N Obs	N	Mean	Std Dev	Median	Lower Quartile	Upper Quartile
PBS	derece23	20	20	41.00	6.05	42.00	36.00	46.00
	derece4	20	20	40.95	4.21	41.50	38.00	43.00
TZP	derece23	20	20	37.35	5.28	39.00	33.00	42.00
	derece4	20	20	35.90	5.74	36.50	31.00	39.50

5. TARTIŞMA

Sahip olunan yaşam şartları, geçirilen hastalıklar ve oluşan genetik malformasyonlar gibi birçok farklı sebepler çiftlerin doğal yolla gebelik elde etme imkânlarını giderek azaltmaktadır. Bu nedenler sonucunda doğal yollarla fertilizasyonun sağlanamaması günümüzde çiftleri yardımcı üreme tekniklerine yöneltmektedir. Bu bağlamda YÜT'ye başvuran bireylerin kadın ve erkekte infertiliteye yol açan sebepleri araştırılarak belirlenmekte ve bu sebepler üzerine çözüm oluşturulması hedeflenmektedir.

Yaşanılan dönemde infertilitenin erkek faktörlü oluşumu %40 düzeylerine ulaşmış durumdadır. Fertilizasyon, kadının uygun şartları taşıyor olmasına rağmen erkek bireyin fertilite özelliklerindeki rahatsızlık sonucu olumsuz etkilenebilmektedir. Bu nedenle ciddiyle önem kazanan erkeğe bağlı infertilitede nedenleri araştırmak ve tespit etmek amacıyla semen analizi ile hem ejakülatın fiziksel özellikleri (volüm, viskozite, pH vb.) hem de sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi, viabilitesi ve morfolojisi gibi sperm kriterleri değerlendirilmektedir. Bu kriterlere ilave olarak fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi ve sağlıklı bir embriyonun oluşumu için sperm DNA'sında herhangi bir hasar bulunmaması ve DNA bütünlüğünün oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır. (Budak 2014; Hatiboğlu 2014). Öyle ki, elde edilen spermilerin DNA yapılarının bilinmemesinin, kullanılan yöntemlerde hasarlı DNA'ya sahip spermilerle işlem yapılmasının başarı oranlarında düşüşe sebebiyet verdiği çeşitli çalışmalarca gözlemlenmiştir.

Trombositlerde bulunan α granülleri içinde doku iyileşmesi ve hemostazisde önemli rolü olan birçok molekül içerir. Yaralanmalara karşı cevap olarak aktivasyonları sağlandığında granüller içerisinde yer alan salgı granülleri biyoaktif bir hale dönüştürülür ve hedef hücrelerin transmembran reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma ile hücre çoğalmasını, matriks oluşumunu, kollajen sentezini ve osteoid üretimini uyarak; homeostazis, doku yenilenmesi, yara iyileşmesi, anjiogenez gibi süreçlerde rol oynadıkları gösterilmiştir (Dhurat ve Sukesh 2014; Cansever 2017; Şekerci ve ark. 2017). A-TZP tedavisinin temel prensibi insan vücudunun doğuştan gelen tamir yeteneğini arttırmak, yaralanma sonrası iyileşmeyi hızlandırmaktır. TZP içinde trombosit oranı artmış olup bu yüksek trombosit konsantrasyonu hedef bölgeye uygulandığında hiperfizyolojik bir büyüme faktörü konsantrasyonu oluşturarak hasar

bölgesinde iyileşme potansiyelini arttırdığı yapılan çalışmalarca bildirilmektedir (Hancı ve ark. 2015; Epifanova ve ark. 2017).

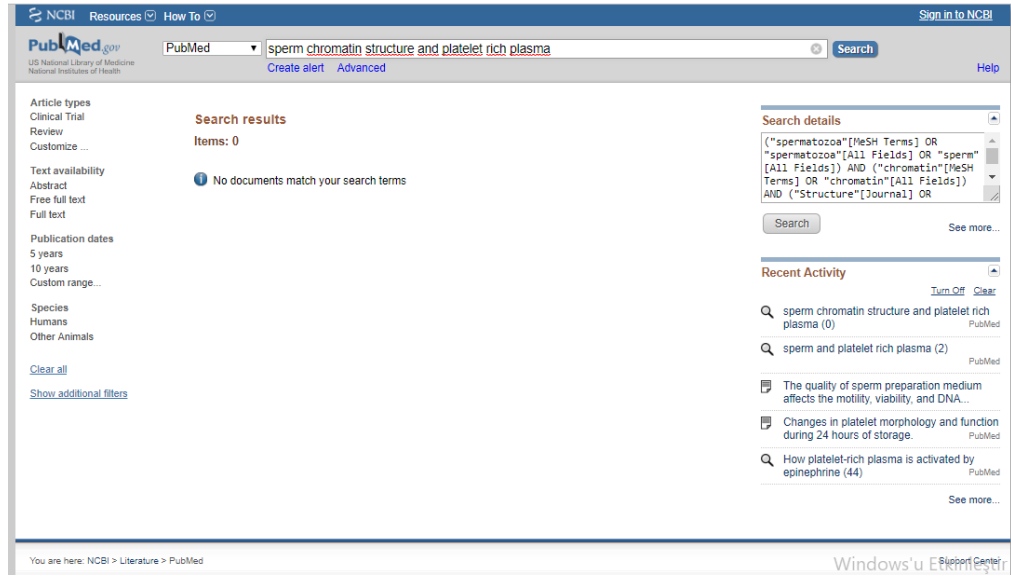
Günümüzde kullanımı mevcut ve alternatif tedavi yöntemlerinin araştırıldığı, kandan elde edilmesi kolay ve gerçekleştirilen araştırmalarda herhangi bir yan etkisi ortaya çıkmamış olan TZP'nin, çeşitli süreçlerde önemli rollere sahip olan birçok molekülü içeriğinde bulundurduğu literatürde yer alan birçok çalışma sonucunda gösterilmiştir. Bununla birlikte TZP'nin uzun süredir kullanılmasına rağmen, trombosit konsantrasyonlarının farklı çeşitlerini tanımlamak, sınıflandırmak ve tanımlamak için uygun bir terminoloji oluşturulabilme konusunda hala kafa karışıklığının bulunduğu belirtilmiştir (Dhurat ve Sukesh 2014).

Bu bilgiler göz önünde bulundurularak A-TZP, içeriğinde çeşitli büyüme faktörleri içermesi, kolay bir şekilde elde edilmesi ve herhangi bir yan etkiye sebebiyet vermemesi sayesinde son yıllarda süregelen çalışmalarda işlevlerinin araştırıldığı alternatif bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Biz de çalışmamızda bu düşüncelere dayanarak basit yıkama yönteminde A-TZP ilavesiyle hazırlanan semen örneklerinde A-TZP'nin sperm değerleri üzerinde nasıl bir etki oluşturacağını irdelleyerek bugüne kadar kısıtlı sayıda gerçekleştirilmiş olan semen, sperm, büyüme faktörleri ve TZP çalışmalarına katkı sağlamayı ve olumlu bir sonuç alınması halinde günümüzde erkek infertilitesinde kullanılan medyumlara alternatif bir katkı maddesi olarak çözüm yolu oluşturabilmeyi amaçladık.

Bader ve ark. (2019), hazırladıkları %2'lik TZP'nin in vitro ortamda H₂O₂'e maruz bırakılarak oksidatif strese uğratılan sperm hücrelerinde motilite üzerinde artış, DNA fragmantasyonunda ise azalış meydana getirdiği bulgularını yapmış oldukları çalışmada elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada elde edilen bulgular bizim çalışmamızdaki bulgularımızı destekler niteliktedir.

Günümüzde gerçekleştirilmiş olan çalışmalara literatürde bakıldığında bizim yapmış olduğumuz çalışmaya benzer semen ve A-TZP'nin birebir çalışıldığı araştırma bulunmamaktadır (Şekil 4). Bu bağlamda bakıldığında gerçekleştirdiğimiz çalışma diğer çalışmalara örnek olabilecek bir ilki teşkil etmektedir.



Şekil 4: 13.06.2019 tarihinde Pubmed üzerinden yapılan tarama (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sperm+chromatin+structure+and+platelet+rich+plasma>)

Yardımcı üreme tekniklerinde kullanılagelen sperm yıkama medyumlarının genel özelliklerine bakıldığında steril olması, pH ve ozmolaritenin uygunluğu göz önünde bulundurulmaktadır. Yıkama solüsyonu olarak kullandığımız PBS'in pH değeri 7,2-7,4 ve ozmolaritesi 380 mOsm/l'tir. TZP'nin değerlerine baktığımızda ise pH'ı 7,4 ve ozmolaritesi 275-299 mOsm/l'te olduğundan semenin 7,2-8,0 olan pH ve 285-350 mOsm/l'te değerlerine uygundur. Çalışmamızda kullandığımız A-TZP'nin bu bilgiler sonucunda sperm hazırlanmasında kullanılabilecek ek bir katkı maddesi olduğunu düşünüyoruz.

Bununla birlikte in vitro ortamda fertilizasyon olasılığını artırabilmek için sperm hazırlığında birçok farklı kimyasal madde ve biyolojik sıvıların eklendiği çeşitli kültür solüsyonlarından yararlanılmaktadır. Bu eklenenlerden biri de kapasitasyonun oluşumu için gerekli Ca^{+2} ve K^{+1} iyonlarıdır (Yiğit 2015; Yüce 2015). Plazmada yer alan trombositler içerisinde Na^{+1} , Ca^{+2} , K^{+1} , Mg^{+2} gibi iyonları bulundurmaktadır. Aynı amaç için kullanıldığında elde edilen TZP'nin kapasitasyonu uyarabilir olduğunu söyleyebiliriz.

TZP hazırlığında kullanılan farklı aktivasyon işlemleri ile birlikte farklı santrifüjleme adımları, kuvvetleri ve süreleri elde edilen TZP'nin trombosit konsantrasyonunda, aktivitelerinde ve alınan verimlerinde çeşitliliğe yol açabilmektedir. Bu nedenle daha önceki yapılan çalışmalarda TZP'nin bulunduğu

ortama içerdği büyüme faktörlerini ve sitokinleri farklı oranlarda serbest bırakması olasılığı sebebi tartışma konusu olmuştur (Chen ve ark. 2009; Sawamura ve ark. 2009; Wang ve ark. 2013; Akeda ve ark. 2017). Bizim çalışmamızda TZP'nin ne derece aktive edildiği ve büyüme faktörlerinin ne ölçüde salındığı bilinmese de elde ettiğimiz verilerin sonuçları aktive ettiğimiz TZP'nin içerisindeki büyüme faktörleri ve diğer moleküllerin sperm üzerine artı yönde bir etki oluşturabildiğini göstermiştir.

Cavallo ve arkadaşları (2016), TZP'nin aktive edilebilmesi için gereken farklı maddelerin (% 10 CaCl₂, % 10 otolog trombin, % 10 CaCl₂ + trombin karışımı ve % 10 kollajen tip I) kullanımının aktivasyonu ve açığa çıkan VEGF, TGF, PDGF büyüme faktörlerini ne şekilde etkileyeceğine dair bir çalışma yapmışlardır. Gerçekleştirmiş oldukları çalışmada 15. ve 30. dakika ve 1, 2 ve 24 saat dilimlerinde kullanılan %10'luk CaCl₂ aktivatörünün yaklaşık birinci saat dilimindeki açığa çıkardığı büyüme faktörü değerlerinin arttığı ve diğer aktivatörlerle karşılaştırıldığında çok fazla bir farkın bulunmadığı gösterilmiştir. Çalışmamızda TZP'nin CaCl₂ ile aktivasyonu sağlanmış olup bir saat inkübe süresinde trombosit içeriklerinin açığa çıkması beklenmiştir. Cavallo ve arkadaşlarının çalışmasından yola çıkarak yapmış olduğumuz basamakların sonucunda büyüme faktörlerinin iyi bir oranda elde edilebildiğini söyleyebiliriz.

+4°C ve +25°C'de tutulan spermiler ile ilgili bir çalışmada sperm hareketliliğinin 12 gün sonunda tamamen immotile indiği gösterilmiştir (Dashti ve ark. 2018). Biz yaptığımız çalışmada aynı sperm örneğini iki gruba ayırarak sıcaklık farklarını aynı örnekte değerlendirmeyi amaçladık. Semen örneklerinin yıkanmasından sonra elde ettiğimiz spermileri A-TZP ile muamele ederek A-TZP içerisindeki büyüme faktörlerinin sperm hareketliliğinin devam ettirilmesi üzerine olan etkisini gözlemledik ve sonuç olarak +4°C ve +23±2°C'de tutulan spermelerde motilite olarak olumlu değerler aldık.

Bizim çalışmamızda bazı örneklerde 1 gece sonunda yapılan sayımlardaki motilite düşüklüğünün sebebi olarak verilen sperm üzerine otolog bir TZP kullanılmaması neden olarak gösterilebilir. Bireyler arasındaki hücre ya da moleküler düzeydeki farklılıklar çeşitli sıkıntılar oluşturabilmektedir. TZP etkisinin tamamen kötü olduğunu belirtememekle birlikte bu konunun daha sonraki yapılacak olan çalışmalarda otolog TZP kullanımı ile gözlemlenmesi ve detaylı bir şekilde

irdelenmesi gereklidir. Ayrıca sperm saklanma koşulları optimum seviyede tutulsa bile saklanma süresi sperm kalitesine olumsuz etki oluşturabilmektedir.

Tataru ve ark. (2015) taze ejakülatı, doğal olarak veya TNE-tamponunda muhafaza ederek farklı sıcaklık ve süre zarflarında çalışmış oldukları örneklerdeki spermlerin kromatin yapılarını değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda 48 saat sonunda 4°C’de muhafaza edilen örneklerde sperm DNA parçalanma indeksinin önemli bir değişiklik göstermediği, 25°C ve 37°C altında saklanan örneklerde ilk günün sonunda DNA fragmentasyonunun önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Biz de yaptığımız çalışmada A-TZP ve PBS uygulanan örnekler içerisinde A-TZP +23±2°C’deki örneklerde motilite olarak daha verimli sonuçlar elde etmiş olsak da +4°C’deki hem A-TZP ile hem de PBS ile muamele edilen örneklerin kromatin tayini verilerinin +23±2°C’deki örneklerin verilerinden daha iyi sonuçlandığını gözlemledik.

Farklı sperm hazırlama tekniklerinin sperm parametre değerleri ve DNA bütünlüğü üzerindeki etkileri çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir. Anbari ve arkadaşlarının (2016) yapmış oldukları çalışmada sperm hazırlama medyumunun doğasının, sperm hareketliliğini ve hazırlanan spermlerin DNA bütünlüğünü etkilediği gösterilmiştir. Sperm DNA fragmentasyonunun seviyesinin sperm kalitesine, depolama sıcaklığına ve sperm süspansiyonunun inkübasyon süresine ve ayrıca hazırlama ortamına bağlı olarak değişir olduğu söylenmiştir.

Basit yıkama yöntemiyle spermlerin hazırlanması aşamasında yapılan santrifüj işlemlerinin oksidatif strese bağlı reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerinde bir artışa neden olduğu ve sperm üzerine olumsuz etki oluşturabileceği literatür kaynaklarında belirtilmiştir. Bunun haricinde herhangi bir eliminasyon içermeyen yöntem, diğer kontamine edici hücrelerin, olgunlaşmamış ve kötü morfolojili spermatozoalarında beraberinde çalışılmasına neden olmaktadır.

Bu olumsuzluklara rağmen çalışmamızda A-TZP kullanılan örneklerimizde motilite olarak anlamlı veriler elde edilmiştir. Kromatin yapısı olarak incelediğimizde ise deney grubumuzdaki örnekler kontrol grubuna nazaran daha düşük pozitif boyanma göstermiştir. Bu çıkan sonuçlar A-TZP içeriğinin, ne kadar hangi faktörün ne konuda ne derece etkisinin olduğu bilinmiyor olursa da kullandığımız yöntemin ve çeşitli olumsuzlukların oluşturduğu sıkıntıları giderdiğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirmiş olduğumuz ‘Trombositten zengin plazma (TZP) ile muamele edilmiş semen örneklerinde oda ısısı ($+23\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve soğuk ortam şartlarının ($+4^{\circ}\text{C}$) sperm parametreleri ve kromatin yapısına etkilerinin değerlendirilmesi’ adlı çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ışığında şu sonuç ve önerileri çıkarabiliriz:

Basit yıkama metoduyla elde edilen spermelerin motilite parametreleri üzerindeki A- TZP etkisi incelendiğinde 2. santrifüj sonrasında kontrol grubuna kıyasla +3 ve +4 motil spermelere bakıldığında olumlu şekilde anlamlı bir sonuç elde edilmiştir.

Bir gece saklama sonrasında $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $+4^{\circ}\text{C}$ ’ye bırakılan örnekler arasında ise A-TZP kullanılan grupta kontrol grubuna göre daha iyi motilite sonuçları alınmıştır. Deney grubunun kendi içerisinde bakıldığında ise $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ’deki örnekler motilite verileri olarak $+4^{\circ}\text{C}$ ’deki örneklerden daha anlamlı çıkmıştır.

Deney ve kontrol gruplarının anilin mavisi boyama sonuçlarında ise kromatin yapısının korunması olarak baktığımızda $+4^{\circ}\text{C}$ ’deki deney grubu örnekleri en iyi verileri elde ettiğimiz örnekler olmuştur.

- Yukarda bahsettiğimiz çalışma sonuçlarımıza ve literatürdeki benzer birçok çalışmaya baktığımızda A-TZP’nin sperm kültür medyumlarına alternatif bir katkı maddesi olarak kullanılabilirliğini gözlemledik.
- A-TZP kullanılarak hazırlanan semen örneklerinin hazırlanmış oldukları gün dışında belirli bir süre daha motilite değerlerini koruduğunu ve kromatin yapısının kararlılığının sağlanabilmesi için örneklerin buzdolabı şartlarında uygun bir şekilde muhafaza edilebilir olduğunu gözlemledik.
- Çalışmamızda bazı örneklerde 1 gece sonunda yapılan sayımlardaki motilite düşüklüğünün sebebi olarak verilen sperm üzerine otolog bir TZP kullanılmaması neden olarak gösterilebilir. Bireyler arasındaki hücre ya da moleküler düzeydeki farklılıklar çeşitli sıkıntılar oluşturabilmektedir.
- Yaptığımız çalışma üzerine belirli bir standardizasyonun sağlanmasıyla ve otolog TZP kullanımı ile daha olumlu yönde sonuçlar elde edebilmek için farklı açılardan kapsamlı olacak şekilde ek çalışmalar gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Akeda K, Ohishi K, Masuda K, Bae W, Takegami N, Yamada J, ... & Sudo, A. Intradiscal injection of autologous platelet- rich plasma releasate to treat discogenic low back pain: a preliminary clinical trial. *Asian Spine Journal*. 2017; 11(3): 380–89.
- Akeda K, Yamada J, Linn ET, Sudo A, Masuda K. Platelet-rich plasma in the management of chronic low back pain: a critical review. *Journal of Pain Research*. 2019; 12: 753–67.
- Aksoy E. Erkek germ hücrelerinin morfolojisinin farklı histolojik boyalarla ışık mikroskobu düzeyinde değerlendirilmesi. Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 2008 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. T. Murad Aktan).
- Aksu S. Açıklanamayan infertilitesi olan hastaların endometriyumlarında doğal öldürücü hücre yoğunluğunun değerlendirilmesi. Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kocaeli, 2010 (Tez Danışmanı: Doç.Dr. Eray Çalışkan).
- Aktaş H. Derin teratozoosperminin ICSI’de gebelik sonuçları üzerindeki etkisi. Sağlık Bakanlığı Süleymaniye Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2007 (Tez Danışmanı: Doç.Dr. A.Süha Sönmez).
- Alsousou J, Ali A, Willett K, Harrison P. The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Platelets*. 2013; 24 (3):173-82.
- Altınar P. Eser elementlerin yol açtığı DNA hasarlarının seminal plazma ve sperm kromatin yapısı üzerine etkisinin tek hücre jel elektroforez (Comet Assay) yöntemi ile analizi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2013 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Isıl Albeniz).
- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004; 91(1): 4–15.
- Aydemir B. ve Karadağ Sarı E. Platelet kaynaklı büyüme faktörünün yapısı, fonksiyonları ve gelişim üzerine etkileri. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg, 2009; 4(3): 209-14.
- Aydın E. Melatoninin insan sperm hücresi fonksiyonu ve DNA hasarı üzerine etkisinin in vitro fertilizasyon açısından değerlendirilmesi. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, İstanbul, 2018 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şeyda Şebnem Özkal).
- Aydiner F. Sperm kriyoprezervasyonu sonrasında apoptozun değerlendirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2008 (Tez Danışmanı: Doç.Dr. Kazım Tugyan).
- Bay F. Sigara kullanan ve sigara kullanmayan infertil erkeklerde sperm DNA hasarı ve apoptozis. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ender Erdoğan).
- Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 139-44.
- Bilgiç E. Erişkin erkek sıçanlarda benzenin testis dokusu üzerine etkilerinin histolojik incelenmesi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Leyla Canpolat Koyutürk).
- Birdal S. C Poli (ADP- Riboz) polimerazın infertil insan ejakülat sperminde incelenmesi: sperm anomalileri ile olan ilişkisi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2010 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Faruk Alkan).
- Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17; (4): CD004507.
- Budak Ö. Sperm parametreleri ile sperm DNA fragmentasyonu ve kromozom anomalilerinin karşılaştırılması. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Kocaeli, 2014 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz).
- Buran A. Erkek infertilitesinde, sperm kaynağına göre ICSI işlemi ile elde edilen embriyoların embriyo

- izleme yöntemi ile retrospektif olarak değerlendirilmesi. Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülay İrez).
- Can Karagöz N. Erkek infertilitesi tanısı almış bireylerin spermalarında otofaji belirteçlerinin araştırılması. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Doktora Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2018 (Tez Danışmanı: Prof.Dr. Kemal Ergin).
- Caner B.C. Farklı hasta gruplarında sperm morfolojisi ve DNA hasarı arasındaki ilişkinin belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2015 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Arzu Hanım Yay).
- Cansever Ü. Bilateral orta düzey karpal tünel sendromlu hastalarda plateletten zengin plazma (PRP) enjeksiyonu ile steroid enjeksiyonunun etkinliğinin karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2017 (Tez Danışmanı: Doç.Dr. Şebnem Koldaş Doğan).
- Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, et al. Platelet-rich plasma: the choice of activation method affects the release of bioactive molecules. *Biomed Res Int.* 2016;2016(1): 1–7.
- Ceyhan V. Gonadotropinler ile ovulasyon indüksiyonu ve intra uterin inseminasyon yapılan hastalarda farklı luteal destek protokollerinin klinik gebelik ve canlı doğum oranları üzerindeki etkilerinin araştırılması. Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kayseri, 2016 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Semih Uludağ).
- Chen WH, Liu HY, Lo WC, et al. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials.* 2009; 30:5523–33.
- Çakır T. Gonadotropin ile indüklenmiş hastalarda intrauterin inseminasyon (IUI) uygulanmasında kullanılan sperm parametrelerinin araştırılması. Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2017 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Tan).
- Çankaya T. Gelişimi durmuş embriyolarda sık görülen anöplodilerin araştırılması, sperm DNA fregmantasyonu ve sperm fish bulguları ile ilişkisi. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, 2006 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cihangir Özkinay).
- Dashti GR, Nateghian Z, Iranpour FG. Effect of preservation of human semen sample at 4–6 and 25°C on sperm motility. *Cell Tissue Bank* (2018) 19:653–58.
- Değirmenci Y. IUI sikluslarına giren hastalarda cinsel perhiz süresinin reaktif oksijen radikalleri oluşumu üzerine etkisi prospektif çalışma. Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet Erdem).
- Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. İn: Delilbaşı L. (eds). Ankara: Öncü Basımevi; 2008; 1-31.
- Demirel A. Normozoospermik ve non-normozoospermik hasta gruplarında DNA fragmentasyon oranının sperm anöplodilerine etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 2018 (Tez Danışmanı: Prof.Dr. Sevilhan Artan).
- Dinç T. Spermatozoonların miktar, biçim ve hareket bakımından normal olan erkeklerde sperm dondurma-çözme işleminde DNA hasar tayini. Maltepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güler Öztürk).
- Doğan Ş. Seminal plazma reaktif oksijen türlerinin (ROS) sperm DNA fragmentasyonu ve apoptozu sürecinde infertiliteye olan etkisinin değerlendirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2008 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Çetin Pekçetin).
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27:158-67.
- Durak İ.N. Oligospermide sperme ait yapısal parametrelerin araştırılması. Selçuk Üniversitesi, Sağlık

- Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ender Erdoğan).
- Durmuş T. Anilin Mavisi Boyasının Farklı Fiksatiflerle Uygulanması İle Sperm Kromatin Kondansasyonunun İncelenmesi. Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2018 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülay İrez).
- Engelbrechtsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E and etc. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. Br J Sports Med. 2010;44:1072-81.
- Epifanova MV, Chaly ME. & Krasnov A. Investigation of mechanisms of action of growth factors of autologous platelet-rich plasma used to treat erectile dysfunction. Urologiia, 2017; 4, 46-48.
- Ercan Ü.G. Açıklanamayan infertilite hasta grubunda yaşanan IVF uygulama başarısızlıklarında sperm DNA hasarı ve anöploidinin etkisi. Turgut Özal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Murat Öznur).
- Erimşah S. Normozoospermik infertil hastalardan farklı seçim yöntemleri ile elde edilen spermilerin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik incelenmesi. Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Kocaeli, 2017 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süheyla Gonca).
- Erşen A. Trombositten zengin plazmanın rotator manşet iyileşmesine etkisinin incelenmesi biyomekanik deneysel çalışma. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Ana Bilim Dalı uzmanlık Tezi, İstanbul, 2011 (Tez Danışmanı: Prof.Dr. Mehmet Demirhan).
- Ertekin Y.B. Hafif ve şiddetli erkek infertilitesi ile açıklanamayan infertilitenin IVF sonuçları açısından değerlendirilmesi. Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Antalya, 2015 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehmet Sakıncı).
- Esteves CS, Schneider DT. Male infertility and assisted reproductive technology: lessons from the IVF. The Open Reproductive Science Journal. 2011;3: 138-53.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. J Androl 2002; 23: 25-43.
- Fidan E. İdiyopatik ve idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil hastalarda sperm DNA bütünlüğü ve oksidatif hasarın incelenmesi. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Bolu, 2018 (Tez Danışmanı: Prof.Dr. Aysel Kükner).
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. Arch Androl, 2000; 45: 215-25
- Gökçe A. Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Standart Semen Analizi. Türk Ürol. Sem, 2011; 2:1-7.
- Hammadeh M, Zeginiadov T, Rosenbaum P. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. Arch Androl 2001; 46: 99-104.
- Hancı M, Karamese M, Tosun Z, Aktan TM, Duman S. & Savaci N. Intra-articular platelet-rich plasma injection for the treatment of temporomandibular disorders and a comparison with arthrocentesis. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2015; 43(1), 162-66.
- Hassa H. İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları, 1. Baskı. Eskişehir, 2003:127-65.
- Hatiboğlu Y. Toluidin mavisi, anilin mavisi ve sperm kromatin dispersiyon testleri ile sperm DNA hasar oranlarının kıyaslanması. İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2014 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vildan Karpuz).
- <http://www.embriyologferhatcengiz.com/sperm-hazirlama-yontemleri/> (10 Nisan 2019).
- <http://doctormuratbas.blogspot.com/2014/05/prp-hakinda-hersey.html/> (10.06.2019)
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sperm+chromatin+structure+and+platelet+rich+plasma> (13.06.2019).

- Işık S. İntra uterin inseminasyon (IUI) hastalarında, sperm DNA statüsünün gebelik sonuçları ile değerlendirilmesi. Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, Yüksek Lisans, Edirne, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Turan Karaca).
- İpek G. Serumda ve seminal sıvıda bakılan D vitamininin sperm hareketi ve morfolojisi üzerine etkisinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2016 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. G. Serdar Günalp) .
- İsak A.E. İnfertil hastaların semen, hormonal ve genetik parametrelerinin değerlendirilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 2018 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet Kayraldız).
- Javadova D. İnfertil erkeklerde, sperm mitokondriyal DNA mutasyonları ile sperm parametreleri ve genetik test sonuçları ilişkisi. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2008 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç.Dr. İlter Güney).
- Kadioğlu A, Kendırcı M, Aktan G, Yaman Ö, Çayan S. İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. WHO Laboratuvar El Kitabı. Türk Üroloji Derneği. ISBN: 978-975-00112, 2011; 4-5.
- Karamazak S. Vücut kitle indeksinin non-obstrüktif azospermi nedeniyle mikroskobik testiküler sperm ekstraksiyonu uygulanan hastalarda sperm bulunması üzerine etkisinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İzmir, 2014 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Bülent Semerci).
- Kaya S. Azoospermik hastalarda testiküler spermatozoa kullanılarak yapılan ıcsı uygulama sonuçlarının over yanıtıyla ilişkisi. İstanbul Yeniüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2017 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ersi Kalfoglu- Doç. Dr. Meriç Karacan).
- Kayan B.Ö. İnfertil erkeklerin sperm örneklerinde C-MET (hepatosit büyüme faktörü / skatter faktörü reseptörü) ve HGF (hepatosit büyüme faktörü) etkilerinin değerlendirilmesi. İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2016 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Faruk Abike).
- Kızılkın Y. Non-obstrüktif azospermili hastalarda mikroskobik testiküler sperm ekstraksiyonu operasyonu öncesi sperm bulma ihtimalini etkileyen parametreler. Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2015 (Tez Danışmanı: Doç.Dr. Tahsin Turunç).
- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; 531-64.
- Koç E. Nonobstrüktif azospermili hastalarda mikrocerrahi testiküler sperm ekstraksiyonu yöntemi ile sperm elde etmeyi etkileyen faktörler. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özkan Polat).
- Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2011;19:516–27.
- Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. J Periodontol. 2002;73:198-205.
- Lipovac M, Bodner F, Schütz A, Kurz H, Riedl C, Mair J, Imhof M. increased hyaluronan acid binding ability of spermatozoa indicating a better maturity, morphology, and higher DNA integrity after micronutrient supplementation. Emj Urol. 2014; 1: 60-5.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1998;69: 532-528.
- Matz EL, Pearlman AM, Terlecki RP. Safety and feasibility of platelet rich fibrin matrix injections for treatment of common urologic conditions. Investigative and Clinical Urology, 2018; 59: 65-61.
- Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment – historical prespectives and current opinions. Journal Of Andrology, 2001; 22: 192-205.

- Moshfeghi E. Semen antioksidan kapasitesi, sperm DNA hasarı ve sperm mitokondrial DNA mutasyon analiz yöntemleri optimizasyonu. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2018 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tülin Arasoğlu).
- Mutlu E. Erişkin erkek sıçanlarda doksorubisin ile oluşturulan testis hasarı üzerine l-karnitinin etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 2013 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Varol Şahintürk).
- Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2011;105 (Suppl 1):S33.
- Oğuz Y. Sperm hazırlama yöntemi olarak "swim-up ve gradient" tekniklerinin DNA fragmentasyonuna etkilerinin karşılaştırılması prospektif çalışma. Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2013 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet Erdem).
- Ok E. Asthenozoospermia olgularında semen analizi ve sperm defektlerinin faz kontrast mikroskobu ile ortaya konması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, 2005 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Doğan Özyurt).
- Osaloğlu M.A. EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) metodunu kullanarak ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) ile oositin spermle uygun fertilizasyon zamanının araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, 2013 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ülker Cankurt).
- Ökten S.B. İntrauterin inseminasyon uygulanan infertil hastalarda spermiogram, hormon profili, endometrial kalınlık ve diğer faktörlerin gebelik oranına etkisi. Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Edirne, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Koray Elter).
- Önel T. İnsan Sperm kriyoprezervasyonunun sperm motilitesi ve deoksiribonükleik asit (DNA) fragmentasyonuna etkisinin leptin molekülü ile ilişkisi. İstanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2016 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Şule Ayla).
- Özdiler E. Aydos K. Klinik Androloji. 1. Baskı. Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi: 2000; 253-84.
- Özkoçer S.E. İzumo1 proteininin sperm değerlendirme parametreleriyle ilişkisinin fertilite statüsüne göre incelenmesi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çiğdem Elmas).
- Öztürk İ. Trombositten zengin plazmanın etkinliğinde donörün, trombosit sayısının ve konsantrasyonun öneminin fibroblast hücre kültürü üzerinde incelenmesi. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Bolu, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Metin Görgü).
- Potts R, Newbury C, Smith G, et al. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999; 423: 103-11.
- Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001;12:261-73.
- 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; 286-89.
- Sağlam İ. Trombositten zengin plazma ve yağ dokusu kaynaklı stromal vasküler fraksiyonun flep yaşayabilirliği üzerine etkilerinin incelenmesi. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Bolu, 2012 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Furkan Erol Karabekmez).
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 428-32.
- Sancar C. Sperm DNA fragmentasyonu % 30 ve üzerinde olan hastaların I. ejakülat ve II. ejakülat sperm kullanımı sonrası embriyonik gelişim hızı kalitesi ve gebelik sonuçlarının karşılaştırılması. Ufuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Yüksek

- Lisans Tezi, Ankara, 2018 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Recai Pabuçcu).
- Satar DA, Gençdal D. Sperm değerlendirmesi. Arch Med RevJ. 2013; 22(4): 532-42.
- Satı G.L. İnsan sperminde kromozomal yapı anomalileri ile hücresel olgunlaşmanın ilişkisi. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Antalya, 2005 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ramazan Demir).
- Sawamura K, Ikeda T, Nagae M, et al. Characterization of in vivo effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres on degenerated intervertebral discs. Tissue Eng Part A. 2009;15:3719-27.
- Sezgin, H. ve Hocaoglu, Ç. İnfertilitenin psikiyatrik yönü. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry, 2014; 6(2):165-184
- Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. Free Radic Biol Med, 2000; 28: 529-36
- Song WH, Yi YJ, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P. The ART and science of sperm mitophagy. Autophagy, Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(36): E5261-70. p: 2510-11.
- Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. Int J Oral Maxillofac Implants. 2000;15:879-82.
- Sözen E. Astenozoospermili ve normospermili hastaların *in vitro* sperm parametreleri üzerine pentoksifilin doza ve uygulama süresine bağlı etkilerinin araştırılması, Sakarya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya, 2017 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elvan Özbek).
- Şahin E. Varikosel olgularında sperm dondurma-çözme işleminin (kriyoprezervasyon) zamana bağlı olarak sperm parametreleri, ince yapısı ve hücre ölümü üzerine etkileri. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2010 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şule Çetinel).
- Şahin H. İzole Teratozoospermili olgularında farklı sperm hazırlama tekniklerinin kromatin kondenzasyon defekti sonuçlarına etkisi. Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2016 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. İskender Sinan Özkavukcu).
- Şaylan A. Farklı semen örneklerindeki hyaluronik asidin swim-up tekniğinde kullanımı ve sperm parametrelerine etkisi. Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selçuk Duman).
- Şekerci CA, Tanidir Y, Sener TE, Sener G, Cevik O, Yarat A, ... & Akbal C. effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis. Journal of Pediatric Urology, 2017; 13(3), 317-e1.
- Şen E. Nonobstrüktif azospermisi olan infertil erkek hastalarda genetik analiz sonuçlarının değerlendirilmesi. Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2015 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tahsin Turunç).
- Tanrıöver D. Sperm konsantrasyonunun belirlenmesinde makler kamerası ve geliştirilmiş Neubauer hemositometresi ile yapılan sayımların tutarlılık düzeyleri. Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, 2017 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar Sunay).
- Tataru DA, Markova EV, Osadchuk LV, Sheina EV, Svetlakov AV. The optimal conditions of storage of spermatozoa for analysis of DNA fragmentation. Klin Lab Diagn. 2015 Apr;60(4):52-6.
- Tekden Kırgız, D. Açıklanamayan infertilite tanısı konmuş hastalarda koagülasyon parametrelerinin değerlendirilmesi. İstanbul Süleymaniye Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2015 (Tez Danışmanı: Op. Dr. Ali Galip Zebitay).
- Tosunoğlu E. İnfertil erkeklerin sperm örneklerinde DNA fragmentasyon oranlarının kromozom aneuploidileri ile ilişkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 2018 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sevilhan

Artan).

- Tuncel T. Normospermili kişilerde sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve sonrası spermatozoada annexin V testi ile apoptozisin değerlendirilmesi. Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2013 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selçuk Duman).
- Uğurlu B. Erkek faktörünün embriyo bölünme anormallikleri üzerindeki etkisinin zaman aralıklı embriyo görüntüleme yöntemi ile incelenmesi. Maltepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2017 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Cıncık).
- Uğurlu O. İzole teratozoospermi grubu hastalarda sperm dna fragmentasyonu ve maturasyonu sonuçlarının sperm morfoloji sonucu normal olan hasta grubu ile embriyo gelişim ve gebelik oranlarının karşılaştırılması. Ufuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Recai Pabuçcu).
- Utku B. Trombositten zengin plazmanın tedavi edici etkisini meloksikam ve diklofenak değiştirir mi? Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Spor Hekimliği Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2014 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mahmut Nedim Doral).
- Uzun F. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılan açıklanamayan infertil olgularda yumurta toplama günü endometrial kavitenin folikül sıvısı ile yıkanmasının gebelik oranları üzerine etkisi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Uzmanlık Tezi. İstanbul, 2017 (Tez Danışmanı: Başasistan Uz. Dr. Elif Tozkır).
- Ürgüplüoğlu B. İzole teratozoospermi grubu hasta sikluslarından elde edilen embriyolarda gözlenen sayısal anöploidi oranlarının ve embriyo gelişim skorlarının karşılaştırılmalı değerlendirilmesi, Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, İstanbul, 2016 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülay İrez).
- Üstüner M. Nonobstruktif azospermik ve klinik varikoseli olan hastalarda varikosektominin motil sperm eldesi ve spermatogenez üzerine etkileri. Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kocaeli, 2014 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali Gökalp).
- Valeriya Z, Olena K & Olena K. Platelet-rich plasma induces morphofunctional restoration of mice testes following doxorubomycine hydrochloride exposure. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 2014; 31(3): 183-87
- Wang SZ, Rui YF, Tan Q, Wang C. Enhancing intervertebral disc repair and regeneration through biology: platelet-rich plasma as an alternative strategy. *Arthritis Res. Ther.* 2013;15:220.
- Ward W, Coffey D. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569-74
- Wasterlain AS, Braun HJ, Dragoo JL. Contents and formulations of platelet rich plasma. In *Platelet Rich Plasma in Musculoskeletal Practice*. Springer, London; 2016.1–29.
- Wong A, Chuan SS, Patton WC, Jacobson JD, Corselli J. & Chan PJ. Addition of eosin to the aniline blue assay to enhance detection of immature sperm histones. *Fertility and sterility*, 2008; 90(5), 1999-2002.
- World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva: WHO Press, 2010.
- Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16(1):204.
- Yazıcı Yılmaz F. IVF tedavisine alınan ve GNRH analogu ile long protokol uygulanan kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sikluslarında rekombinant FSH'a suboptimal cevap verip, rekombinant LH eklenen hastaların IVF sonuçlarının değerlendirilmesi. Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 2011 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmmed Çolakoğlu).
- Yılmaz B. Kesikburun S. Plateletten zengin plazma uygulamaları. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, TSK Rehabilitasyon Merkezi*, Ankara, 2013;338-44
- Yiğit A. IUI olgularında sperm fonksiyon testlerinin gebeliği öngörmedeki değeri. *Yeni Yüzyıl*

- Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülay İrez).
- Yokuş A. Testiküler shear wave elastografinin sperm profilini değerlendirmedeki geçerliliği: infertilite şikayetli erkek popülasyondaki sperm analiz sonuçları ile testiküler arfı Elastografi bulgularının karşılaştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Van, 2015 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Alparslan Yavuz).
- Yüce F.Z. Sperm parametrelerinin intrauterin inseminasyon (IUI) başarısına etkisi. Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Sakarya, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nermin Akdemir).
- Zini A, Bielcki R, Phang D, Zenzen MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation, DNA fragmentation in fertile and infertile men. Fertil Steril, 2001; 75: 674-77

8. ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Konya/Seydişehir’de doğmuştur. İlk ve orta öğrenimini 2008 yılında Seydişehir İsmet Şen İlköğretim Okulu’nda tamamlamasından sonra Seydişehir Mahmut Esat Anadolu Lisesinde lise eğitimini 2012 yılında tamamlamıştır. 2016 yılında Bartın Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden onur derecesi ile mezun oldu. 2017 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

Tel: 05445183439

Mail: karakuş.gul357@gmail.com

9. EKLER

Ek 1:

Tarih:

Versiyon 2

BİLGİLENDİRİLMİŞ KAN GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

"Sayın gönüllü,

Necmettin Erbakan üniversitesi meram tıp fakültesi yardımcı üreme teknikleri ünitesinde yüksek lisans tezi amaçlı yürüttüğümüz "Trombositten Zengin Plazma (TZP) İle Muamele Edilmiş Semen Örneklerinde Oda Isısı (+23±2°C) Ve Soğuk Ortam Şartlarının (+4°C) Sperm Parametreleri ve Kromatin Yapısı Üzerine Etkilerinin 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 (kısırlık) sorunu olan hastalarda alternatif bir tedavi seçeneğinin olup olmadığını araştırmaktır. Gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Araştırmaya yaş aralığını 18-50 yaş aralığı olarak belirlediğimiz 20 kadar gönüllü alınacaktır. Araştırmanın çalışılma süresi 5 aydır.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz izniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 10 cc kadar kan almamız gerekmektedir. Alınan kandan trombositlen zengin plazma eldesi sağlanacaktır. Elde edilen trombositlen zengin plazma çalışmamızın yürütülmesinde sperm hazırlanması işleminde gerekli aşamalarda kullanılacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:

- 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz.
- 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Araştırmadan dolayı göreceğiniz olası bir zararda gerekli her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacaktır; bu konudaki tüm harcamalar da tarafımızdan karşılanacaktır.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir. Bu araştırmanın sonuçları bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırma yayınlandığı takdirde varsa kimlik bilgilerinizin gizliliği korunacaktır.

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.

Araştırmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından araştırmadan çıkarılmanız halinde, sizle ilgili veriler kullanılmayacaktır. Ancak veriler bir kez anonimleştikten sonra araştırmadan çekilmeniz mümkün olmayacaktır.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırmaya yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllü

Adı, soyadı:

Tel.

İmza

Katılımcı ile görüşen araştırmacı

Adı soyadı, unvanı:

Tel.

İmza:

BİLGİLENDİRİLMİŞ SEMEN GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

"Sayın gönüllü,

Necmettin Erbakan üniversitesi meram tıp fakültesi yardımcı üreme teknikleri ünitesinde yüksek lisans tezi amaçlı yürüttüğümüz "Trombositten Zengin Plazma (TZP) İle Muamele Edilmiş Semen Örneklerinde Oda Isısı (+23±2°C) Ve Soğuk Ortam Şartlarının (+4°C) Sperm Parametreleri ve Kromatin Yapısı Üzerine Etkilerinin 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 (kısırlık) sorunu olan hastalarda alternatif bir tedavi seçeneğinin olup olmadığını araştırmaktır. Gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılmanız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Araştırmaya 25 kadar gönüllü alınacaktır. Araştırmaya katılacak olan gönüllü grubu yaş aralığı 18-50 yaşları arasında olacaktır. Araştırmanın çalışılma süresi 5 aydır.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz izniniz doğrultusunda vermiş olduğumuz semen örneğinin kullanım dışı(atık) olacak kısmı gerçekleştirilecek araştırma çalışması için kullanılacaktır. Verdiğiniz örnek sperm hazırlama işlemlerinde kullanılan basit yıkama tekniğiyle onam formları alınan gönüllülerden alınan kan ile hazırlanmış TZP ve PBS ile muamele edilerek çeşitli aşamalardan geçirilecektir. Verdiğiniz örneğe en son aşamada anilin blue boyama yapılarak veri olarak elde edilen sonuç kaydedilecektir.

Gönüllü olmanız durumunda herhangi bir zarar görmeyeceğinizi düşünüyoruz ama araştırmadan dolayı göreceğiniz olası bir zararda gerekli her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacaktır; bu konudaki tüm harcamalar da tarafımızdan karşılanacaktır.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir, araştırma yayınlandığı takdirde varsa kimlik bilgilerinizin gizliliği korunacaktır.

Çalışmaya katıldıktan sonra herhangi bir parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu araştırmada yer almak tümüyle sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da başladıktan sonra herhangi bir aşamada onayınızı çekerek yarıda bırakabilirsiniz. Reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır.

Bu araştırmanın sonuçları bilimsel amaçlarla kullanılacaktır.

Araştırmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından araştırmadan çıkarılmanız halinde, sizle ilgili veriler kullanılmayacaktır. Ancak veriler bir kez anonimleştikten sonra araştırmadan çekilmeniz mümkün olmayacaktır.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllü

Adı, soyadı:

Tel.

İmza

Katılımcı ile görüşen araştırmacı

Adı soyadı, unvanı:

Tel.

İmza:

Ek 3:

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI	
Toplantı Sayısı:76	Toplantı Tarihi: 09 Kasım 2018
Karar Sayısı:2018/1562;Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ' nün "Trombositten Zengin Plazma (TZP) İle Muamele Edilmiş Semen Örneklerinde Oda Isısı (+23±2°C) Ve Soğuk Ortam Şartlarının (+4°C) Sperm Parametreleri ve Kromatin Yapısına Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 06.11.2018 tarihli dilekçesi ve ekleri görüldü, Gül KARAKUŞ' un yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ' nün sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir. Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir. Sorumlu Araştırmacı Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ Yardımcı araştırmacı: Gül KARAKUŞ	
ASLI GİBİDİR 09.11.2018 Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı	