

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HAFNİUM KLORÜR’UN NORMOSPERMİK VAKALARIN SPERM VİABİLİTE
VE MOTİLİTE PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Zülkar ÖZDEN

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2022

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HAFNİUM KLORÜR'UN NORMOSPERMİK VAKALARIN SPERM VİABİLİTE
VE MOTİLİTE PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Zülkar ÖZDEN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Tahsin Murad AKTAN

KONYA, 2022

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürem boyunca beraber olduğum saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. S. Serpil Kalkan, Prof. Dr. Aydan Özgörgülü, Doç. Dr. Gökhan Cüce, Öğretim Görevlisi Dr. Burcu Gültekin ve Dr. Öğretim Üyesi Gülsemin Çiçek'e,

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan, emek veren sayın hocalarım; Prof. Dr. Tahsin Murad Aktan ve Prof. Dr. Selçuk Duman'a,

Bu tezin hazırlanmasındaki değerli katkılarından dolayı tez danışman hocam Sn. Prof. Dr. Tahsin Murad Aktan'a ayrıca teşekkür ederim.

Birlikte uyum içerisinde çalıştığım, kendileri ile çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım; Uzm. Dr. Fatma Öz Bağcı, Uzm. Dr. Emine Utlu Özen, Dr. Mediha Gül Tol, Dr. Rabia Avcı ve Bio. Nihal Canbulat'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili annem, babam, ablam, değerli eşim Dr. Huriye Çelik Özden ve biricik oğlum Umut'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün desteği ile gerçekleştirilmiş ve Prof. Dr. Tahsin Murad Aktan gözetiminde hazırlanmış olup, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı'na bitirme tezi olarak sunulmuştur.

Dr. Zülkar ÖZDEN

ÖZET

HAFNIUM Klorür'UN NORMOSPERMİK VAKALARIN SPERM Viabilite VE Motilite Parametreleri Üzerine Etkisinin Araştırılması

Zülkar Özden, Tıpta Uzmanlık Tezi, Konya 2022

Hafnium alaşımları, biyo uyumlulukları ve yüksek korozyon direnci nedeniyle tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Sarkom tedavisinde kullanılmıştır. Cerrahi implantlarda osteojenik ve antimikrobiyal etkinlikleri gösterilmiştir. COVID-19'un tespiti için hafnium nanoparçacıklarına dayalı bir sensör bildirilmiştir. Kullanım alanları artmaya devam eden hafniumun literatür taramalarında hem insan hem de hayvan türleri üzerindeki sperm etkilerine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Semen örnekleri DSÖ 2010 kriterlerine göre analiz edilmiştir. 20 normospermik örnek çalışmaya dahil edildi. Yıkama ve santrifüj sonrası kontrol, hafnium klorür 2 mg/ml ve 4 mg/ml olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Tüm gruplar 20. ve 40. dakikalarda hareketlilik ve canlılık açısından değerlendirildi.

Çalışma grubunda sperm canlılık değerlerinin doz ve zaman arttıkça düştüğü saptandı ($p<0,001$). Sperm toplam hareketlilik ve ileri hareketlilik değerlerinin de doz ve zaman arttıkça anlamlı şekilde azaldığı saptandı ($p<0,001$).

Bu çalışmada hafnium klorürün sperm hareketliliği ve canlılığı üzerine olumsuz etkileri olduğu saptandı. Bu elementin kullanıldığı aletlerde potansiyel bir tehlike olduğu kanıtlanmıştır. Ülke düzenlemelerinin bu konuda hassasiyet göstermesi halk sağlığı açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Hafnium klorür, semen analizi, sperm motilite, sperm viabilite

NEÜ BAP Destek numarası: 201518028

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF HAFNIUM CHLORIDE ON SPERM VIABILITY AND MOTILITY EXAMINATION OF NORMOSPERMIC CASES

Zülkar Özden, Tıpta Uzmanlık Tezi, Konya 2022

Hafnium alloys are used in medical applications due to their biocompatibility and high corrosion resistance. Osteogenic and antimicrobial activities have been demonstrated in surgical implants. It has been used in the treatment of sarcoma. A sensor based on hafnium nanoparticles has been reported for the detection of COVID-19. In the literature review of hafnium, whose usage areas continue to increase, no study has been found on the effects of sperm on both human and animal species.

Semen samples were analyzed according to WHO 2010 criteria. Twenty normospermic specimens were included in the study. After washing and centrifugation, 3 groups were formed as control, hafnium chloride 2 mg/ml and 4 mg/ml. Motility and viability were checked in all groups at the 20th and 40th minutes.

In the study group, sperm viability values decreased as the dose and time increased ($p<0,001$). Sperm total motility and progressive motility values were also found to decrease significantly as the dose and time increased ($p<0,001$).

In this study, it was determined that hafnium chloride had negative effects on sperm motility and viability. It has been demonstrated that there is a potential danger in instruments containing this element. It is important for public health that country regulations show sensitivity in this regard.

Keywords: Hafnium chloride, semen analysis, sperm motility, sperm viability

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMA VE SİMGELER	ix
TABLolar	x
ŞEKİLLER	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 HAFNİUM	2
2.1.1 Hafnium Tanımı ve Özellikleri	2
2.1.2 Hafnium Kaynakları.....	2
2.1.3 Hafnium Üretimi	2
2.1.4 Hafnium Alaşımları (Bileşikleri)	3
2.1.4.1 Hafnium Klorür	3
2.1.4.2 Hafnium Oksiklorür	4
2.1.5 Hafnium ve Alaşımlarının Kullanım Alanları	4
2.2 ERKEK GENİTAL SİSTEMİ.....	6
2.2.1 Genital Sistemin Gelişimi	6
2.2.1.1 Gonadlar.....	6
2.2.1.2 Testisler	7
2.2.1.3 Genital Kanallar	8
2.2.1.4 Dış Genitaller.....	8
2.2.2 Erkek Genital Sistem Anatomisi ve Histolojisi	9
2.2.2.1 Testisler	9
2.2.2.2 Seminifer Tübüller	10
2.2.2.3 Tubuli Recti	13
2.2.2.4 Rete Testis	14

2.2.2.5 Duktuli Efferentes	14
2.2.2.6 Duktus Epididimis.....	14
2.2.2.7 Duktus Deferens	14
2.2.2.8 Duktus Ejakulatoryus.....	14
2.2.2.9 Seminal Veziküller.....	15
2.2.2.10 Prostat	15
2.2.2.11 Bulboüretal Bezler (Cowper Bezi)	16
2.2.3 Spermatogenez, Spermiyogenez	16
2.2.4 Olgun (Matür) Spermin Yapısı.....	19
2.2.5 Semen.....	20
2.3 İNFERTİLİTE	21
2.4 SEMEN ANALİZİ	22
2.4.1 Makroskobik Analiz.....	23
2.4.2 Mikroskobik Analiz	24
2.5 SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİ	26
2.5.1 Yıkama Yöntemi	26
2.5.2 Direkt Swim-Up (Yüzdürme) Yöntemi	27
2.5.3 Dansite Gradient Yöntemi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1 Hafnium Klorür'ün Hazırlanması	28
3.2 Semen Örneklerinin Toplanması.....	28
3.3 Semen Örneklerinin Hazırlanması	28
3.4 Hareketlilik Tayini	29
3.5 Canlılık Tayini.....	29
3.6 pH Ölçümü	29
3.7 İstatistiksel Analiz.....	29
4. BULGULAR	30
4.1 Hareketlilik ve Canlılığın Ortalama Değerleri	30
4.2 Canlılık Sonuçları.....	30
4.3 Hareketlilik Sonuçları	35
4.3.1 Hareketsizlik Değerleri	35
4.3.2 Yerinde Hareketlilik Değerleri	36

4.3.3 İleri Hareketlilik Değerleri	38
4.3.4 Toplam Hareketlilik Değerleri	40
4.4 pH Ölçümü	43
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ.....	47
7. KAYNAKLAR.....	49
8. EKLER	58

KISALTMA VE SİMGELER

AMH : Anti Müllerian Hormon

CBAVD: Konjenital Bilateral Vas Deferens Yokluğu

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

g : Santrifüje yerleştirilen örneği bileşenlerine ayıran fiziksel etki

Hf : Hafnium

HfCl₄ : Hafnium Klorür

IVF : In vitro Fertilizasyon

NaCl : Sodyum Klorür

ort : Ortalama

p : İstatistiksel anlamlılık

pH : Hidrojen kuvveti

SS : Standart sapma

SE : Standart hata

TDF : Testis Belirleyici Faktör

TEM : Geçirimli Elektron Mikroskobu

YÜT : Yardımcı Üreme Teknikleri

°C : Santigrat derece

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

cm : Santimetre

CO₂ : Karbondioksit

dk : Dakika

gr : Gram

kg : Kilogram

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm : Milimetre

TABLÖLAR

Tablo 1: Hafnium alaşımları

Tablo 2: Erkek infertilitesi sebepleri

Tablo 3: DSÖ 2010 kriterlerine göre en düşük semen analiz referans değerleri

Tablo 4: Hareketlilik ve canlılığın ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 5: Canlılık açısından doz karşılaştırmaları

Tablo 6: Canlılık açısından zaman karşılaştırmaları

Tablo 7: Hareketsizliğin doz etkileşimi

Tablo 8: Hareketsizliğin zaman etkileşimi

Tablo 9: Yerde hareketliliğin doz etkileşimi

Tablo 10: Yerde hareketliliğin zaman etkileşimi

Tablo 11: İleri hareketliliğin doz etkileşimi

Tablo 12: İleri hareketliliğin zaman etkileşimi

Tablo 13: Toplam hareketliliğin doz etkileşimi

Tablo 14: Toplam hareketliliğin zaman etkileşimi

ŞEKİLLER

Şekil 1: İnsan testisinin sagital kesiti

Şekil 2: Seminifer tübül enine kesiti

Şekil 3: Normal gametogenezis

Şekil 4: Canlılığın kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi

Şekil 5: Canlılığın kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişiminin DSÖ 2010 kriterlerine göre gösterilmesi

Şekil 6: Kontrol grubu 20. dk

Şekil 7: 4 mg/ml HfCl₄ grubu 20. dk

Şekil 8: 4 mg/ml HfCl₄ grubu 40. dk

Şekil 9: Hareketsizliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi

Şekil 10: Yerde hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi

Şekil 11: İleri hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi

Şekil 12: İleri hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişiminin DSÖ 2010 kriterlerine göre gösterilmesi

Şekil 13: Toplam hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi

Şekil 14: Toplam hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişiminin DSÖ 2010 kriterlerine göre gösterilmesi

Şekil 15: Kontrol grubu Makler görüntüsü

Şekil 16: 4 mg/ml HfCl₄ grubu Makler görüntüsü

Şekil 17: Manuel pH ölçümü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hafnium (Hf), atom numarası 72, atom ağırlığı 178,6 olan bir elementtir. Alaşımları biyo uyumlulukları ve yüksek korozyon direnci nedeniyle tıbbi uygulamalarda kullanılmıştır (Davidson, 1999). Bir çalışmada izotopik olmayan metanolik hafnium klorür ve sulu kurşun çözeltisinin, mantar ve bitki hücre yapılarının Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) kontrastlarını arttırmak için mükemmel bir yeni elektron boyası olduğu gösterilmiştir (Ikeda ve ark., 2011). Hafnium nanoparçacığı sarkom tedavisinde kullanılmıştır (Hoffmann ve ark., 2021). Cerrahi implantlar üzerine bir kaplama olarak antimikrobiyal özellikleri açısından olumlu bulunmuşlardır (Abdullin ve ark., 2004). İn vivo çalışmalarda hafniumun biyo uyumlu ve osteojenik etkisi gösterilmiştir (Matsuno ve ark., 2001). Literatür taramalarında hafniumun hem insan hem de hayvan türleri üzerindeki sperm etkilerine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Günümüzde infertilite problemi yaşayan çiftlerin sayısı giderek artmaktadır. İnfertilite olgularının yüzde 40'ını erkek faktörü oluşturmaktadır (Satar, 2013). Erkek infertilitesine anatomik veya genetik anormallikler, sistemik veya nörolojik hastalıklar, enfeksiyonlar, travma, iyatrojenik hasar, gonadotoksinler ve sperm antikorlarının gelişmesini kapsayan çok çeşitli durumlar neden olabilir. Erkek infertilite vakalarının %30-40'ında hiçbir neden tanımlanmamıştır (idiyopatik erkek infertilitesi).

Kurşun, kadmiyum, arsenik, baryum, cıva ve uranyum gibi metaller, insanlarda giderek daha fazla tespit edilen esansiyel olmayan ksenobiyotiklerdir (NCEH, 2005). Bu elementlerin kanda ölçülmesi yerine seminal plazma içerisindeki ölçümlerinin yapılması erkek üreme sisteminin maruziyetini daha iyi yansıtmaktadır (Oldereid ve ark., 1993; Mendiola ve ark., 2011).

Semen kalitesi erkek üreme sağlığının en değerli göstergelerinden biridir ve semen analizi androlojide kritik bir rol oynamaktadır (Kan ve ark., 2014).

Hafnium klorür'un spermatozoa üzerine etkilerini rapor eden bir çalışmaya literatür taramasında rastlanmamıştır. Çalışmada hafnium klorür'ün normospermik vakaların sperm viabilite ve motilite parametreleri üzerine etkisini saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 HAFNİUM

2.1.1 Hafnium Tanımı ve Özellikleri

Hafnium, atom numarası 72, atom ağırlığı 178,6 olan geçiş elementidir. Titanyum ve zirkonyum ile birlikte periyodik tablonun IVB grubunda bulunmaktadır. Doğada zirkonyum ile birlikte bulunur. Zirkonyumla birbirlerine çok yakın kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler (Bingham ve ark., 2012).

Zirkonyum 1789'da keşfedilmesine rağmen Hafnium 1923'te tanımlanmıştır. Hafnium adı, keşfin yapıldığı Kopenhag'ın Latince adı olan Hafnia'dan gelmektedir. Bohr atom teorisi ve Moseley kanunlarına göre 4+ değerliklidir (Coster ve ark., 1923).

Hafnium, $2227 \pm 20^{\circ}\text{C}$ 'de eriyen gri, sünek bir metaldir. Suda çözünmez, ancak hidroflorik asitte (muhtemelen reaksiyonla) çözünür.

Hafnium, hidroflorik asitte kolayca çözünür, konsantre sülfürik asit ile etkileşime girer. Nitrik asit, seyreltik hidroklorik ve sülfürik asitler ile alkalilerden etkilenmez.

Eser miktarda florür varsa, tüm mineral asitler hafniumla etkileşime girer (Bingham ve ark., 2012).

2.1.2 Hafnium Kaynakları

Hafnium, yerkabuğunda az bulunan elementlerden biridir. Zirkonyum içeren mineraller genellikle %1-4 oranında hafnium içerirler. Zirkonyum içeren minerallerden zirkon hafnium eldesinde birinci ticari kaynaktır. Ardından Baddeleyite gelmektedir. Fakat çok nadir bulunmaktadır. Baddeleyite Güney Afrika ve Rusya'dan temin edilmektedir. Zirkon plütonik ve volkanik kayaların bütün türlerinde bir yapı taşı olarak bulunur. Okyanus sahillerinde sık rastlanmaktadır. Avustralya en fazla zirkon ihraç eden ülkedir (Ramazanoğlu, 2002; Nielsen, 2013).

2.1.3 Hafnium Üretimi

Başlangıçta, Von Hevesey ve Jantzen, çift potasyum veya amonyum florürlerin tekrar tekrar kristalleştirilmesi yoluyla hafniumu zirkonyumdan ayırmıştır. Van Arkel ve deBoer, tetraiyodür buharını ısıtılmış bir tungsten filamentinden geçirerek metalik hafnium hazırlamışlardır. Hurst, basınçlı bir iyon değişim kolonu kullanılarak ayırmıştır. Üretilen

hemen hemen tüm hafnium metalleri, tetraklorürün Kroll Prosesi olarak adlandırılan sodyum veya magnezyum ile indirgenmesiyle yapılır (Hurst, 1981; Haynes, 2014).

Hafnium tetraklorür, hafnium içeren organometalik bileşiklerin hazırlanmasında kullanılan başlangıç materyalidir (Cardin ve ark., 1986).

2.1.4 Hafnium Alaşımları (Bileşikleri)

Hafnium bileşiklerinin çoğu, hafnium metal üretiminde ara ürünler olmaları dışında az ticari değer görmüşlerdir. Bununla birlikte hafnium oksit, hafnium karbür ve hafnium nitrid oldukça refrakterdir (Nielsen, 2013).

Compound	CAS Number	Molecular Formula	Molecular Weight	Boiling Point (°C)	Melting Point (°C)	Specific Gravity	Solubility in Water (68°F)	Reference
Hafnium	[7440-58-6]	Hf	178.49	4603	2233	13.31	Insoluble	^a
Hafnium beryllide		HfBe ₁₃			1595	3.93		^a
Hafnium beryllide		HfBe ₁₇			<1750	4.78		^a
Hafnium diboride	[12007-23-7]	HfB ₂	200.11		3100	10.5		^a
Hafnium boride	[12228-27-2]	HfB	189.3		Dec. at 210			^b
Hafnium dodecaboride	[32342-52-2]							^a
Hafnium bromide, hafnium tetrabromide	[13777-22-5]	HfBr ₄	498.11	323 ^c	424 ^d	4.90		^a
Hafnium carbide	[12069-85-1]	HfC	190.50		≈3000	12.2		^a
Hafnium chloride	[13499-05-3]	HfCl ₄	320.30	317 ^c	432 ^d		Reacts with water	^a
Hafnium fluoride, hafnium tetrafluoride	[13709-52-9]	HfF ₄	254.48	970 ^e	> 970	7.1		^a
Hafnium hydride	[12770-26-2]	HfH ₂	180.51			11.4		^a
Hafnium iodide, hafnium tetraiodide	[13777-23-6]	HfI ₄	686.11	394 ^c	449 ^d	5.6		^a
Hafnium nitride	[25817-87-2]	HfN	192.50		3305	13.8		^a
Hafnium orthosilicate	[13870-13-8]	HfSiO ₄	270.57			7.0		^a
Hafnium oxide	[12055-23-1]	HfO ₂	210.49		2774	9.68	Insoluble	^a
Hafnium oxychloride octahydrate	[14456-34-9]	HfOCl ₂ ·8H ₂ O	409.52		Decomposes		Soluble	^a
Hafnium phosphide	[12325-59-6]	HfP	209.46			9.78		^a
Hafnium selenide	[12162-21-9]	HfSe ₂	336.41			7.46		^a
Hafnium silicide	[12401-56-8]	HfSi ₂	234.66		≈1700	7.6		^a
Hafnium sulfate	[15823-43-5]	Hf(SO ₄) ₂	370.62		Decomposes > 500			^a
Hafnium sulfide	[18855-94-2]	HfS ₂	242.62			6.03		^a

^aAdapted from *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 78th ed., Boca Raton, FL, 1997–1998.

^bAdapted from *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 67th ed., Boca Raton, FL, 1986–1987.

^cSublimation point.

^dTriple point.

Tablo 1: Hafnium alaşımları (Nielsen, 2013)

2.1.4.1 Hafnium Klorür

Moleküler formülü HfCl₄, moleküler ağırlığı 320,3 olan 250°C’de uçucu hale gelen beyaz, monoklinik kristal bir katıdır. “Hafnium Tetraklorür” ve “Hafnium Klorid” olarak da isimlendirilmektedir. Su ile reaksiyona girerek hafnium oksiklorür ve hidrojen klorür (hidroklorik asit) oluşturur. Ayrıca hemen hemen tüm oksijen içeren organik bileşiklerle ve erimiş alkali halojenürlerle reaksiyona girerek ilave bileşikler oluşturur.

Bu ilave bileşikler daha yüksek sıcaklıklarda ayrışır. Hafnium klorür, hafnium metali ile reaksiyona sokularak veya sıvı alüminyum klorür içinde alüminyum metal ile reaksiyona sokularak daha düşük klorürlere indirgenebilir.

Hafnium tetraklorür;

- Klorun 317°C’de hafniumla reaksiyona sokulmasıyla,

- Hafnium oksit ve karbonun 700°C'nin üzerinde karışımıyla,
- 450°C'nin üzerinde karbon tetraklorürün hafnium oksitle reaksiyona sokulmasıyla yapılır.

2.1.4.2 Hafnium Oksiklorür

Moleküler ağırlığı 409,52'dir. "Hafnium Oksiklorid Oktahidrat" olarak da isimlendirilmektedir. Hafnium tetraklorür suyla reaksiyona girdiğinde veya sulu hafnium oksidi hidroklorik asit içinde çözerek beyaz tetragonal kristaller olarak oluşur (Bingham ve ark., 2012).

2.1.5 Hafnium ve Alaşımlarının Kullanım Alanları

Hafnium, jet uçak motorlarının yanma bölgesini takip eden en sıcak aşamalarda dökme kanatlar ve türbin kanatları için kullanılan süper alaşımdır. Termal nötron kesiti nedeniyle (zirkonyumun yaklaşık 600 katıdır) ve ısıyı emip iki kat daha hızlı bırakabildiği için termal nükleer reaktörlerde koruyucu malzeme ve kontrol çubukları olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Hafnium ayrıca mükemmel sıcak su (450°C) korozyon direnci, iyi süneklik ve işlenebilirlik ve geniş nötron emme kesiti nedeniyle basınçlı su reaktörlerindeki kontrol çubuklarında birçok donanma gemisinde güç ünitelerinde kullanılmaktadır (Bingham ve ark., 2012).

Hafnium, uzay teknolojisinde ve jet motorlarında da yapı malzemesi olarak kullanılmaktadır. Nötron absorpsiyon yetenekleri nedeniyle, hafnium alaşımları, nükleer yakıt çubukları için ayırıcı levhalar olarak kullanılır. Aynı zamanda, yüksek sıcaklıkta çekme ve sürtünme mukavemetini geliştirmek için de kullanılmaktadır (Venugoparl, 1978; Bingham ve ark., 2012).

Hafnium, yüksek nötron absorpsiyonu ve yüksek korozyon direnci nedeniyle nükleer reaktörlerin kontrol ve güvenlik mekanizmalarında da kullanılır (Cramer, 2005).

Hafnium alaşımları biyo uyumlulukları ve yüksek korozyon direnci nedeniyle tıbbi implantlara uygun olduğu gösterilmiştir (Davidson, 1999).

Bir çalışmada $HfCl_4$ ve sulu kurşun çözeltisinin, mantar ve bitki hücre yapılarının TEM kontrastlarını arttırmak için mükemmel bir yeni elektron boyası olduğu gösterilmiştir (Ikeda ve ark., 2011).

Tıbbi implant ve aletler için hafnium nitrür bazlı kaplamaların patojenik mikroflorayı inhibe ettiği saptanmıştır (Abdullin ve ark., 2004).

İn vivo çalışmalarda hafniumun biyo uyumlu ve osteojenik etkisi gösterilmiştir (Matsuno ve ark., 2001; Mohammadi ve ark., 2001).

Hafnium nanoparçacığının (NBTXR3) intratümoral enjeksiyonu sonucunda kanser hücreleri (yumuşak doku sarkomu, ağız yassı hücreli karsinomu, kolorektal kanser) tarafından alındığı ve radyoterapi tedavisi boyunca tümörlerin içinde kalarak kanser hücrelerini yok etmede ve tümör büyümesini kontrol etmede tek başına radyoterapiden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Radyoterapi ile birlikte solid kanserleri tedavi etmede başarılı bulunmuştur (Maggiorella ve ark., 2012; Marill ve ark., 2014-2019; Bonvolat ve ark., 2017-2019; Zhang ve ark., 2020-2021; Hoffmann ve ark., 2021).

Entegre devrelerin üretiminde yüksek k dielektrikler (yalıtkanlar) olarak yüksek elektron hareketliliğinin korunmasında hafniumun silikat katmanlar arasında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Pignedoli, 2007).

Hafnium oksit elektrik sensörlerinde yüksek hassasiyet sağlamakta, kimyasal ve termodinamik kararlılığı da onu çok dayanıklı ve uzun ömürlü bir malzeme yaptığından dolayı da hafnium oksit sensörler silikon oksit sensörlerine üstünlük göstermiştir. Tıbbi teşhis ve gıda analizinde kullanılabileceği vurgulanmıştır (Ortiz ve ark., 2018).

Hafnium oksitli mikro iğneler transdermal ilaç uygulamalarında kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2018).

Hafnium klorid mikroflaman boyası olarak kullanılmıştır (Heuser, 1980; Hatae, 1984).

Dental implantlarda zirkonyum kaplama dayanıklılık ve biyo uyumluluklarından dolayı son yıllarda tercih edilmeye başlanmıştır. Yapılan araştırmada diş kaplamalarındaki zirkonyumun içinde %2 oranında hafnium varlığı tespit edilmiştir (Vaquero ve ark., 2012).

COVID-19'un tespiti için hafnium nanoparçacıklara dayalı bir sensör rapor edilmiştir. 100 adet COVID (+) örnekte yüksek duyarlılık ve %100 özgüllük göstermiştir (Alafeef ve ark., 2021).

2.2 ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Erkek genital sistemi bir çift gonad (testisler), genital boşaltım kanalları, aksesuar bezler ve penisten oluşur. Genital boşaltım kanalları tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, epididimis, duktus deferens ve duktus ejakülatoryusu içerir. Aksesuar bezler ise prostat, seminal vezikül ve bulboüretral bezlerdir (Ross, 2017).

Erkek üreme sistemi, spermatozoa oluşumunda, erkek cinsiyet hormonlarının salgılanmasında ve erkek gametlerin dişi üreme sistemine iletilmesinde işlev görür (Gartner, 2014).

2.2.1 Genital Sistemin Gelişimi

Genetik cinsiyet, fertilizasyon sırasında ovumu dölleyen sperm çeşidi ile (X veya Y) belirleniyorsa da testisler gelişimin yedinci haftasına kadar oluşmaz. Y kromozomunun kısa kolunun cinsiyet belirleyici bölgesindeki SRY geni tarafından kodlanan testis belirleyici faktör (TDF) testiküler farklılaşmayı sağlar (Ross, 2017).

2.2.1.1 Gonadlar

Gonadlar seks hücrelerini üretirler ve üç kaynaktan köken alırlar.

- Posterior abdominal duvarın mezodermal epiteli
- Altındaki mezankimal doku
- Primordiyal germ hücreleri

Genital sistemin erken dönemi her iki cinsiyette de birbirine benzer. Bu nedenle genital sistemin gelişiminin erken dönemi ‘seksüel gelişmenin farklanmamış safhası’ olarak adlandırılır (Young, 2000).

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde mezotelyal bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitel ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile medialde gonadal kabarıklık oluşur. Epitelyal kordonlar parmak şeklinde altındaki mezenkim içine doğru büyürler. Bu aşamada farklanmamış gonad dışta korteks içte medulladan oluşur (Moore, 2016).

Eğer embriyo XX seks kromozomuna sahipse farklanmamış gonadın korteksi over yönünde değişim gösterir ve medullası geriler. XY seks kromozomunu içeriyorsa medulla testise farklanır, korteks geriler (Moore, 2016).

4. hafta başında primordiyal germ hücreleri vitellus kesesi (yolk kesesi) duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyo katlanmaları sırasında vitellus kesesinin dorsali embriyoya dahil olur ve primordial germ hücreleri gonadal kabartılara göç ederler. Primordiyal germ hücreleri 6. hafta sırasında altındaki mezenkim içerisine girerler ve gonadal kordonlara dahil olurlar (Sadler, 2005; Moore, 2016).

2.2.1.2 Testisler

Testis belirleyici faktör etkisi ile gonadal kordonlar, seminifer kordonlara farklılaşır. Medulla derinlerine uzayan kordonlar burada birbirleriyle anastomoz yaparak rete testisi oluştururlar. Testiküler gelişim için karakteristik olan tunika albugineanın gelişimiyle gonadal kordonların (seminiferöz kordonlar) yüzey epiteli olan bağlantıları kaybolur. Testis genişleyerek mezonefrozdaki ayrılarak mezorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılaşır (Moore, 2016).

Seminiferöz tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenkim ile ayrılmışlardır. 8. haftayla birlikte Leydig hücreleri, mezonefrik kanalların ve dış genital yolların erkeklik yönünden farklılaşmasını sağlayan testosteron ve androsteronu salgılamaya başlar (Sadler, 2005).

8-12 haftalık periyotta en yüksek miktarına ulaşan insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu Leydig hücrelerini stimüle ederek testesteron salınımını sağlar. Sertoli hücreleri, antimüllerian hormon (AMH) salgılar. AMH salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra seviyesi azalır. AMH, müllerian kanallarının (paramezonefrik) gelişmesini baskılar (Şeftalioğlu, 2003).

Seminiferöz tübüllerde puberteden itibaren lümen gelişir. Duvarında testisin yüzey epitelinden gelişen destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve primordiyal germ hücrelerinden farklılaşan primordiyal sperm hücreleri olan spermatogonialar bulunmaktadır (Şeftalioğlu, 2003).

Testisin yüzey epiteli düzleşerek mezoteli oluşturur. Rete testis, duktuli efferentesi oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile duktuli efferentesler bağlanırlar (Sadler, 2005; Moore, 2016).

2.2.1.3 Genital Kanallar

Gelişimin 5-6. haftalarında hem erkek hem dişi embriyoda mezonefrik (Wolf kanalı) ve paramezonefrik (Müller kanalı) kanallar olmak üzere iki çift genital kanal vardır. Mezonefrik kanallar erkek üreme sisteminin gelişiminde rol oynarken, paramezonefrik kanallar dişi üreme sistemi gelişiminde rol oynamaktadır (Şeftalioğlu, 2003; Sadler, 2005).

Testislerde Sertoli hücrelerinden salgılanan AMH paramezonefrik kanalları geriletir. 8. haftada testosteron etkisiyle her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı bir hal alır ve epididimise farklanır. Mezonefroz dejenere olunca duktuli efferentes oluşur ve bunlarda duktus epididimise açılırlar. Mezonefrik kanal epididimis distalinde kalın kaslı hale gelir ve duktus deferens oluşur (Sadler, 2005; Moore, 2016).

Mezonefrik kanalların kaudal uçlarının lateralinden dışa doğru seminal veziküller gelişir. Spermlerin beslenmesini sağlayan sekresyon yaparlar. Seminal veziküllerin kanalı ile üretra arasında kalan mezonefrik kanal bölümü ejakülatuvar duktus olarak gelişmektedir (Moore, 2016).

Üretranın prostatik parçasından meydana gelen çok sayıda endoderm çıkıntı, etraftaki mezenşimin içine doğru büyür. Prostat epiteli bu endoderm hücrelerinden gelişirken, epitel hücreleriyle ilişkili mezenşimden stroma ve düz kaslar oluşur (Sadler, 2005; Moore 2016).

Bezelye şeklindeki bulboüretral bezler ise üretranın spongiyoz parçasından, çift halde, dışarıya doğru büyüyen hücrelerden gelişirler. Düz kas hücreleri ve stroma bölgedeki mezenşimden köken alır (Sadler, 2005; Moore, 2016).

2.2.1.4 Dış Genitaller

Dış genitallerin gelişimi 7. hafta sonuna kadar her iki cinsten birbirine benzemektedir. Cinsiyet farklılaşması 9. haftada ortaya çıkar fakat 12. haftaya kadar farklılaşma tam değildir. Dördüncü haftanın başında her iki cinsten kloakal membranın kranial ucunda mezenkim proliferasyonu sonucunda genital tüberkül gelişir (Moore, 2016).

Kısa süre içerisinde kloakal membranın her iki tarafından labioskrotal şişkinlikler ve ürogenital katlantılar gelişir. Genital tüberkül uzayarak primordiyal fallus oluşur. Ürogenital membran, ürogenital katlantılara bağlanmış, median bir oluk olan ürogenital oluğun tabanında yer alır (Moore, 2016).

6. haftada kloakal membran ürogenital ve anal membranlara ayrılır. Kloakal kıvrımlar, önde üretral kıvrım arkada anal kıvrıma bölünür. Bu sırada üretral kıvrımların her iki yanında erkeklerde skrotal şişlikleri, kızlarda ise labia majörleri oluşturacak olan genital şişlikler ortaya çıkar. Yine de fetüsün cinsiyetinin anlaşılması 6. haftanın sonundan önce mümkün değildir (Aksoy, 2008).

Erkekte dış genital organların gelişimi, fetal testislerden salgılanan testosteron hormonunun etkisi altındadır. Fallus adını almış olan genital tüberkülün uzamasıyla penis oluşur. Bu uzama esnasında fallus üretral kıvrımları öne doğru çekerek ürogenital oluğun lateral duvarının oluşmasını sağlar. Ürogenital oluk, üretral plağın endodermal hücreleri ile döşenir. Ürogenital katlantılar, penisin ventral yüzeyi boyunca birbirleriyle birleşerek spongioz üretrayı meydana getirirler. Penil rafe, yüzey ektodermin penisin median hattında birleşmesiyle oluşur ve spongioz üretra penis içerisinde kalır. Glans penisin ucundan içe doğru büyüyen ektodermal kökenli kordon ile spongioz üretra birleşir ve kanalize olarak spongioz üretraya bağlanır. Böylece eksternal üretral meatus oluşur. Fallus mezenkiminden korpus spongiozum ve korpora kavernosa gelişir. Labioskrotal şişkinlikler birbirlerine doğru büyüyüp birleşerek skrotumu oluştururlar (Moore, 2016).

2.2.2 Erkek Genital Sistem Anatomisi ve Histolojisi

Erkek genital organları dış ve iç genital organlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Dış genital organlar diafragma ürogenitale ile arkus pubikusun altında penis, üretra ve skrotumdan oluşur. İç genital organlar ise kısmen pelvis boşluğunda kısmen de perineumda bulunan testis, epididimis, ductus deferens, prostat bezi, vesiküla seminalis ve bulboüretral bezdir (Arıncı, 2005).

2.2.2.1 Testisler

Testisler skrotum içerisinde funikulus spermatikus'a asılı olarak durmaktadır. Yetişkinlerde ortalama 3,8 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında, 10,5-14 gram ağırlığında ve 30 ml hacme sahiptirler (Hricak, 1983; Leung, 1984).

Sol spermatik kordun daha uzun olması sebebiyle sol testis sağ testisten daha aşağıda bulunur (Liguori ve ark., 2012).

Spermatozoa ve testosteron hormonu yapımından sorumludurlar. Testisin tunika albuginea tabakasının genişleme özelliği olmadığından bası ile fonksiyonlarını yitirir. Aşırı düzeydeki ısı farklılıklarından da etkilenirler (Ozan 2005).

Spermatogenez vücut ısısında gerçekleşmez. Pampiniform venöz pleksus arterial kandan ısı çekerek, skrotumdan buharlaşma, dartos ve kremaster kaslarının kasılıp gevşemesiyle testis ısısının 34°C’de korunması sağlanır (Mescher, 2019).

Testisler, dıştan üç tabakalı kalın bir kapsül ile sarılıdır.

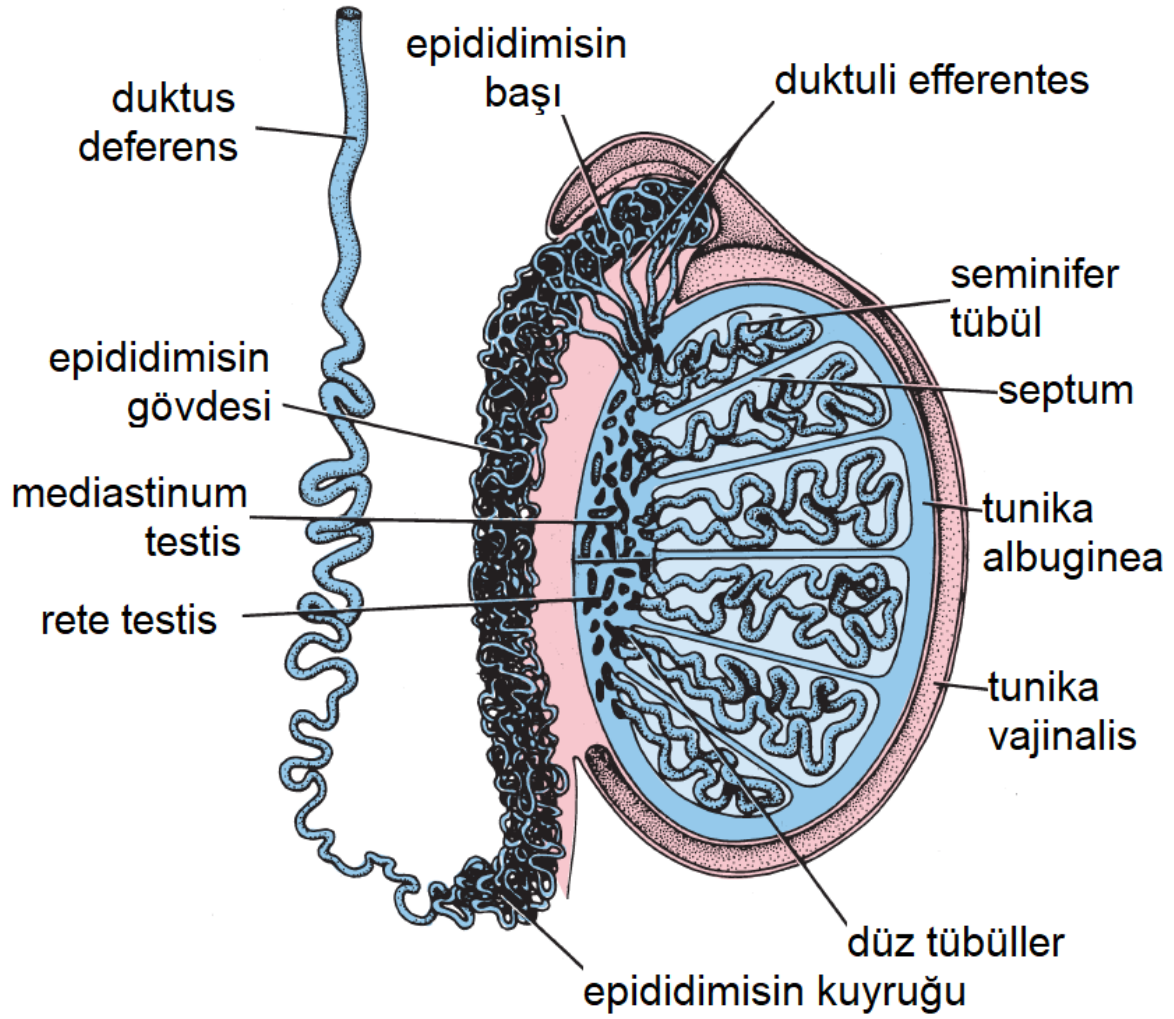
- **Tunika vaginalis:** Mezotel ile döşeli, testislerin anterolateral yüzeyinde bulunur. Testislerin karın boşluğundan skrotuma inerken birlikte sürükledikleri iki katlı periton tabakasıdır.
- **Tunika albuginea:** Yoğun fibroelastik bağ dokusundan oluşur. Kapsülün en kalın tabakasıdır. Testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Bu tabaka içerisinde kan damarları, lenf damarları ve kanallar seyreder.
- **Tunika vasküloza:** Kan damarlarını içeren en içteki gevşek bağ dokusudur. (Eşrefoğlu, 2016)

Her bir testis, septumlar tarafından yaklaşık 250 lobüle bölünür. Her bir lobül, 1-4 adet seminifer tübülünden ve Leydig (interstisyel) hücrelerini içeren stromadan meydana gelmektedir (Ross 2017). Her testiste 250-1000 adet tübül bulunur. Lobüllerin apeksinde tubuli rekti (düz tübül) olarak isimlendirilirler (Şekil 1). Mediastinumda rete testis ile devam ederler. Rete testis, duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (Eşrefoğlu, 2016).

2.2.2.2 Seminifer Tübüller

Her testiste 250-1000 adet seminifer tübül bulunur. Her seminifer tübül yaklaşık 150-200 µm çapta ve 30-70 cm uzunluğunda oldukça kıvrıntılı tübüllerdir. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Her bir seminifer tübül, spermatogenik (germinal) epitel olarak adlandırılan özelleşmiş çok katlı epitel ile sarılıdır. Epitelin bazal membranı fibröz bağ doku ile kaplıdır ve tübüllerin kasılmasını sağlayan düz kas özellikleri gösteren miyoid hücreler içermektedir (Mescher, 2019).

Germinal epitel, Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 2).

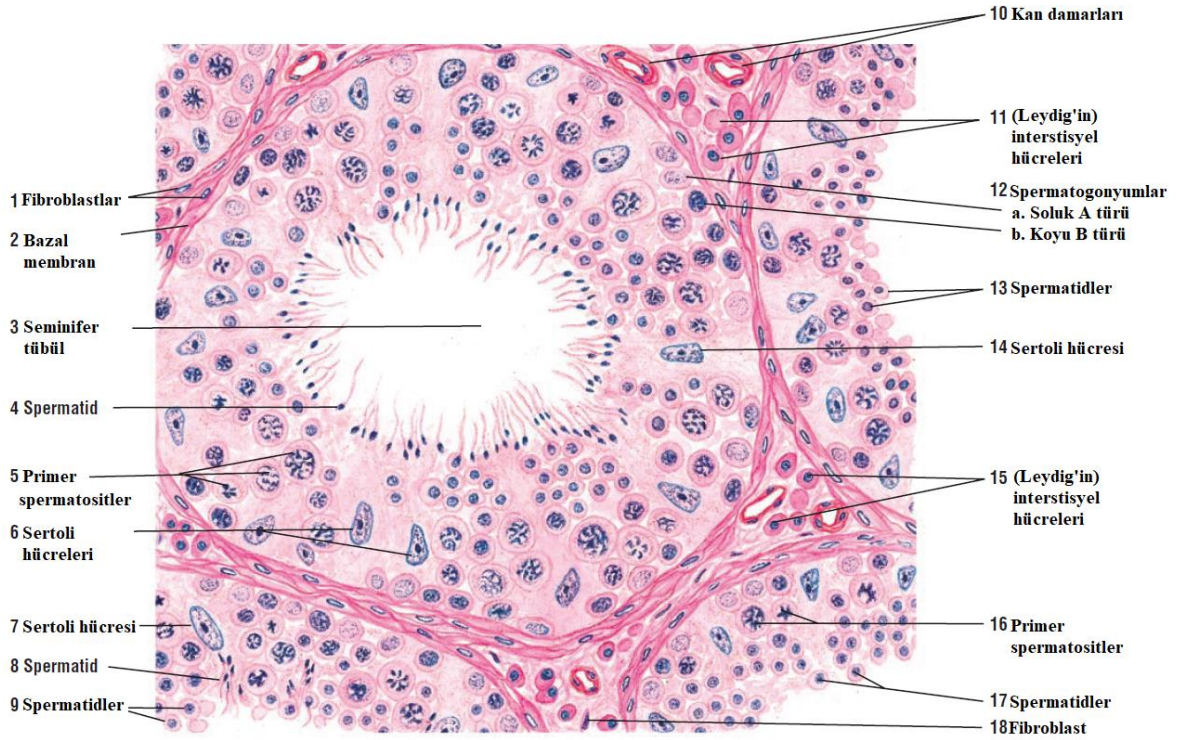


Şekil 1: İnsan testisinin sagital kesiti (Ross, 2016)

Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri; puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücresidir. Puberteden sonra, seminifer tübül epitelinin %10'luk kısmını oluşturur. Bazal membrandan başlayarak lümene kadar devam eden hücre gövdeleri ile köprü hücreler olarak görev yaparlar. Prizmatik hücrelerdir ve apikal ile lateral yüzeylerinde düzensiz sınırları vardır. Bu bölgelerde gelişmekte olan spermatogenik hücrelere kriptalar sağlayarak ev sahipliği yaparlar (Ovalle, 2009).

Sertoli hücreleri, bol miktarda düz endoplazmik retikulum, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondri ve lizozom, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve zengin bir hücre iskeleti içermektedirler. Çekirdekleri oval ya da üçgen şeklinde olup ökromatik boyanır ve belirgin çekirdekçikleri vardır (Özenci, 2006; Mescher, 2019).



Şekil 2: Seminifer tübül enine kesiti (Eroschenko, 2001)

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları;

- Spermatogenik hücreleri destekler, besler ve korurlar.
- Gelişimlerini tamamlamamış spermatogenik hücreleri fagosite ederler.
- Salgıladığı sıvı ile sperm transportu gerçekleşir.
- Androjen bağlayıcı protein, inhibin, plazminojen aktivator ve transferrin salgılarlar.
- Anti-Müllerian hormonu salgılarlar.
- Kan testis bariyerini oluştururlar (Eşrefoğlu, 2016).

Spermatogenik Hücreler

Seminifer tübül epitelinde 4-8 tabakalı halde bulunurlar ve düzenli bir şekilde bölünerek olgun spermilere farklılaşırlar. Bazaldan seminifer tübül lümenine doğru sırasıyla spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiyumlar olarak dizilmişlerdir (Üstüner, 2014).

Spermatogonyumlar bazal lamina ile direk ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantıların altında yer aldıklarından dolayı kan testis bariyeri dışındadırlar. Bu hücrelerin kök hücre özellikleri vardır ve mitotik olarak bölünürler. Spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatitler mayotik olarak bölünürler (Kierszenbaum, 2002).

Leydig Hücreleri (İnterstisyel hücreler)

Seminifer tübüllerin arasında bulunan interstisyel doku çok sayıda kan ve lenf damarları ve sinirlerden oluşan gevşek bağ dokusudur. Bağ dokusu hücrelerine ek olarak Leydig hücreleri de interstisyel alanda bulunur. Leydig hücreleri, testis volümünün yaklaşık %5-12 sini oluşturur. Genç bir erkekte ortalama 700 milyon Leydig hücresi bulunur (Kaler, 1978). Leydig hücreleri büyük, poligonal, eozinofilik, lipid damlacıkları içeren hücrelerdir. Sitoplazmalarında yaygın düz endoplazmik retikulum, çok miktarda mitokondriyon, lipofuskin pigmenti ve çubuk şeklinde Reinke kristalleri görülür.

Leydig hücreleri erken fetal yaşam sırasında farklılaşarak embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için gerekli olan testosteronu kan veya lenf kapillerlerine boşaltarak endokrin sekresyon yaparlar. Embriyoda, testosteron ve diğer androjenler erkek fetusta gonadların gelişimi için esastır. Pubertede, sperm üretiminin başlaması ve aksesuar bezlerin sekresyonları ve sekonder seks karakterleri gelişimi için gereklidir. Yetişkinlerde ise spermatogenezin, sekonder seks karakterlerinin, genital boşaltım kanallarının ve aksesuar cinsiyet bezlerinin devamlılığından sorumludurlar (Eşrefoğlu, 2016; Ross, 2017).

İlerleyen yaşla birlikte Leydig hücresi volümünde, düz endoplazmik retikulum sayısında ve testosteron seviyesinde azalma meydana gelir. Serum LH seviyesi değişmeden serum FSH, östron ve östradiol düzeyleri artar (Zikrin, 1997).

2.2.2.3 Tubuli Recti

Her seminifer tübül düz seyirli tubuli rektillerle devam ederek rete testise bağlanır. Tubuli rektiller çok kısa yapıda olup tek katlı kübik epitelle döşeli oldukça fazla anastomoz içeren testis içi kanallar ağıdır (Mescher, 2019).

2.2.2.4 Rete Testis

Rete testis mediastinumda tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitelle döşeli düzensiz kanallar halinde gözlenir. Epitel hücreleri birkaç kısa mikrovillus ve tek bir flagellum içerir (Kalaycı, 1986; Eşrefoğlu, 2016).

2.2.2.5 Duktuli Efferentes

Duktuli efferentes yaklaşık 20 adet kısa borucuktur. Rete testisin kanallarını duktus epididimise bağlar. Luminal yüzeye testere dişi görünümü veren yüksek ve alçak hücre kümelerini içeren yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Hareketli silyum ve çok sayıda mikrovillus içermektedir (Kalaycı, 1986; Ross, 2017).

2.2.2.6 Duktus Epididimis

Testisin arka üst kısmında yerleşmiştir. Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 bölümü vardır. Duktus deferensle devam eder. Stereosilyumlu yalancı çok katlı prizmatik epitele sahiptir. Epitelde bazal hücreler kök hücre olarak işlev görürken esas hücreler sperm olgunlaşmasını sağlayan siyalik asit, gliserofosfokolin ve glikoproteinleri salgılar. Epitel içindeki lenfositlere ‘halo hücreleri’ denir. Spermatozoonların hareket ve dölleme yeteneklerini kazandıkları bölümdür. Testisten gelen sıvının büyük bölümü duktuli efferentesten emilirken geri kalanı duktus epididimisten geri emilir. Epitel hücreleri artık cisimleri ve dejenere olan spermatozoonları fagosite ederek temizler (Eşrefoğlu, 2016).

2.2.2.7 Duktus Deferens

Duktus epididimisin genişlemiş olarak devam eden bölümüdür. Dar bir lümeni ve kalın bir kas tabakası vardır. Epiteli stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatiktir. Epitel altında elastik liflerden zengin lamina propriya bulunur. Mukoza lümene doğru katlantılar yapar. Kalın kas tabakası içte ve dışta longitudinal ortada ise sirkülerdir. Mesane hizasında genişleyerek prostata girmeden önce ampulla denen kısım oluşur. Mukoza tabakası ampulla boyunca ejakülatuar duktusun içine kadar devam ederken kas tabakası ampulladan sonra bitmektedir (Aksoy, 2008).

2.2.2.8 Duktus Ejakulatoryus

Prostat içerisinde seminal vezikül kanalları ile duktus deferensin birleşmesiyle oluşur. Basit prizmatik veya yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Duvarında kas tabakası bulunmaz. Epitel fibröz bağ doku ile sarıdır (Eşrefoğlu, 2016; Mescher, 2019).

2.2.2.9 Seminal Veziküller

Her biri 15 cm uzunluğunda, oldukça kıvrımlı kanallardan oluşan iki adet veziküldür. Bağ doku kapsülüyle sarıdır. Tek katlı ya da yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Lamina propria elastik lif içermektedir. İçte sirküler, dışta longitudinal düz kas tabakası vardır.

Testosteron bağımlı olarak yapışkan sarımtırak ekzokrin salgı yaparlar. Ejakülat sıvısının %70 kadarını seminal veziküller oluşturur. Sıvının içeriğindeki fruktoz spermin ana enerji kaynağıdır. Prostaglandinler spermin kadın genital sistemde etkinliğini uyarır. Fibrinojen ise ejakulasyondan sonra koagülasyonu sağlar (Mescher, 2019).

2.2.2.10 Prostat

Erkek üreme sisteminin en büyük yardımcı bezidir. 3 cm yüksekliğinde, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığında kestane şeklinde yaklaşık 20 gr ağırlığında bir organdır. Mesanenin altında, rektumun ön yüzüyle yakın komşuluktadır (Aksoy, 2008).

Prostat 30 ile 50 adet arasında değişen tubuloalveolar bezden oluşur. Temel fonksiyonu seminal sıvının oluşumuna katkıda bulunan şeffaf, alkali (pH 7,29) bir sıvı salgılamaktır. Bezler mukozal, submukozal ve esas prostatik bezler olmak üzere üç konsantrik tabaka halinde bulunmaktadır. Mukozal bezler mukus salgırlar. Submukozal bezler ve esas prostatik bezler, prostat bezinin salgısının büyük kısmını oluşturur (Ozan, 2005; Ross, 2017).

Bezleri döşeyen epitel, uyarı durumuna bağlı olarak yassı, kübik veya yalancı çok katlı prizmatik olabilmekle birlikte genellikle tek katlı prizmatik epiteldir. Asit fosfataz, fibrinolizin, sitrik asit, serin proteaz ve prostata spesifik antijen salgılar. Serin proteaz kanser durumunda prostattan seruma geçer ve seviyesi yükselir. Tanısal değer taşır (Eşrefoğlu, 2016).

Bez lümeninde kısmi kalsifiye olmuş küçük küresel cisimcikler bulunur. Bunlara prostat taşı ya da korpora amilasea denir. Yaşla birlikte sayıları artmaktadır (Mescher, 2019).

Prostat bezinin parankiması erişkinlerde anatomik ve klinik olarak dört bölümden meydana gelmektedir.

- **Santral bölge:** Ejakülatuar kanalı çevreler. Dokunun %25 ini oluşturur.

- **Periferal bölge:** Glandüler dokunun %70 oluşturur. Santral bölgeyi çevreler. İnflamasyona hassas olup kanserlerin çoğu bu bölgeden gelişir.
- **Transisyonel bölge:** Prostatik üretranın periferinde mukozal bezler içeren bölgedir. Yaşlanmayla birlikte hipertrofi gelişerek üretraya baskı yapar. İdrar çıkışı zorlaşır.
- **Periüretral bölge:** Mukozal ve submukozal bezleri içerir. Transisyonel bölgeden gelişen prostat hipertrofisine bağlı olarak bu bölgede de stromal genişleme görülebilir (Eşrefoğlu, 2016).

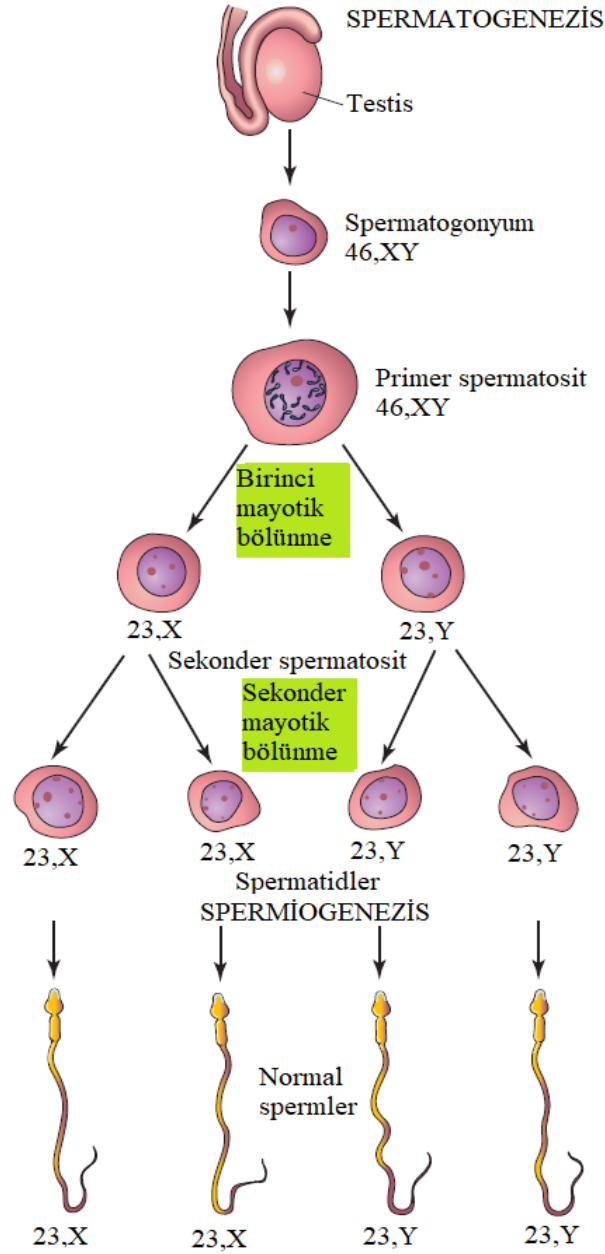
2.2.2.11 Bulboüretral Bezler (Cowper Bezi)

Çapları 3-5 mm olan iki adet birleşik tubuloalveoler bezdir. Dış yüzündeki bağ dokusunda iskelet kasları bulunmaktadır ve kapsül ile kuşatılmıştır. Kapsülden ayrılan septumları organı lobüllere ayırır. Mukus salgılayan tek katlı kübik veya prizmatik epitelle döşelidir. Mukus berraktır. Kayganlaştırıcı olarak görev yapar ve galaktoz, galaktozamin ve siyalik asitten zengindir (Eşrefoğlu, 2016).

2.2.3 Spermatogenez, Spermiyogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan spermatozoa meydana gelmesidir. Üç aşamada (Şekil 3) gerçekleşmektedir; mitoz (spermatogonyumların çoğalması), mayoz (spermatosit oluşumu ve DNA rekombinasyonu) ve spermiyogenez (spermatid farklılaşması) şeklinde olup, farklılaşmamış spermatogonyumlardan yüksek özellikteki sperm meydana gelir.

Spermatogoniyal kök hücreler çekirdeklerin koyu ve açık olarak boyanmasına göre iki farklı popülasyondan meydana gelir. Tip A farklılaşmamış spermatogonyumlardan, Tip A koyu spermatogonyum kök hücre olarak kalırken, Tip A açık spermatogonyumlar mitoz bölünmelerle tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar mitoz bölünmeler geçirerek Tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar. Tip B spermatogonyumlarda mitoz bölünerek primer spermatositleri oluştururlar. Birinci mayoz bölünme esnasında kromozom kondensasyonu, genetik eşleme (rekombinasyon), primer spermatositlerin (44+XY) seminifer tübül bazalinden adlüminal kompartmana göçü gibi çeşitli değişiklikler meydana gelir. Diploid yapıdaki primer spermatositlerden (44+XY), haploid yapıda sekonder spermatositler (22+X veya 22+Y) oluşur. İkinci mayoz bölünmenin tamamlanmasıyla da spermatidler oluşur (Hess, 2008; Oatley, 2012; Eşrefoğlu, 2016).



Şekil 3: Normal gametogenezis (Moore, 2016)

Spermatidler metamorfoza uğrayarak spermatozoanlara farklılaşırlar. Buna spermiyogenez adı verilir. Spermiyogenez dört evreden oluşmaktadır.

Golgi evresi:

PAS+ granüllerin golgi kompleksinin bulunduğu bölgede birikmesi ile karakterize bir dönemdir. Nükleusa yakın yerleşimli Golgi aygıtına endoplazmik retikulumda üretilen enzimler taşınır. Burada işlendikten sonra küçük veziküller halinde trans Golgi ağı ile salınırlar. Küçük veziküller birbirleriyle birleşerek çekirdek zarına tutunurlar. Spermin ön yüzünde akrozomal vezikülü oluştururlar. Bu sırada sentriyoller arka kutba göç ederek

distal sentriyol aksonem oluşumuna, proksimal sentriyol ise bağlantı parçasının oluşumuna katılır.

Şapka (Kep, Başlık) evresi:

Akrozomal vezikül nükleusun ön bölümünü sararak akrozoma dönüşür. Çekirdek membranının porları kaybolur, membran kalınlaşır. Çekirdek yoğunlaşır.

Akrozom evresi:

Bu evrede nükleus yoğunlaşıp uzar. Akrozomdan spermatidin arka kutbuna uzanım gösteren mikrotübüllerden manşet oluşur. Manşet uzadıkça mitokondriler kuyruk yönünde taşınır. Manşetle birlikte uzayan sitoplazma gelişen flagelluma ulaştığında, mikrotübüler yapı kaybolur. Sperm kuyruğunun orta parçasını ve esas parçasını ayıran anulus meydana gelir.

Olgunlaşma evresi:

Sitoplazma miktarının azaldığı dönemdir. Gereksiz olan sitoplazma artıkları Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatidler Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene düşerler (Kaya, 2000; Çelik, 2011).

Spermin gelişimi ve olgunlaşması, epididimde devam etmektedir. Burada hareketlilik kazanırlar ve daha ileri olgunlaşmaya uğrarlar. Seminifer tübül lümenine salınan spermatidler hareketsizdirler. Peritübüler kontraktıl hücrelerin peristaltik kasılmaları ve sertoli hücrelerinden salınan sıvının sayesinde seminifer tübüllerden düz tübüllere ardından rete testise girerler. Ardından duktuli efferentese ve duktus epididimisin proksimal kısmına geçerler. Burada bazı değişimlere uğrarlar:

- Hareketlilik kazanırlar.
- Nükleus DNA'sı yoğunlaşarak sperm başının boyutu azalır.
- Sitoplazma azalarak sperm hücresi daha ince hale gelir.
- Plazma membranı lipid ve proteinlerinde değişimler ve glikolizasyon
- Dış akrozomal membranında dekapasitasyon meydana gelir. Yüzey ilişkili dekapasitasyon faktörü eklenerek fertilizasyon yeteğini inhibe edilir.

Sperm erkek boşaltım kanalında birkaç hafta, dişi üreme kanalında ise 2-3 gün canlı kalabilir. Dişi üreme kanalında sperm membranındaki glikokaliks komponentlerinin

uzaklaştırılıp yerine yenisinin konması ile fertilizasyon yeteneği kazanırlar (Çelik, 2011; Ross, 2017).

2.2.4 Olgun (Matür) Spermin Yapısı

Seminifer tübüllerdeki germinal epitelden günde 200 milyonu aşabilen sperm üretilmektedir (De Jonge, 2006). Olgun sperm baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan meydana gelir.

Olgun insan spermi yaklaşık 60 μm uzunluğundadır. Sperm başı 4,5 μm uzunluğunda, 3 μm genişliğinde, 1 μm kalınlığında ve yassı, sivridir. Sperm başı akrozomal ve post akrozomal olarak iki kısma ayrılmıştır. Akrozomal kısımda anterior ve posterior akrozom olarak ikiye ayrılır (Toshimori, 2009; Ross, 2017). Spermin baş bölgesindeki nükleus sitoplazmanın büyük bölümünü kaplar. Genetik materyal, DNA, yoğun bir şekilde katlanmış olarak bulunur. Spermiler haploid kromozom içeren hücrelerdir. Zigotun cinsiyetini belirlerler.

Akrozom, plazma membranı ile nükleus zarı arasında bulunmaktadır. Sperm ile oositin birleşmesi için gereken enzimatik proteinleri içermektedir. Nükleus zarı, hücre zarı ve akrozomlar arasında fonksiyonel ve yapısal özelliği olan birçok molekül yerleşmiştir. Sperm yumurtaya temas ettiğinde akrozomal enzimler salınır. Akrozom reaksiyonunun ilk basamağı gerçekleşmiş olur. Bu süreç spermin penetrasyonunu ve fertilizasyonu kolaylaştırır. Ovuma başka spermilerin girmesini önler (Toshimori, 2009; Ross, 2017).

Sperm kuyruğu spermin hareketini sağlayan bölümdür. Aksonem tüm kuyruk boyunca uzanım gösterir. Merkezde yerleşmiş bir çift tübül ve onun etrafında 9 çift tübülden oluşur.

Sperm kuyruğu, boyun, orta, esas ve son parça olmak üzere dört bölüme ayrılır.

Boyun kısmı sperm başı ile kuyruk kısmını bağlar. Kısa olan boyun sentriyolları ve kaba fiberlerin başlangıçlarını içerir.

Orta parça 7 μm uzunluğundadır ve mitokondriyonları içerir. Mitokondrial kılıf içerisinde 100 civarındaki mitokondri helikal bir şekilde aksonemin dışına yerleşmiştir. Bu mitokondriyonlar, kuyruk hareketi için gerekli enerjiyi sağlarlar.

Esas parça 40 μm uzunluğundadır ve fibroz kılıfla çevrilidir. Sperm kuyruğunun en uzun bölümüdür.

Son parça 5 µm uzunluğundadır ve aksonem veya tübüler yapılardan ibarettir (Toshimori, 2009; Gartner, 2014; Ross, 2017).

2.2.5 Semen

Semen, büyük oranda prostat ve seminal veziküllerden, dğk oranda da bulboüretral bezler, epididimlerden gelen salgılar ile testisten gelen spermlerden oluğmaktadır (Milardi ve ark., 2013).

Semen pek çok madde içermekle birlikte %90'ı sudur. Enerji kaynağı olarak fruktoz içermektedir. Ayrıca lipidler, proteinler, cell-free DNA, RNA ve mikro RNA'lar, C vitamini ve inositol ile Ca, Zn, Mg, Cu, sülfür, selenyum gibi iz elementleri de içerir. Vücuttaki en yüksek prostoglandin konsantrasyonuna sahiptir. Ortalama bir ejakülasyon ile 3-4 ml semen üretilir (Aksoy, 2008; Drabovich ve ark., 2014).

Seminal plazmanın birçok bileğenin sperm motilitesine ve fertilizasyona katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur (Lay ve ark., 2001; Esfandiari ve ark., 2008).

Seminal plazma servikal mukusa spermatozoanın penetre olmasını kolaylaştıır (Overstreet ve ark., 1980). Matürasyon esnasında sperm membranının düzenlenmesinde (Clavert ve ark., 1985), peroksidasyon reaksiyonundan koruma (Jones ve ark.,1979) ve sperm kromatin bütünlüğünü sürdürmede (Huret, 1986) etkili olduğu saptanmıştır.

Ayrıca sperm yumurta etkileğmini ve kadın genital yollarının yanıtını düzenleyerek fertilizasyonu arttırdığı saptanmıştır (De Jonge, 2005; Robertson ve Sharkey, 2016).

2.3 İNFERTİLİTE

İnfertilite; çiftlerin bir yıllık korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik başarısı elde edememesidir (AUA, 2010).

Çiftlerin bir sene boyunca düzenli cinsel ilişki sonrasında %15'inde infertilite sorunu ortaya çıkmaktadır. Kadın faktörüne bağlı infertilite %30-40, erkek faktörüne bağlı infertilite oranı ise %30-40 kadardır (Kayıkçı ve ark., 2002; Boynukalın ve ark., 2014). Hem erkek hem de kadına ait patolojiler %20-25 çiftte birlikte gözlenir. %15 çiftte ise infertilite nedeni açıklanamaz ve açıklanamayan infertilite tanısı konulur (Vayena ve ark., 2002).

Erkeğin üreme potansiyelinde görülen azalma konjenital olabildiği gibi, ürogenital veya genetik anomaliler, varikosel, genital sistem enfeksiyonları, endokrin kökenli bozukluklar, kanser, gonadotoksik faktörlere maruz kalma gibi (Tablo 2) birçok sebebe bağlı olarak sonradan da kazanılmış olabilir (Hamada ve ark., 2011).

Kategoriler	Örnekler
Anatomik	Varikosel, Duktal veya Vazal obstrüksiyon, Testiküler yetmezlik, Ejakülasyon disfonksiyonu, Kriptorşidizm, Testis torsiyonu, Cerrahi yaralanma, Obstrüktif azospermi, Testis hasarı
Genetik ve çevresel	Genital enfeksiyonlar, İlaçlar, Radyasyon, Kanser, Sistemik hastalık veya enfeksiyon, İmmünolojik durumlar, Orak hücre hastalığı, Kromozomal anormallikler, Sertoli hücre sendromu, Erkek aksesuar bezi enfeksiyonu, Konjenital durumlar
Hormonal	Hipoandrojenizm, Azalmış veya artmış hormon seviyeleri, Psikolojik faktörler
Diğer	Cinsel sorunlar veya işlev bozukluğu, Cinsel birleşmede başarısızlık, Isı atrofisi, Maturasyon arresti, Yapısal sorunlar
İdiyopatik	- Hücre dışı sperm kusurları: Semen hacmi, pH, viskozitesi, Sperm aglütinasyonu, Piyospermi - Genel sperm kusurları: Oligospermi, Azospermi, Astenozoospermi, Teratospermi, Nekrospermi, Hiperspermi

Tablo 2: Erkek infertilitesi sebepleri (Pandruvada ve ark., 2021)

2.4 SEMEN ANALİZİ

Semen analizi, erkek doğurganlık potansiyelinin değerlendirilmesinde en temel adımdır. Spermatozoa üretiminin testiküler işlevselliğinin yanı sıra kanal sisteminin açıklığını ve aksesuar bezlerin salgı aktivitesini yansıtır (WHO, 2010). Semen özellikleri, doğal yolla gebe kalma, in vitro fertilizasyon (IVF) başarısı ve yardımcı üreme tekniklerine (YÜT) ihtiyaç duyan çiftlerin yönetimi için bir tahmin değeri sağlar (Bonde ve ark., 1998; Buck Louis ve ark., 2014). Ayrıca doğurganlığı etkileyebilecek geri döndürülebilir tıbbi durumların belirlenmesine de yardımcı olur (Jungwirth ve ark., 2018).

Semen örneği alımından 2-7 gün önce cinsel perhiz yapılması önerilmektedir (WHO, 2010). Daha kısa perhiz süresinin sperm hareketliliği, morfolojisi ve DNA bütünlüğünü iyileştirdiği, daha uzun bir yoksunluk süresinin ise semen hacmini ve sperm sayısını iyileştirdiği gösterilmiştir (Hanson ve ark., 2018).

Semen mastürbasyon ile sperm üzerinde toksik etkisi bulunmayan, steril, kuru, geniş ağızlı tek kullanımlık bir kap içerisine toplanır. Eğer numune laboratuvarında değilse evde toplanmış ise vücutla temas edecek şekilde muhafaza edilerek 30 dakika içerisinde laboratuvara getirilmelidir.

Ejakülasyondan sonra numune kabı 20°C ile 37°C arasındaki ortam sıcaklığında tutulmalıdır. Normalde semenin 15-60 dk içerisinde likefiye olması beklenir. Semen likefiye olduktan sonra makroskobik ve mikroskobik incelemelere geçilir. DSÖ 2010 kriterlerine göre en düşük semen analiz referans değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Sperm Parametreleri	En Düşük Referans Değerleri
Semen Volümü (ml)	1,5
Semen pH'ı	≥7.2
Viabilite (Canlılık) Testi	58 (55-63)
Total Sperm Sayısı (10 ⁶ /ejakulat)	39 (33-46)
Sperm Konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Sperm Progresif Motilitesi (PR, %)	32 (31-34)
Sperm Total Motilitesi (PR+NP, %)	40 (38-42)
Sperm Morfolojisi (Normal Formlar, %)	4 (3.0-4.0)
Peroksidaz Pozitif Lökosit	<1

Tablo 3: DSÖ 2010 kriterlerine göre en düşük semen analiz referans değerleri (WHO 2010)

2.4.1 Makroskopik Analiz

Likefaksiyon: Ejakülasyon sırasında toplama kabına alınan semen, tipik olarak yarı katı koagüle kitle şeklindedir. Numunenin tümü oda sıcaklığında genellikle 15 dakika içinde likefiye olsa da nadiren 60 dakika veya daha uzun zaman da alabilir. Likefaksiyon 60 dakika içinde tam oluşmazsa, bu durum kaydedilmelidir. Likefaksiyon sırasında numune kabının oda sıcaklığında veya 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde iki boyutlu karıştırıcıyla sürekli olarak nazıkçe karıştırılması veya döndürülmesi, homojen bir numune oluşturmaya yardımcı olabilir.

Viskozite: Ejakülasyondan sonra seminal veziküllerde bulunan semenogelin proteini ile semen koagule olur ve 15 dakika içinde prostat kaynaklı proteolitik enzimlerle likefiye olmaya başlar. Viskozite, seminal sıvının akmaya karşı direncini yansıtır. Numune bir pipete aspire edilerek yerçekimi ile düşmesine izin verilerek değerlendirilir. Normal bir semen numunesi küçük ayrı damlalar oluştururken, >2 cm iplik oluşumu hiperviskozitenin göstergesidir. Yüksek viskozite, sperm hareketliliği ve konsantrasyonunun değerlendirilmesini olumsuz etkiler. Numune fizyolojik bir ortamla seyreltilerek veya proteolitik enzimlerin eklenmesiyle viskozite azaltılabilir (Du Plessis ve ark., 2013). Hiperviskozite, prostat ve seminal veziküllerin yetersiz salgılanmasıyla sonuçlanan aksesuar bez disfonksiyonunun göstergesidir (Beigi ve ark., 2019). Ayrıca, aksesuar bezlerin enfeksiyonu ve iltihabı da semen hiperviskozitesi ile ilişkilidir (Elia ve diğerleri, 2009). Koagülasyon olmaması kanallardaki obstruksiyona veya seminal veziküllerin doğuştan yokluğuna bağlı olabilir (Andrade-Rocha, 2005).

Renk: Likefiye olmuş semen, gri-opalesan bir renkle homojen görünmelidir. Yüksek sperm konsantrasyonunda meni opak, düşük sperm konsantrasyonunda ise daha şeffaf görünür. Cinsel perhiz süresi artığında ve artmış lökosit varlığında semen sarımsı bir görünümde, eritrositlerin varlığında ise kırmızı-kahverengi bir renkte görülmektedir.

Hacim: Semen hacmi, aksesuar bezlerinin genel işlevselliğini yansıtır. Semen hacminin ölçümü, toplam spermatozoa sayısını ve diğer germinal olmayan hücre sayılarını belirlediği için kritik bir adımdır. Ejakülat hacmi yaklaşık 1,5–6,0 ml ise numune normal kabul edilir (WHO, 2010). Eksik toplama, boşaltım kanallarının tıkanması, vas deferensin konjenital bilateral yokluğu (CBAVD), kısmi retrograd boşalma veya hipogonadizm düşük semen hacmine neden olabilir. Öte yandan, daha yüksek semen hacmi (hiperspermi), aksesuar bezlerin iltihaplanmasını gösterebilir.

pH: Semen pH'si, asidik prostat salgısı ile alkali seminal veziküler salgı arasındaki dengenin bir göstergesidir. pH, likefaksiyondan 30 dakika sonra ölçülmelidir. Ancak her durumda, üretiminden itibaren oluşan CO₂ kaybından etkilendiği için, pH ölçümü ejakülasyondan sonraki bir saat içinde mutlaka yapılmış olmalıdır. pH'nın değerlendirilmesi için bir pH kağıdına bir damla numune yerleştirilir ve elde edilen renk kalibrasyon şeridi ile karşılaştırılır. DSÖ kılavuzuna göre, alt eşik değeri olarak pH 7,2 olarak belirlenmiştir. CBAVD ve ejakülatör kanalların tıkanması durumunda, seminal vezikül fraksiyonunun kaybı daha asidik bir pH (pH <7) ortaya çıkarmaktadır (Gökçe, 2011).

2.4.2 Mikroskopik Analiz

Konsantrasyon: Sperm konsantrasyonu hesaplanırken Makler sayım kamarası, hemositometre gibi sayım kamaraları kullanılabilir. Makler sayım kamarasının, semenin seyreltilmesine gerek olmaması, sayım yapılan karelerin daha az olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Sayım yapılırken semenin likefiye olmuş olması spermelerin belli bölgelerde yığılıp kalmamaları açısından önemlidir. 10 µl'deki değere göre toplam sayı ve konsantrasyon hesaplanacağı için numunenin homojenize edilmesi önemlidir. Total sperm sayısı alt referans değeri 39x10⁶/ml'dir (WHO, 2010).

Bir semen örneği, sperm konsantrasyonu mL başına 15x10⁶ spermatozoiden düşük olduğunda oligozoospermik ve ejakülatta hiç sperm olmadığında azospermik olarak tanımlanır (WHO, 2010). Azospermiden şüphelenilen hastalarda farklı günlerde en az iki numune alınmalıdır. Numuneler santrifüjlenmeli ve pellette spermatozoa varlığı incelenmelidir. Azospermide, obstrüksiyon durumunda genellikle daha düşük olan hacim, pH ve fruktoz gibi semen parametrelerinin değerlendirilmesine dayalı olarak obstrüktif ve nonobstrüktif azospermi olarak sınıflandırılabilir (Wosnitzer ve ark., 2014).

Hareketlilik (Motilite): Sperm motilitesi, toplam sperm sayısında hareketli olan spermelerin yüzdesidir.

Motilite tayininde kişilere ve laboratuvarlara göre farklı sonuçlar ortaya çıktığından dolayı DSÖ spermin ilerleme hızını referans almayıp motiliteyi üç gruba ayırmıştır;

- **İleri hareketlilik (Progresif motilite; PR),** doğrusal ya da geniş bir daire içerisinde hareketli olan sperm hareketidir.

- **Yerinde hareketlilik (Nonprogresif motilite; NP)**, daha küçük daireler içerisinde ilerlemenin olmadığı, baş hareketinin zorlukla olduğu veya olmadığı kuyruk hareketini gözlemlendiği spermiler ile tanımlanmaktadır.
- **Hareketsizlik (İmmotilite; IM)**, hareketin olmadığı spermileri ifade eder.

İleri hareketli sperm (PR) yüzdesi alt limit değeri %32, toplam hareketli sperm (PR+NP) yüzdesi ise en az %40 olarak belirlenmiştir (WHO, 2010).

Düşük referans değer altındaki sperm motilitesi (astenozoospermi), aksesuar bezlerin, testislerin (varikosel, kriptorşidizm ve testis kanseri) enfeksiyonuna/iltihabına veya alkol, uyuşturucu tüketimi, sigara kullanımı, hava kirliliği, psikolojik stress gibi çevresel faktörlere bağlı olabilir (Shahrokhi ve ark., 2019). Bu faktörler, sperm plazma zarının veya flagellar proteinlerin peroksidatif hasarına bağlı olarak sperm motilitesinin bozulmasına neden olan seminal oksidatif stresi artırır. Primer siliyer diskinezi veya antisperm antikorları olan erkeklerde tam hareketlilik yokluğu gözlenir (Cui ve ark., 2015; Munro ve ark., 1994).

Canlılık (Viabilite): Ölü spermiler ile hareketsiz ama canlı olan spermiler birbirinden hücre membranı varlığı ile ayrılır. Canlı olmayan (ölü) hücrelerde bulunan hasarlı plazma membranlarının, membrana penetre olmayan boyaların hücre içine girmesine izin vermesi, o hücrelerin ölü olduğunu gösterir. Canlı hücreler ise boyayı tutmaz. Bu ayrımı yapmak klinik açıdan oldukça önemlidir. İmmotil canlı ve ölü spermilerin ayrımının yapılması, hangi tip yardımcı üreme tekniğinin seçileceği konusunda yol göstericidir (WHO, 2010). Çok az sperm hareketi olan veya immotil spermileri olan hastalara ICSI tedavisi uygulayabilmek için spermin canlı olup olmadığının belirlenmesi gerekir (Casper ve ark., 1996).

Morfoloji: 2010 WHO kılavuzunda morfolojik olarak normal bir sperm bir baş (akrozom), orta parça ve kuyruğa sahiptir. Normal bir baş, pürüzsüz hatlara ve oval bir şekle sahiptir. Akrozomun açıkça görülebilir, iyi tanımlanmış, homojen yapıda ve sperm başının ön kısmının %30-60'ını kaplıyor olması gerekir. Normal bir orta parça sitoplazmik kalıntılardan yoksun ve baş kısmına göre belirli bir açı oluşturmadan, $\leq 1 \mu\text{m}$ genişliğinde ve baş uzunluğunun yaklaşık 1,5 katı kadar başa ekselel olarak bağlı olmalıdır. Kuyruk ayrıca sitoplazmik kalıntılardan yoksun olmalı, orta parçanın akrozomal sonrası ucuna apikal olarak yerleştirilmeli, yaklaşık 45-50 μm uzunluğa sahip olmalı ve keskin kıvrımlardan yoksun olmalıdır (Menkveld, 2013).

2.5 SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİ

İn vivo koşullar altında, potansiyel olarak fertil spermatozoa, kadın genital kanalı içerisinde hareketsiz spermatozoa, debris ve seminal plazmadan ayrılır (Mortimer ve Templeton, 1982). Bu süreç sırasında, sadece ilerleyici hareketli spermatozoa seçilmekle kalmaz, aynı zamanda kapasitasyon adı verilen fizyolojik değişikliklere uğrar (Berford, 1983).

İdeal sperm ayırma tekniği;

- Hızlı, kolay ve uygun maliyetli olmalıdır.
- Olabildiğince hareketli spermi izole etmelidir.
- Sperm hasarına veya ayrılan sperm hücrelerinde fizyolojik olmayan değişikliklere neden olmamalıdır.
- Ölü spermatozoa, lökositler ve bakteriler dahil diğer hücreleri ortadan kaldırmalıdır.
- Dekapasitasyon faktörleri veya reaktif oksijen türleri (ROS) gibi toksik veya biyoaktif maddeleri ortadan kaldırmalıdır.
- Daha büyük hacimlerde ejakülatın işlenmesine izin vermelidir.

Mevcut yöntemlerin hiçbirisi tüm bu gereklilikleri karşılamadığından, klinik uygulamada sperm parametrelerine göre en iyi düzeyde verim elde edecek şekilde yöntem seçilmez (Henkel ve Schill, 2003).

Günümüzde en sık kullanılan konvansiyonel yöntemler sperm yıkama, swim-up ve dansite gradient yöntemleridir.

2.5.1 Yıkama Yöntemi

Bu yöntemde temel amaç spermatozoanın seminal plazmadan uzaklaştırılarak istenilen bir hacimde yoğunlaştırılmasıdır. En yüksek sayıda sperm veren sperm hazırlama yöntemidir. Dezavantaj olarak motil ve immotil spermleri ayırtırmamaktadır.

Bu amaçla konik dipli steril santrifüj tüpleri kullanılır. Likefiye olmuş semen konik bir tüp içerisinde 1+1 volüm oranında sperm yıkama medyumunu ile karıştırılır. Dilüe edilmiş semen, her birinin miktarı 3 ml'yi geçmeyecek şekilde santrifüj tüplerine konularak 300-500 g'de, 5-10 dk santrifüj edilir. Üstteki süpernatant kısmı atılarak, dipte kalan pellet 1 ml medium ile tekrar karıştırılır. Ardından, 300-500 g'de, 3-5 dk tekrar

santrifüj edilir. Üstteki supernatant kısmı atılarak, dipte kalan pellet, uygulanacak yöntemle göre yeterli miktarda medyum eklenerek kullanılır (WHO, 2010).

2.5.2 Direkt Swim-Up (Yüzdürme) Yöntemi

Spermatozoanın kendi motilitesine göre semenden ayrılmasıdır. Hareketli spermier üstteki katmana yüzerler. Elde edilen motil/immotil sperm oranı yüksektir.

Likefiye olmuş ejakülatından bir ml'lik fraksiyonlar, ayrı ayrı 15 ml'lik Falcon tüplere konulur. Üzerlerine 1-2 ml sperm yıkama medyumunu eklenir. Tüpler 37°C'de bir saat süreyle 45° eğimli pozisyonda inkübe edilir. İnkübasyon sonunda, üstteki 1 ml'lik kısım pipetle alınarak kullanılır. Bu yöntemle ileri derecede oligozoospermi ya da astenozoospermi olgularında yeteri kadar sperm elde edilememektedir (WHO, 2010).

2.5.3 Dansite Gradient Yöntemi

Bu yöntemde ayırım, hücreler arasındaki yoğunluk farkına dayanır. Normal morfolojiye sahip ve ileri hızlı hareketli sperm hücrelerinin oluşturulan farklı yoğunluktaki katmanlardan geçerek konik tüpün dip kısmına ulaşması beklenir (Amiri ve ark., 2012) Semendeki anormal spermier ve diğer bileşenler diğer tabakalara göç ederler. Konik tüpün en alt katmanı en yoğun katman olarak belirlenir. Sıklıkla tercih edilen yoğunluk kombinasyonları 40/80 veya 50/90'dır (Özkavukçu, 2017). Bu yöntem genelde oligozoospermi, astenozoospermi ve teratozoospermi vakalarında tercih edilmektedir.

15 ml'lik konik Falcon tüpü içersine, aşağıdan yukarıya doğru her birinden 1 ml olacak şekilde %80 ve %40'lık gradient solüsyonları üst üste konulur. Likefiye olmuş semen iyice karıştırıldıktan sonra en üstteki tabakanın üzerine 1 ml sarımadan bırakılır.

300-400 g'de 15-30 dk santrifüj edilir. Daha sonra üstteki supernatant kısmı bir pipetle aspire edilerek dışarı atılır. Dipte bırakılan kısım 5 ml medyum ile karıştırılır ve 200 g'de 4-10 dk santrifüj edilir. Yıkayıp ve altta toplanan pellet üzerine yeterli oranda medyum eklenerek kullanılır (WHO, 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya 01.01.2021-01.08.2021 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesi'ne günlük rutin semen analizi için müracaat eden, yaşları 20-55 arası olup normal semen parametrelerine sahip onam formuna olur veren 20 hastanın semen numuneleri dahil edilmiştir. Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun 17.07.2020 tarih 2020/2740 nolu izni ile (bkz. EK 1) gerçekleştirildi. Çalışmaya katılan gönüllülerin bilgilendirilmiş onam formu ile izinleri alındı (bkz. EK 2).

3.1 Hafnium Klorür'ün Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Hafnium Klorür (Hafnium (IV) chloride, %98 PN: 258202) Sigma Aldrich firmasından temin edildi. 2,5 gram HfCl_4 10 ml serum fizyolojik içerisine katılarak HfCl_4 solüsyonu elde edildi. Çalışma gruplarında 2 mg/ml ve 4 mg/ml HfCl_4 olacak şekilde doz ayarlaması yapıldı.

3.2 Semen Örneklerinin Toplanması

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesine semen örneği vermek için gelen hastaların gönüllü olanlarından onam alındı. Semen örnekleri 3 günlük cinsel perhizden sonra mastürbasyon yoluyla toksik etki bulundurmeyen steril kaplara toplandı. Toplanan semen örneklerinin oda sıcaklığında 15-60 dk içerisinde likefiye olması beklendi. Likefiye olduktan sonra DSÖ 2010 yılı laboratuvar el kitabı baz alınarak önce makroskopik ardından mikroskopik semen analizi yapıldı. Analiz sonucunda 20 normospermik semen örneği çalışmaya dahil edildi.

3.3 Semen Örneklerinin Hazırlanması

Normospermik semenler sperm yıkama medyumu (Origio Sperm Wash) ile 1+1 olacak şekilde homojenize edildi. Ardından 150 g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pelletin üzerindeki süpernatant kısım atıldı. Pellete 3 ml sperm yıkama medyumu eklenerek enjektörle homojenize edildi. 3 ml'lik semen örneği her biri 1 ml olacak şekilde 3 adet ependorf tüpüne dağıtıldı.

Kontrol grubuna 16 µl cell culture grade water eklendi. Kalan 2 tüpe ise 2 mg/ml ve 4 mg/ml HfCl_4 olacak şekilde HfCl_4 solüsyonu eklendi. Ardından tüm grupların 20. ve 40. dakikalarında hareketlilik ve canlılıklarına bakıldı.

3.4 Hareketlilik Tayini

10 µl semen örneği Makler sayım kamarasına damlatıldıktan sonra ışık mikroskopunda 20'lik objektif ile 200 hücre sayılarak değerlendirme yapıldı.

3.5 Canlılık Tayini

Canlılık tayini Eozin Y boyası ile yapıldı. 0,9 g NaCl (Sodyum Klorür) 100 ml saf su içinde çözdürüldü. 0,5 g eozin Y'yi (renk indeksi: 45380) 100 ml %0,9 NaCl'e ekleyerek canlılık testine uygun eozin Y solüsyonu elde edildi (WHO 2010).

Canlılık tayini için 10'ar µl semen, lam üzerine damlatılmış olan 10 µl eozin Y solüsyonu karıştırıldı. Ardından lamel ile kapatıldı. 2-3 dk bekledikten sonra mikroskop altında 40'lık objektifte 200 tane spermatozoa sayılıp, canlı-cansız yüzdeleri değerlendirildi. Boya alan spermatozoalar nonviable (cansız), boyayı almayan spermatozoalar viable (canlı) olarak değerlendirildi.

3.6 pH Ölçümü

pH test çubukları (Macherey-Nagel) ependorfların içinde renk değişimi bitene kadar bekletildi. pH test çubuğundaki oluşan renk, renk skalası ile kontrol edilerek sonuca gidildi.

3.7 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda her grubun motilite ve canlılık değerleri kaydedildi. Sayısal değişkenler için ortalama ve standart sapma tanımlayıcı istatistikleri verildi. Değişkenlerin analizinde karma etki modelleri kullanıldı. Analizler Jamovi 2.0 programı ile yapıldı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Hareketlilik ve Canlılığın Ortalama Değerleri

Grup	Zaman dk	Toplam Hareketlilik		İleri Hareketlilik		Yerinde Hareketlilik		Hareketsizlik		Canlılık	
		Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Kontrol	20	52,40	4,54	47,25	4,51	5,15	2,30	47,60	4,54	73,55	4,99
	40	46,65	6,85	40,50	5,62	6,15	2,16	53,35	6,85	63,45	4,05
2 mg/ml	20	40,20	6,39	31,40	5,83	8,80	3,55	59,80	6,39	59,65	3,82
	40	33,25	6,89	24,05	5,20	9,20	4,61	66,75	6,89	51,90	3,04
4 mg/ml	20	16,60	3,97	7,70	3,10	8,90	3,09	83,40	3,97	31,25	4,84
	40	11,20	3,58	4,35	1,98	6,85	2,89	88,80	3,58	22,30	6,71

Tablo 4: Hareketlilik ve canlılığın ortalama ve standart sapma değerleri (dk: Dakika, Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, Altı çizili sayılar en düşük normospermi referans değerinin altında kalanları göstermektedir.)

DSÖ 2010 kriterlerine göre 2 mg/ml HfCl₄ grubunda hareketlilik ve canlılık açısından normospermi değerlerinde azalma eğilimi görülmektedir. 4 mg/ml HfCl₄ grubunun ise hareketlilik ve canlılık değerlerinin normospermi değerlerini karşılamadığı görülmektedir (Tablo 4).

4.2 Canlılık Sonuçları

Canlılık sonuçlarının doza ($p<0,001$) ve zamana ($p<0,001$) göre değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Doz*zaman ($p=0,275$) etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Fixed Effect Omnibus Tests).

Çoklu Karşılaştırmalar

Grup		Grup	Fark	SE	p
Kontrol	-	2 mg/ml	12,73	0,80	< ,001
Kontrol	-	4 mg/ml	41,72	1,34	< ,001
2 mg/ml	-	4 mg/ml	29,00	1,27	< ,001

Tablo 5: Canlılık açısından doz karşılaştırmaları (SE: Standart Hata)

Tablo 5’te 2 mg/ml HfCl₄ grubunda canlı sperm sayısındaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: 12,73, Standart Hata (SE): 0,8, $p<0,001$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda canlı sperm sayısındaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel

olarak anlamlı bulundu (Fark: 41,72, Standart Hata (SE): 1,34, $p<0,001$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda canlı sperm sayısındaki azalma 2 mg/ml HfCl₄ grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: 29, Standart hata (SE): 1,27, $p<0,001$).

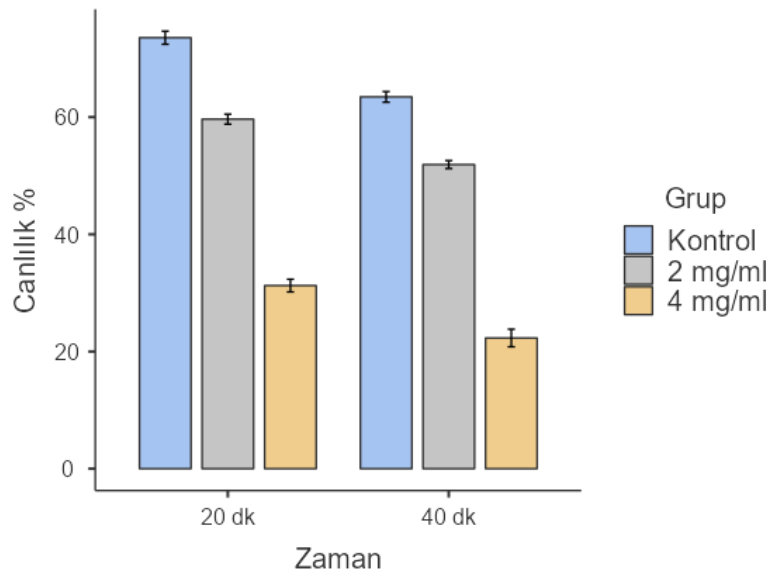
Çoklu Karşılaştırmalar

Zaman	Zaman	Fark	SE	p
20 dk	- 40 dk	8,93	0,59	<,001

Tablo 6: Canlılık açısından zaman karşılaştırmaları (SE: Standart Hata)

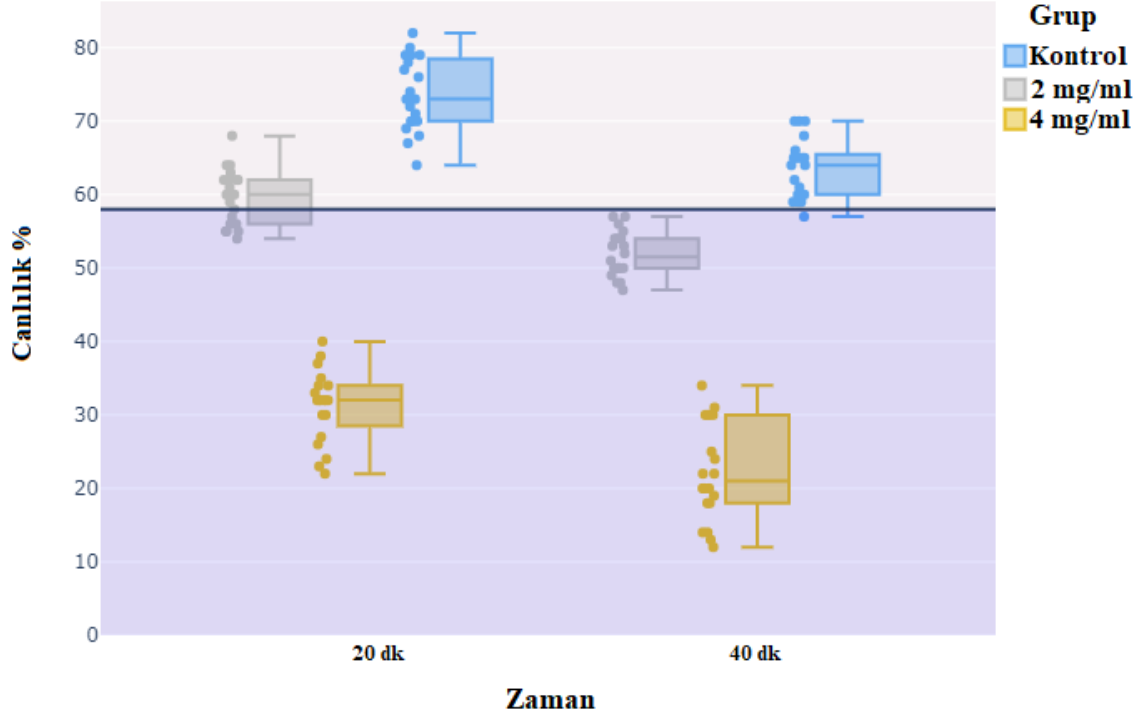
40. dakika canlı sperm sayısındaki azalma 20. dakikaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulundu (Tablo 6).

Şekil 4'te canlı sperm sayısının doz ve zaman arttıkça azaldığı görülmektedir.



Şekil 4: Canlılığın kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi (Ortalama±SS)

Şekil 5'te DSÖ 2010 kriterlerine göre kontrol grubu 20. dk canlılık değerleri en düşük referans değerinin üzerindedir. 40. dakikadaki bir örnek ise en düşük referans değerleri içerisinde. 2 mg/ml HfCl₄ grubu 20. dk canlılık değerleri en düşük referans değerinin altına düşmeye başlamıştır. 40. dk itibarı ile tüm örnekler en düşük referans değerinin altındadır. 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ise tüm örnekler en düşük referans değerinin altında görülmektedir.



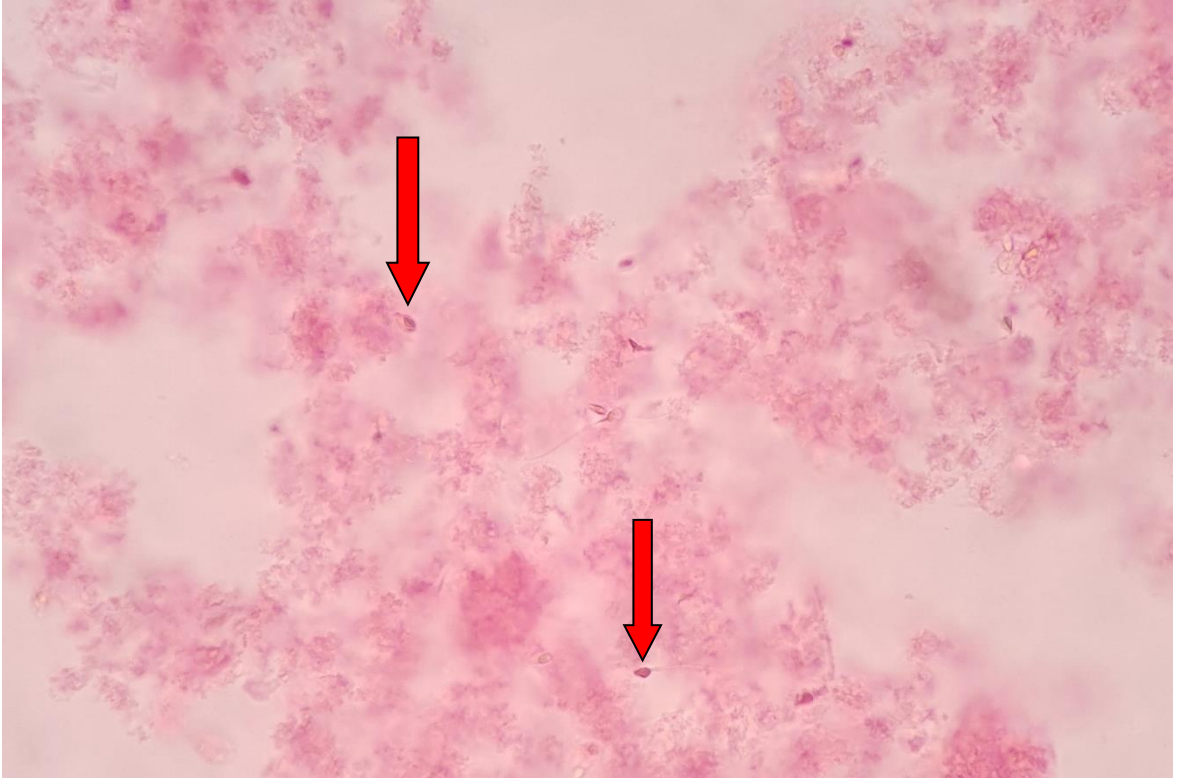
Şekil 5: Canlılığın kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişiminin DSÖ 2010 kriterlerine göre gösterilmesi (Noktaların her biri bir örneği temsil göstermektedir. Koyu mavi çizgi canlılığın en düşük referans değerini (%58) göstermektedir.)

Şekil 6’da kontrol grubu 20. dk Eozin-Y boyaması ile canlı ve cansız spermeler görülmektedir. Sarı oklar canlı spermeleri, kırmızı oklar ise cansız göstermektedir. 400x fiber optik büyütme ile görüntü elde edilmiştir.

Şekil 7’de 4 mg/ml HfCl₄ grubu 20. dk Eozin-Y boyaması ile cansız spermeler görülmektedir. Yaygın çökeltiler olduğu görülmektedir. Bu çökeltiler diğer gruplarda oluşmamaktadır. Kırmızı oklar cansız spermeleri göstermektedir. 400x fiber optik büyütme ile görüntü elde edilmiştir.

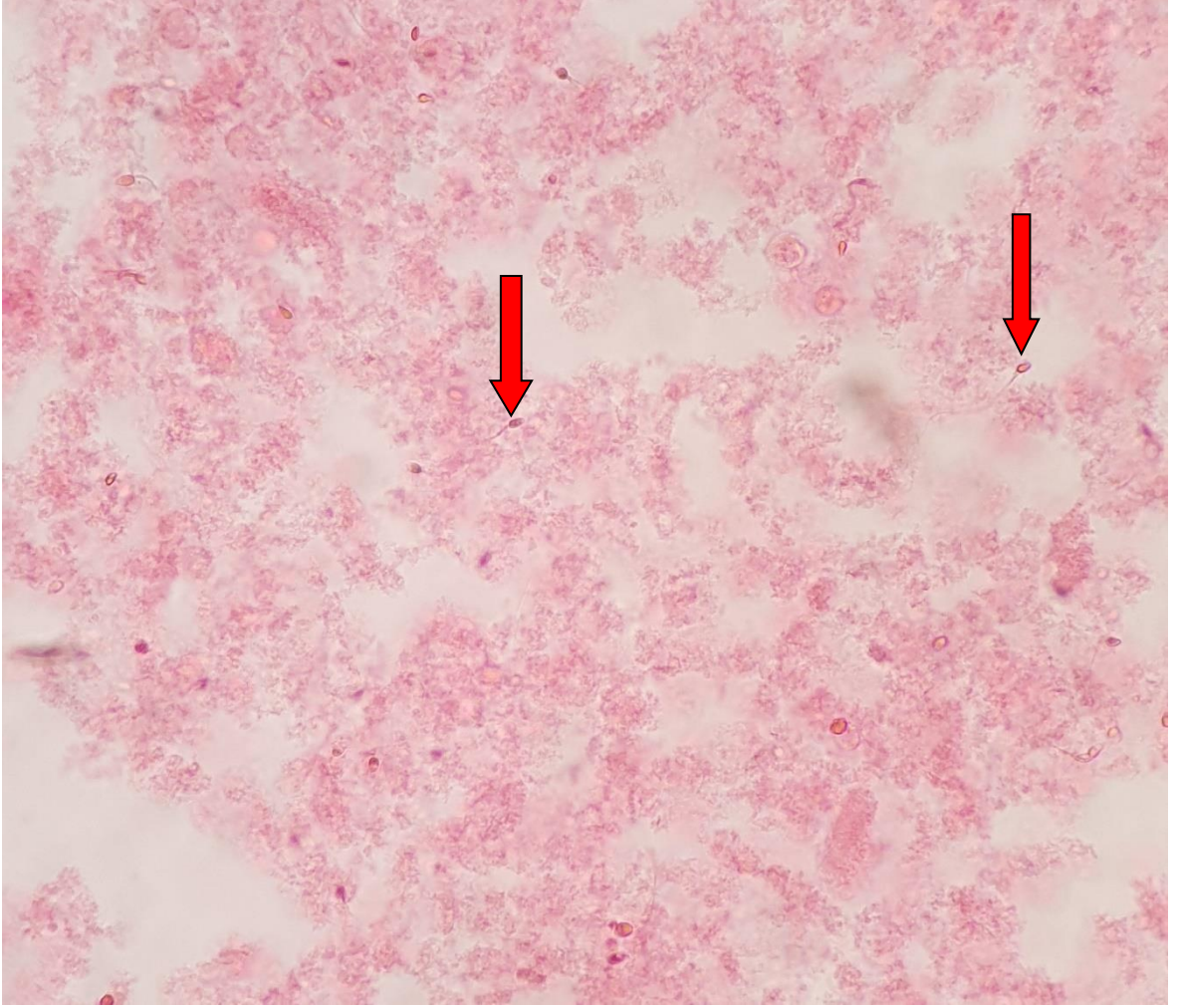


Şekil 6: Kontrol grubu 20. dk (Sarı oklar canlı, kırmızı oklar cansız spermli göstermektedir. Eozin-Y boyama. 400x fiber optik büyütme).



Şekil 7: 4 mg/ml $HfCl_4$ grubu 20. dk (Yaygın çökeltiler görülmektedir. Kırmızı oklar cansız spermli göstermektedir. Eozin-Y boyama. 400x fiber optik büyütme)

Şekil 8’de 4 mg/ml HfCl₄ grubu 40. dk Eozin-Y boyaması ile cansız spermier görölmektedir. Yaygın çökeltier sadece 4 mg/ml HfCl₄ grubunda görölmüştür. Kırmızı oklar cansız spermiereri göstermektedir. 400x fiber optik büyütme ile görüntü elde edilmiştir.



Şekil 8: 4 mg/ml HfCl₄ grubu 40. dk. (Yaygın çökeltier görölmektedir. Kırmızı oklar cansız spermiereri göstermektedir. Eozin-Y boyama. 400x fiber optik büyütme)

4.3 Hareketlilik Sonuçları

4.3.1 Hareketsizlik Değerleri

Hareketsiz sperm sayısının doza ($p<0,001$) ve zamana ($p<0,001$) göre değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Doz*zaman ($p=0,410$) etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Fixed Effect Omnibus Tests).

Çoklu Karşılaştırmalar

Grup	Grup	Fark	SE	p
Kontrol	- 2 mg/ml	-12,80	1,30	<,001
Kontrol	- 4 mg/ml	-35,63	1,12	<,001
2 mg/ml	- 4 mg/ml	-22,83	1,60	<,001

Tablo 7: Hareketsizliğin doz etkileşimi (SE: Standart hata)

Tablo 7’de 2 mg/ml HfCl₄ grubunda hareketsiz sperm sayısındaki artma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: -12,80, Standart Hata (SE): 1,30, $p<0,001$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda hareketsiz sperm sayısındaki artma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: -35,63, Standart Hata (SE): 1,12, $p<0,001$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda hareketsiz sperm sayısındaki artma 2 mg/ml HfCl₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: -22,83, Standart Hata (SE): 1,60, $p<0,001$).

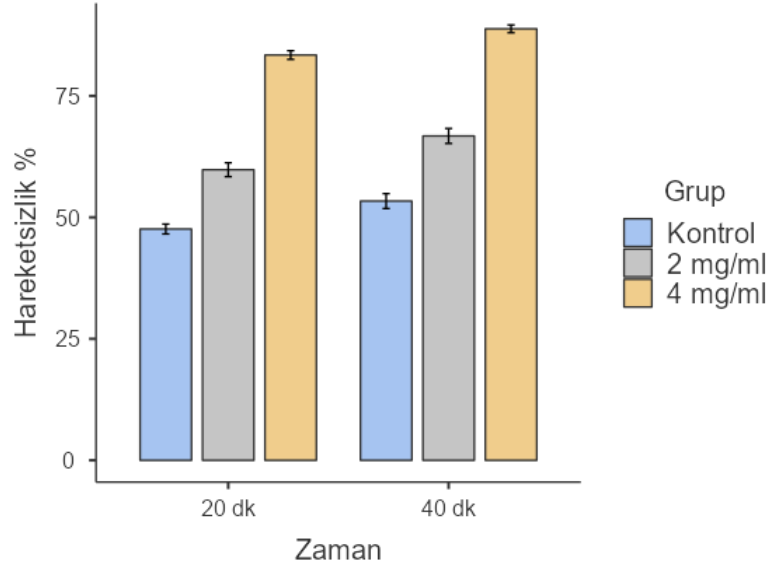
Çoklu Karşılaştırmalar

Zaman	Zaman	Fark	SE	p
20 dk	- 40 dk	-6,03	0,49	<,001

Tablo 8: Hareketsizliğin zaman etkileşimi (SE: Standart hata)

40. dakika hareketsiz sperm sayısındaki artma 20. dakikaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulundu (Tablo 8).

Şekil 9’da hareketsiz sperm sayısının doz ve zaman arttıkça arttığı görülmektedir.



Şekil 9: Hareketsizliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi (Ortalama±SS)

4.3.2 Yerinde Hareketlilik Değerleri

Yerinde hareketli sperm sayısının doza ($p < 0,001$) ve doz*zamana ($p < 0,05$) göre değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Zaman ($p = 0,578$) etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Fixed Effect Omnibus Tests).

Çoklu Karşılaştırmalar

Grup	Grup	Fark	SE	p
Kontrol	- 2 mg/ml	-3,35	0,81	0,002
Kontrol	- 4 mg/ml	-2,22	0,63	0,004
2 mg/ml	- 4 mg/ml	1,12	0,99	0,272

Tablo 9: Yerinde hareketliliğin doz etkileşimi (SE: Standart hata)

Tablo 9’da 2 mg/ml HfCl₄ grubunda yerinde hareketli sperm sayısındaki artma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: -3,35, Standart Hata (SE): 0,81, $p < 0,05$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda yerinde hareketli sperm sayısındaki artma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: -2,22, Standart Hata (SE): 0,63, $p < 0,05$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda yerinde hareketli sperm sayısındaki azalma 2 mg/ml HfCl₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Fark: 1,12, Standart hata (SE): 0,99, $p > 0,05$).

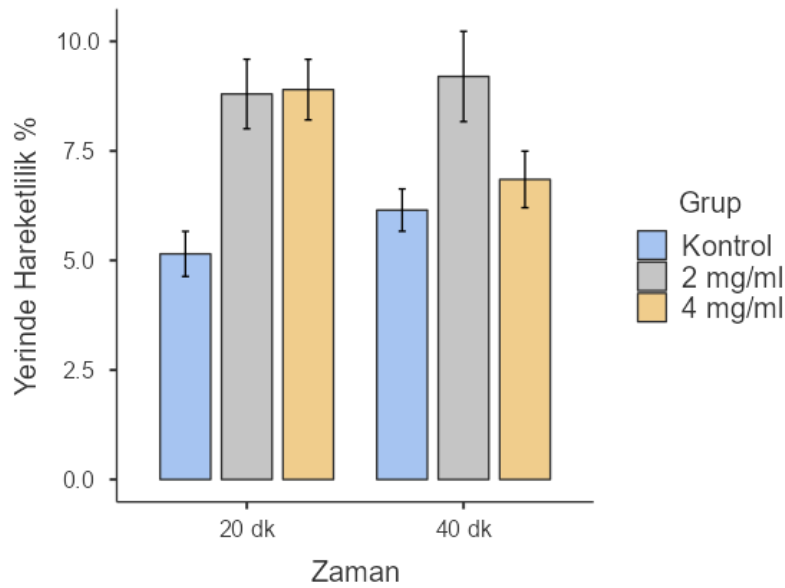
Çoklu Karşılaştırmalar

Zaman	Zaman	Fark	SE	p
20 dk	- 40 dk	0,22	0,39	0,579

Tablo 10: Yerinde hareketliliğin zaman etkileşimi (SE: Standart hata)

40. dakika yerinde hareketli sperm sayısındaki azalma 20. dakikaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p>0,05$) bulunmadı (Tablo 10).

Şekil 10'da kontrol grubu ile 2 mg/ml HfCl₄ grubunun yerinde hareketli sperm yüzdesinde zamanla artış olduğu görülmektedir. 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ise zamanla azalma saptanmıştır. Bunun sebebi ise 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ileri hareketli sperm sayısının diğer gruplara göre az olması ve bu dozda spermilerin daha fazla etkilenerek hareketsiz hale gelmeleridir. İleri hareketli yüzdeleri kontrol grubunda ortalama %43,9 ve 2 mg/ml HfCl₄ grubunda %27,7 iken 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ortalama %6'dır. Hareketsiz sperm yüzdeleri kontrol grubunda ortalama %50,5 ve 2 mg/ml HfCl₄ grubunda %63,3 iken 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ortalama %86'dır.



Şekil 10: Yerinde hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi (Ortalama±SS)

4.3.3 İleri Hareketlilik Değerleri

İleri hareketli sperm sayısının doza ($p<0,001$), zamana ($p<0,001$) ve doz*zamana ($p<0,001$) göre değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fixed Effect Omnibus Tests).

Çoklu Karşılaştırmalar

Grup	Grup	Fark	SE	p
Kontrol -	2 mg/ml	16,15	1,22	< ,001
Kontrol -	4 mg/ml	37,85	1,09	< ,001
2 mg/ml -	4 mg/ml	21,70	1,18	< ,001

Tablo 11: İleri hareketliliğin doz etkileşimi (SE: Standart hata)

Tablo 11’de 2 mg/ml HfCl₄ grubunda ileri hareketli sperm sayısındaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: 16,15, Standart Hata (SE): 1,22, $p<0,001$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ileri hareketli sperm sayısındaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (Fark: 37,85, Standart Hata (SE): 1,09, $p<0,001$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ileri hareketli sperm sayısındaki azalma 2 mg/ml HfCl₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: 21,70, Standart hata (SE): 1,18, $p<0,001$).

Çoklu Karşılaştırmalar

zaman	zaman	Fark	SE	p
20 dk	- 40 dk	5,82	0,38	< ,001

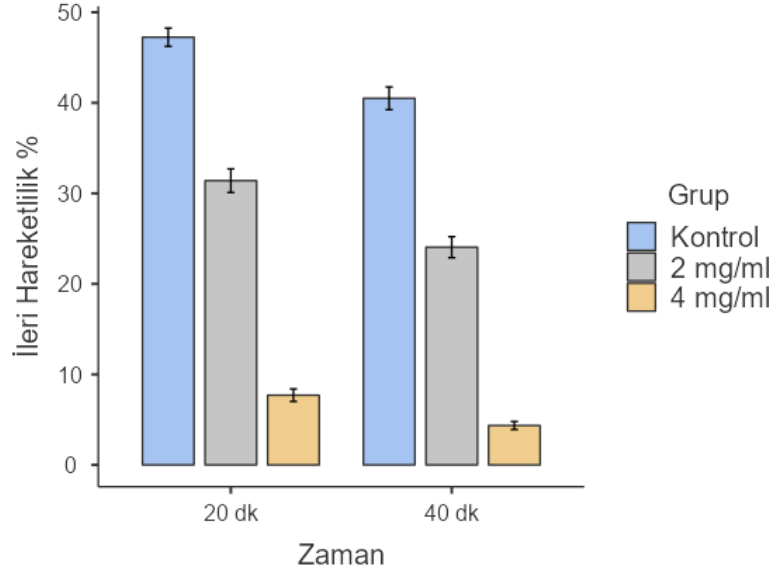
Tablo 12: İleri hareketliliğin zaman etkileşimi (SE: Standart hata)

40. dakika ileri hareketli sperm sayısındaki azalma 20. dakikaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulundu (Tablo 12).

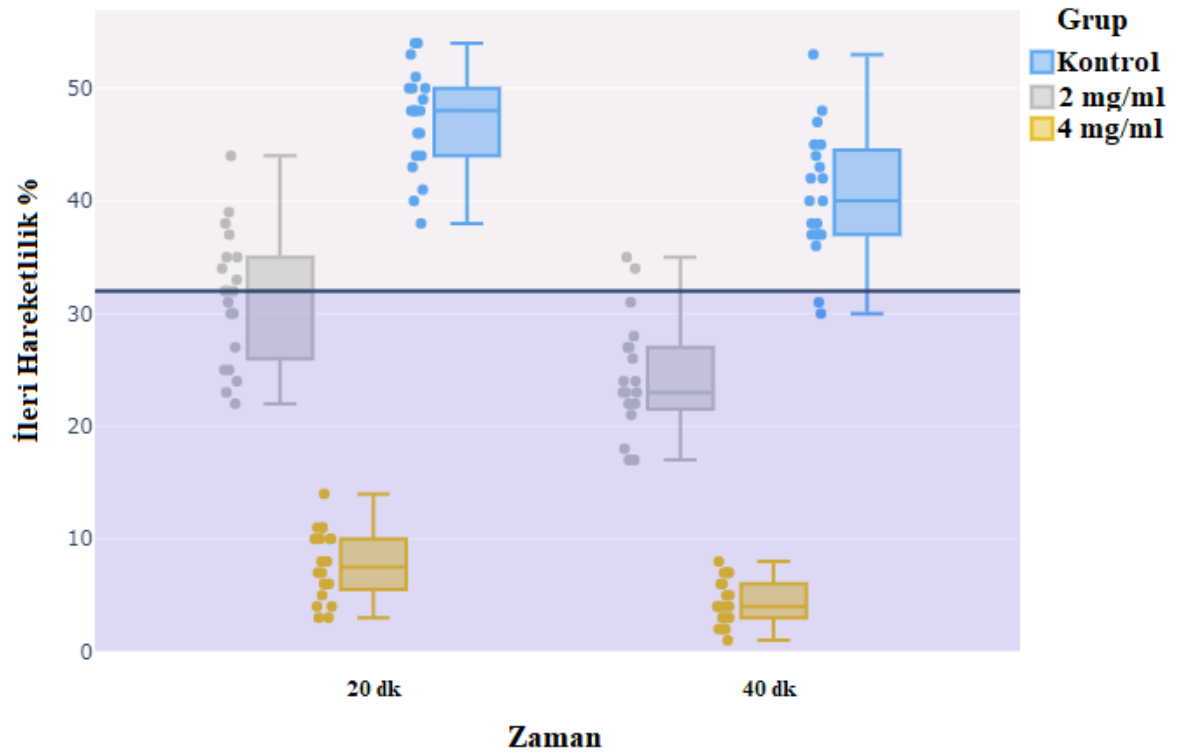
Şekil 11’de ileri hareketli sperm sayısının doz ve zaman arttıkça azaldığı görülmektedir. 4 mg/ml HfCl₄ grubunun ileri hareketli sperm sayısı kontrol grubuna göre ortalama %38, 2 mg/ml HfCl₄ grubuna göre ise %22 azalmıştır.

Şekil 12’de DSÖ 2010 kriterlerine kontrol grubu 20. dk ileri hareketlilik değerleri en düşük referans değerinin üzerindedir. 40. dakikada ise iki örnekten biri en düşük referans değerleri içerisinde iken diğeri (%30) en düşük referans değerlerinin altındadır. 2 mg/ml HfCl₄ grubu ileri hareketlilik değerleri çoğunlukla en düşük referans değerinin

altındadır. 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ise tüm örnekler en düşük referans değerinin altında görülmektedir.



Şekil 11: İleri hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi (Ortalama±SS)



Şekil 12: İleri hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişiminin DSÖ 2010 kriterlerine göre gösterilmesi (Noktaların her biri bir örneği temsil göstermektedir. Koyu mavi çizgi İleri hareketliliğin en düşük referans değerini (%32) göstermektedir.)

4.3.4 Toplam Hareketlilik Değerleri

Toplam hareketli sperm sayısının doza ($p<0,001$) ve zamana ($p<0,001$) göre değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Doz*zaman ($p=0,410$) etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Fixed Effect Omnibus Tests).

Çoklu Karşılaştırmalar

Grup	Grup	Fark	SE	p
Kontrol	- 2 mg/ml	12,80	1,30	< ,001
Kontrol	- 4 mg/ml	35,63	1,12	< ,001
2 mg/ml	- 4 mg/ml	22,80	1,60	< ,001

Tablo 13: Toplam hareketliliğin doz etkileşimi (SE: Standart hata)

Tablo 13’de 2 mg/ml HfCl₄ grubunda toplam hareketli sperm sayısındaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: 12,80, Standart Hata (SE): 1,30, $p<0,001$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda toplam hareketli sperm sayısındaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (Fark: 35,63, Standart Hata (SE): 1,12, $p<0,001$). 4 mg/ml HfCl₄ grubunda toplam hareketli sperm sayısındaki azalma 2 mg/ml HfCl₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fark: 22,80, Standart hata (SE): 1,60, $p<0,001$).

Çoklu Karşılaştırmalar

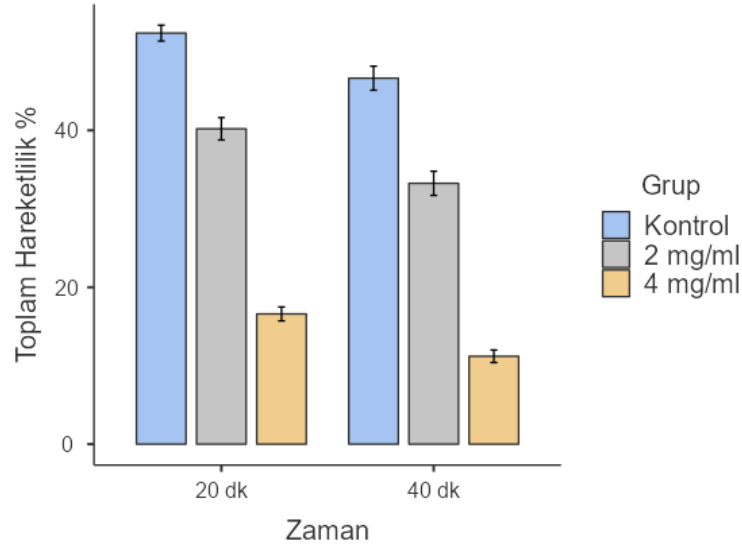
Zaman	Zaman	Fark	SE	p
20 dk	- 40 dk	6,03	0,49	< ,001

Tablo 14: Toplam hareketliliğin zaman etkileşimi (SE: Standart hata)

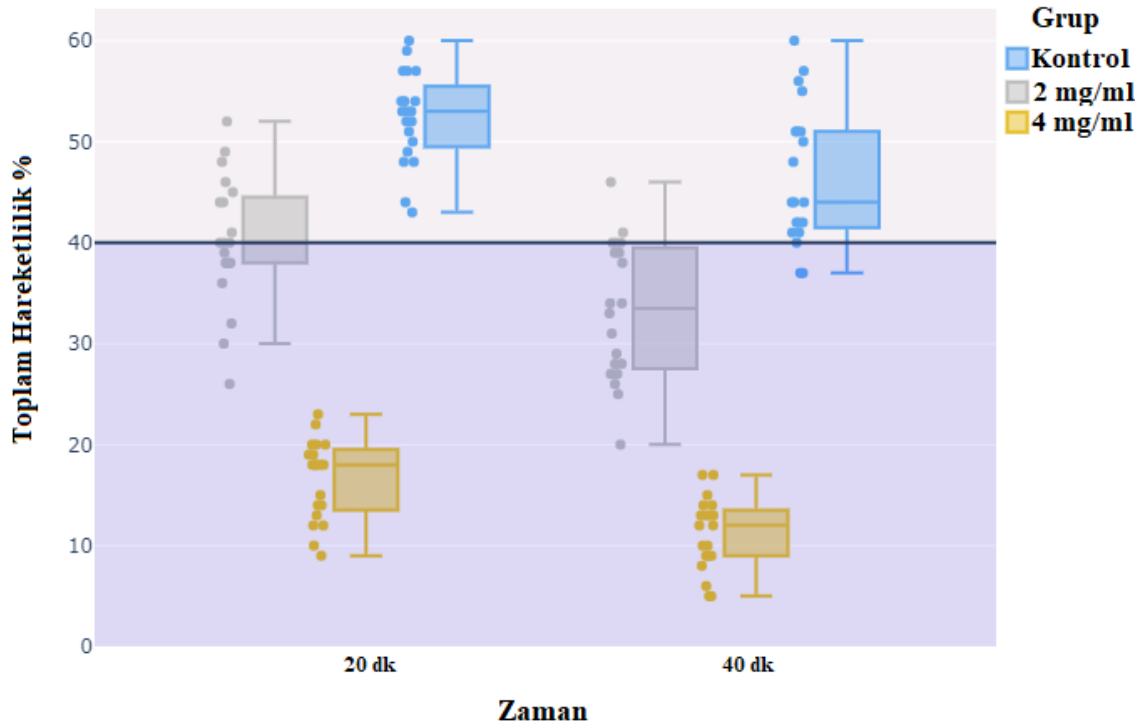
40. dakika toplam hareketli sperm sayısındaki azalma 20. dakikaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulundu (Tablo 14).

Şekil 13’de toplam hareketli sperm sayısının doz ve zaman arttıkça azaldığı görülmektedir.

Şekil 14’te DSÖ 2010 kriterlerine göre kontrol grubu 20. dk toplam hareketlilik değerleri en düşük referans değerinin üzerindedir. 40. dakikada ise iki örnek (%37) en düşük referans değerlerinin altındadır. 2 mg/ml HfCl₄ grubu toplam hareketlilik değerleri çoğunlukla en düşük referans değerinin altındadır. 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ise tüm örnekler en düşük referans değerinin altında görülmektedir.



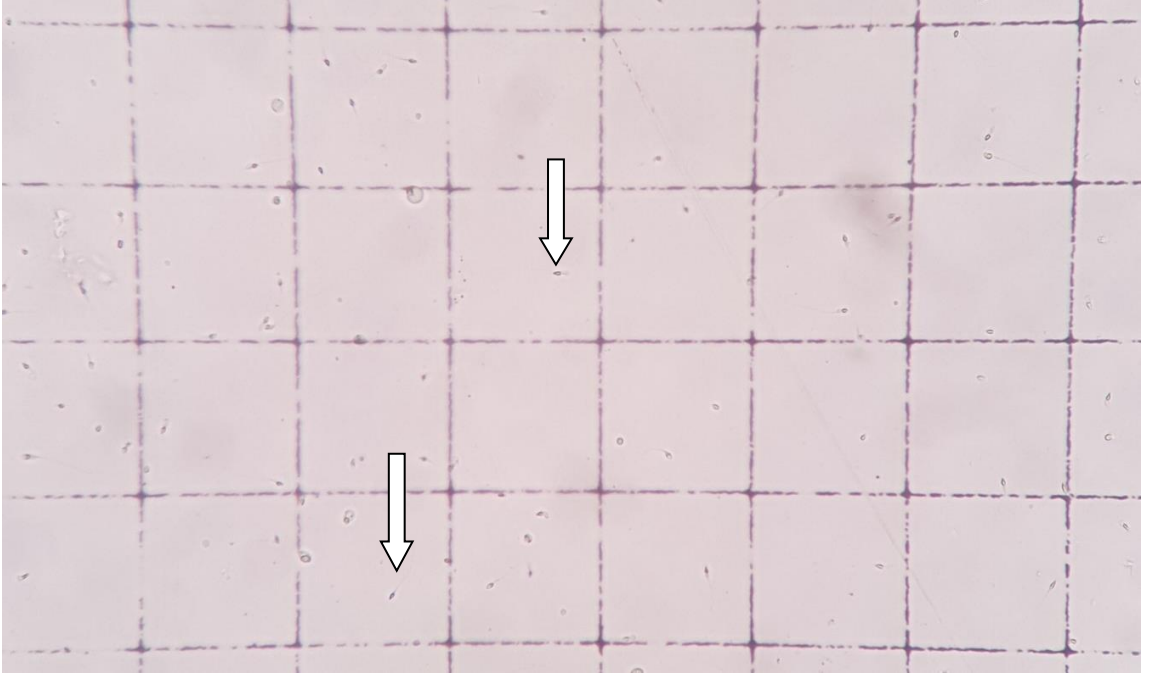
Şekil 13: Toplam hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişimi (Ortalama±SS)



Şekil 14: Toplam hareketliliğin kontrol ve deney gruplarındaki zamana bağlı değişiminin DSÖ 2010 kriterlerine göre gösterilmesi (Noktaların her biri bir örneği temsil göstermektedir. Koyu mavi çizgi toplam hareketliliğin en düşük referans değerini (%40) göstermektedir.)

Şekil 15'te kontrol grubu Makler görüntüsünde spermier görölmektedir. Beyaz oklar spermieri göstermektedir. 200x fiber optik büyütme ile görüntü elde edilmiştir.

Şekil 16'da 4 mg/ml HfCl₄ grubu Makler görüntüsünde spermier görölmektedir. Beyaz oklar spermieri göstermektedir. Yaygın çökeltier görölmektedir. Çökeltier hem Makler görüntüsünde hem de Eozin-Y boyamada (Şekil 7-8) görölmektedir. 200x fiber optik büyütme ile görüntü elde edilmiştir.



Şekil 15: Kontrol grubu Makler görüntüsü (Beyaz oklar spermleri göstermektedir. 200x fiber optik büyütme)



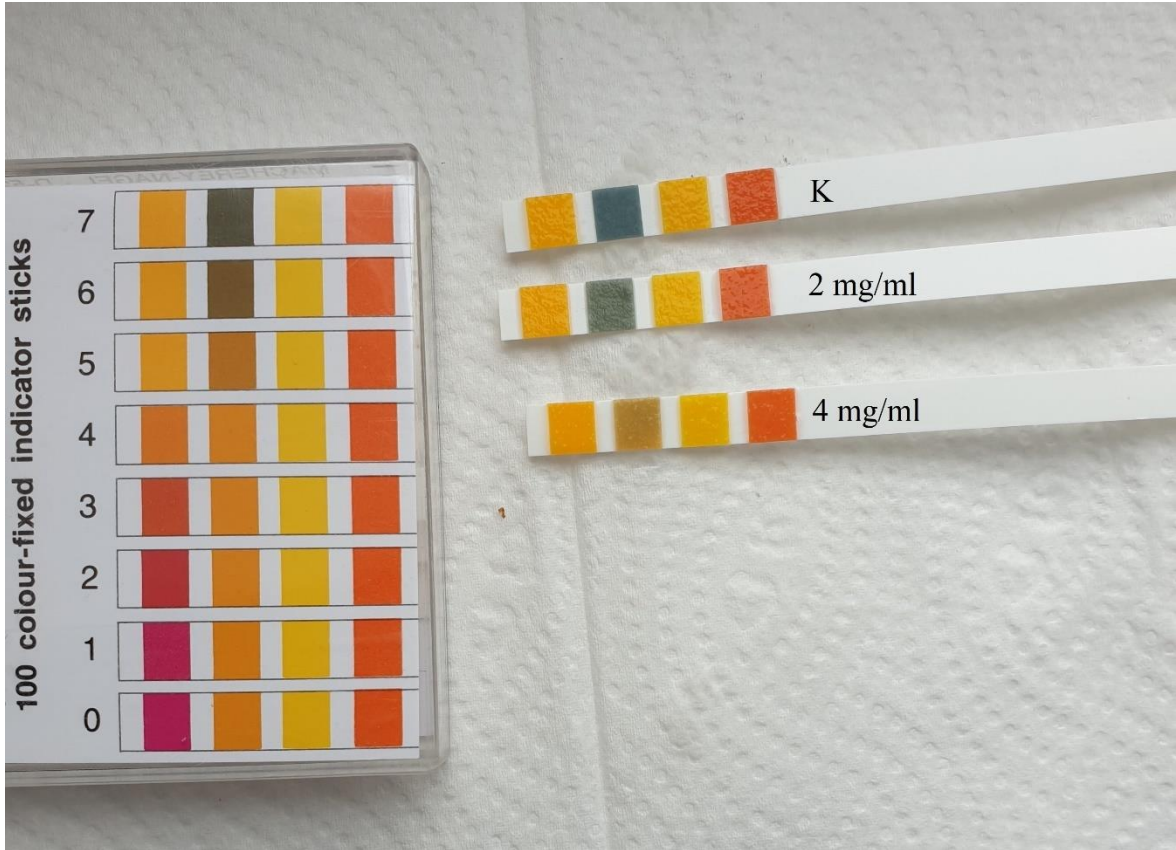
Şekil 16: 4 mg/ml HfCl₄ grubu Makler görüntüsü (Beyaz oklar spermleri göstermektedir. Maklerde çökeltiler görülmektedir. 200x fiber optik büyütme)

4.4 pH Ölçümü

Çalışmada canlılık ve hareketlilik değerlerine ek olarak yapılan manuel pH ölçümünde;

- Kontrol grubunun pH'sı sperm yıkama medyumunda belirtildiği gibi 8-8,5 pH aralıklarında,
- 2 mg/ml HfCl₄ grubunda pH 6-7,
- 4 mg/ml HfCl₄ grubunda ise pH 5 olarak gözlemlendi.

Şekil 17'de kontrol ve deney gruplarının manuel pH ölçüm sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 17: Manuel pH ölçümü

5. TARTIŞMA

Yapılan araştırmalarda, dünyanın birçok ülkesinde insan sperm kalitesinde azalma tespit edilmiştir (Carlsen ve ark., 1992; Roland ve ark., 2013) Doğurganlık oranlarındaki azalma ağır metaller de dahil olmak üzere çevresel toksik maruziyetlerle ilişkilendirilmiştir (Benoff ve ark., 2000; Telisman ve ark., 2000; Hernández-Ochoa ve ark., 2005; Swan, 2006; Benoff ve ark., 2009; Wong ve Cheng, 2011).

Çevresel etkenlerden plastik üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan Bisfenol A sperm hareketlilik, konsantrasyon ve morfolojisinde azalmaya sebep olmaktadır (Manfo ve ark., 2014). Yine plastiklerde sık kullanılan ftalatlar infertilite ve sperm kalitesinde azalma ile ilişkilendirilmiştir (Chiang ve ark., 2017). Hava kirliliğinin önemli sebeplerinden olan motorlu taşıt egzoz dumanının sperm kalitesini azalttığı saptanmıştır (Rengaraj ve ark., 2015). Orman yangınları, ticari atıkların yakılması, pestisit ve kağıt üretimi esnasında yan ürün olarak ortaya çıkan digoksinlerin sperm hareketliliği, morfolojisi ve sayısı üzerine olumsuz etkileri bulunmuştur (Galimova ve ark., 2015). Pestisit maruziyetinin sperm parametrelerini (hareketlilik, morfoloji ve konsantrasyon) olumsuz etkilediği saptanmıştır (Mehrpour ve ark., 2014). Ağır metallerden olan kadmiyum sigara ve besinlerle alınarak başta sperm hareketliliği olmak üzere spermatogenesis üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır (Kumar ve Sharma, 2019).

Umeyama ve arkadaşları (1986) yaptıkları çalışmada kadmiyum, bakır, molibden ve çinko gibi geçiş elementlerinin infertil erkeklerin semenlerinde en yüksek konsantrasyonlara sahip olduğunu göstermişlerdir. Normal sperm parametrelerine sahip olanlarda toksik etkileri olabileceği belirtilmiştir. Geçiş elementi olan hafniumun günümüzde kullanımının artması ve sperm hareket ve canlılığını olumsuz etkilemesi nedeniyle semen içerisinde varlığının tespiti infertilite ve diğer doku patolojileri açısından yararlı olacaktır.

Metal iyonlarından demir, manganez ve kurşunun 2, 4, 6 ve 8'inci saatlerde sperm motilitesi üzerine etkisine bakan Huang ve arkadaşları (2001) elementlerin konsantrasyonları arttıkça sperm motilitesinde azalma saptamışlardır. Motilitedeki azalmanın kontrol ve element gruplarında ilk 2 saatte daha keskin olduğu gözlenmektedir. Hafnium klorürle yaptığımız çalışmada asıl etkinin ilk 20 dk içerisinde ortaya çıktığını saptadık.

Hafniumun toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar genelde 2000 yılı öncesine dayanmakla birlikte sperm üzerindeki etkilerine dair bir çalışma rapor edilmemiştir.

Haley ve arkadaşları (1962) 86 adet fare üzerinde yaptıkları çalışmada hafnium klorürün intraperitoneal LD₅₀ dozunu 112 mg/kg olarak bulmuşlar. Çalışmada akut toksisite semptomlarının letarji ve ürinasyon olduğu saptanmış. Ölümünün genelde ilk 24 saat içerisinde meydana geldiği belirtilmiştir.

Altı erkek ve altı dişi sıçandan oluşan grupların diyetine 12 hafta boyunca %0,01, %0,1 veya %1 (yaklaşık 500 mg/kg vücut ağırlığı) hafnium tetraklorür eklendiğinde kan parametreleri (eritrosit, lökosit, hemoglobin, hematokrit), vücut ağırlığı ve sağkalım üzerinde hiçbir olumsuz etki görülmemiş. Histolojik olarak karaciğer, kalp, böbrek, akciğer, pankreas, dalak, adrenal bez ve ince barsak incelenmiş. %1 diyet düzeyinde hemen hemen tüm hayvanlarda ve daha düşük seviyelerde de sadece bazı hayvanlarda sadece karaciğerde vakuolizasyon ve granülasyon ortaya çıkmış. Hafnium tetraklorürün ayrıca gastrointestinal sistemde hafnium oksiklorüre dönüşmüş olabileceği belirtilmiştir (Haley ve ark., 1962).

Göze 0,1 mL %0,1 hafnium klorür (pH 2,1) damlatılması 6 tavşanın kornea, iris ve konjonktivasında 1-24 saat içerisinde tahrişe neden olmamış. 1 mg hafnium tetraklorürün direkt uygulamasını takiben 1 saat içerisinde üç tavşanda geçici tahriş ve kızarıklık gözlemlenmiş ve 24 saat sonunda hiçbir yan etki gözlenmemiş. Gözyaşı salgısının hafnium klorürün gözyaşı içerisinde ortaya çıkardığı hidroklorik asidi tamponladığı belirtilmiştir (Haley ve ark., 1962).

Altı tavşanın sağlam derisine 24 saat süreyle direkt 1 mg hafnium tetraklorür uygulanması, 3 gün süren ödem ve eriteme neden olmuş. Aşınmış tavşan derisine benzer şekilde uygulandığında 8-24 saat içerisinde ciddi tahriş ve ülserasyon görülmüş. 7 gün içerisinde ülserasyonun kas tabakasına ilerlediği saptanmış ve iyileşme gözlenmemiş. Sağlam ve aşınmış derideki farkın deri sıvısında ortaya çıkan hidroklorik aside bağlı olduğu belirtilmiştir (Haley ve ark., 1962).

Beş kobaydan oluşan gruplarda, %0,001 hafnium oksiklorürün intradermal enjeksiyonu hafif tahrişe neden olmuş. %1 ve daha yüksek konsantrasyonlarda skar oluşumu ile ciddi tahriş kaydedilmiştir (Haley ve ark., 1962).

İzole tavşan ve kobay ileumunda 10-200 mg hafnium klorür uygulaması barsak tonus ve kasılmalarında depresyona bağlı paraliziye neden olmuştur (Haley ve ark., 1962).

Kedilere uygulanan 0,5-2 mg/kg intravenöz hafnium klorür farmakolojik yan etki yapmazken, 5 mg/kg dozda hipotansiyona, 20 mg/kg dozda ise kardiyovasküler kollaps ve respiratuvar paraliziye bağılı ölüme neden olduğu saptanmıştır. Bu etkilerin atropin ve epinefrin ile geri döndürülemediği belirtilmiştir. Citrat ile kardiyovasküler kollapsın 60 mg/kg dozda meydana geldiği tespit edilmiştir. HfCl_4 kaynaklı asidik pH'ın bu etkilere sebep olmadığı belirtilmiştir (Haley ve ark., 1962). Çalışma dışında bizde hafnium klorürün kanın kıvamını arttırdığını gözlemledik.

20 farenin kulak lobuna salin içinde 0,02 mL %0,08 hafnium oksiklorürün (yaklaşık 0,8 mg/kg vücut ağırlığı) tek bir intradermal enjeksiyonu, lokal displazi ve hiperplaziye neden olmuş ve 2 ay sonra tüm hayvanlarda bir kondral kitle meydana gelmiştir (Shelley, 1973).

25 sağlıklı, 17 antrasilikoz ve 35 sarkoidoz tanılı insanlarda yapılan bir çalışmada tuzlu su içinde 1/10.000 hafnium oksiklorür çözeltisinin 0,02 mL intradermal enjeksiyonu, enjeksiyondan 9 ay sonrasına kadar kontrol edildiğinde 77 denekte hiçbir lokal reaksiyona neden olmamıştır (Shelley, 1958).

Zhou ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada düşük pH'ın sperm hareketliliği ve canlılığını olumsuz etkilediğini saptamışlar. %60 Percoll gradient ile santrifüj edildikten sonra yıkanan spermiler en son aşamada pH 5,2, 6,2, 7,2 ve 8,2 olan medyumlarda 15, 30, 60, 90 ve 120 dk inkübe edilmişler. En fazla pH 5,2'de olmak üzere asidik düzeylerde sperm hareketliliğinde ve canlılığında anlamlı azalma saptamışlar. Çalışmamızda manuel pH ölçümü ile hafnium klorürün asidik bir ortam oluşturmasının saptanması Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir.

4 mg/ml HfCl_4 grubunda hem eozin-y boyamasında hem de Makler kamerasında yaygın çökelti oluştu. Çökeltilerin oluşum sebebini ortaya çıkarmak için ileri çalışmalar gerekmektedir.

6. SONUÇ

Hafnium klorürün normospermik vakaların sperm viabilite ve motilite parametreleri üzerine etkisinin araştırılması başlıklı çalışmamızda elde edilen sonuçlar ve önerilerimiz kısaca şu şekildedir:

1. Günümüzde artan teknoloji ile gündelik hayatımızda hafnium alaşımları ile daha sık karşılaşacağımız aşikardır. Hafnium alaşımlarının biyo uyumlu olduğuna dair çalışmalar olmasına karşın yaptığımız çalışmada $HfCl_4$ 'ün doz arttıkça sperm motilite ve canlılığı üzerine olumsuz etkilerinin olduğu saptandı.
2. İnfertilite nedenleri incelenirken hafniumun göz ardı edilmemesi tavsiye edilir.
3. Sperm parametreleri alt sınırdaki normal olanların canlılık ve hareketlilik değerlerinin daha kısa sürede kötüleştiğini saptadık. DSÖ'e göre sınırdaki vakaların daha hassas olduğu öngörülebilir. Ancak akılda tutulmalıdır ki erkek sperm parametreleri yıldan yıla düşüş eğilimindedir.
4. Bu çalışma ile kullanıma giren aletlerde potansiyel bir tehlikenin varlığı ortaya konulmuştur. Ülke regulasyonlarının bu konuda hassasiyet göstermeleri halk sağlığı açısından önemlidir.
5. Hafniumun sperm parametreleri üzerine olan etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

hafnium affect on sperm motility

pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=hafnium+affect+on+sperm+motility

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

PubMed.gov

hafnium affect on sperm motility

Advanced Create alert Create RSS

User Guide

Sorted by: Best match Display options

MY NCBI FILTERS

TEXT AVAILABILITY

- ☐ Abstract
- ☐ Free full text
- ☐ Full text

ARTICLE ATTRIBUTE

- ☐ Associated data

ARTICLE TYPE

- ☐ Books and Documents
- ☐ Clinical Trial
- ☐ Meta-Analysis
- ☐ Randomized Controlled Trial

No results were found.

Your search was processed without automatic term mapping because it retrieved zero results.

hafnium affect on sperm viability

pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=hafnium+affect+on+sperm+viability

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

PubMed.gov

hafnium affect on sperm viability

Advanced Create alert Create RSS

User Guide

Sorted by: Best match Display options

MY NCBI FILTERS

TEXT AVAILABILITY

- ☐ Abstract
- ☐ Free full text
- ☐ Full text

ARTICLE ATTRIBUTE

- ☐ Associated data

ARTICLE TYPE

- ☐ Books and Documents
- ☐ Clinical Trial
- ☐ Meta-Analysis
- ☐ Randomized Controlled Trial

No results were found.

Your search was processed without automatic term mapping because it retrieved zero results.

7. KAYNAKLAR

- Abdullin ISh, Mironov MM, Garipova GI. Bakteritsidnye i biologicheski stoikiye pokrytiya dlia meditsinskikh implantov i instrumentov [Bactericidal and biologically stable coatings for medical implants and instruments]. Med Tekh. 2004 Jul-Aug;(4):20-2. Russian. PMID: 15455818.
- Aksoy E. ‘Erkek germ hücrelerinin morfolojisinin farklı histolojik boyalarla ışık mikroskobu düzeyinde değerlendirilmesi’ Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 2008 (Tez danışmanı. Doç Dr. T. Murad Aktan)
- Alafeef M, Moitra P, Dighe K, Pan D. Hyperspectral mapping for the detection of SARS-CoV-2 using nanomolecular probes with yoctomole sensitivity. ACS nano. 2021 Jul 19;15(8):13742-58.
- Amiri I, Ghorbani M, Heshmati S. Comparison of the DNA fragmentation and the sperm parameters after processing by the density gradient and the swim up methods. J Clin Diagn Res. 2012 Nov;6(9):1451-3.
- Andrade-Rocha, F. T. (2005). Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 43(11), 1203– 1210.
- Arıncı K., Elhan A., Anatomi, Güneş Tıp Kitabevleri. Ankara 2005: 322-337.
- AUA-American Urological Association. The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement (Revised 2010). Maryland, Education and Research Inc, 2010.
- Bedford JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biol Reprod. 1983 Feb;28(1):108-20.
- Beigi Harchegani A, Rahmani H, Tahmasbpour E, Shahriary A. Hyperviscous Semen Causes Poor Sperm Quality and Male Infertility through Induction of Oxidative Stress. Curr Urol. 2019 Sep;13(1):1-6.
- Benoff S, Hauser R, Marmar JL, Hurley IR, Napolitano B, Centola GM. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). Mol Med. 2009 Jul-Aug;15(7-8):248-62.
- Benoff S, Jacob A, Hurley IR. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. Hum Reprod Update. 2000;6(2):107–121.

- Bingham E., Cohrssen B., Patty's Toxicology, 6th Edition. Volume 5, 2012 by John Wiley & Sons, Chapter Thirteen
- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*. 1998 Oct 10;352(9135):1172-7.
- Bonvalot S, Le Pechoux C, De Baere T, et al. First-in-human study testing a new radioenhancer using nanoparticles (NBTXR3) activated by radiation therapy in patients with locally advanced soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2017;23(4):908–917.
- Bonvalot S, Rutkowski PL, Thariat J, et al. NBTXR3, a first-in-class radioenhancer hafnium oxide nanoparticle, plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with locally advanced soft-tissue sarcoma (Act.In.Sarc): a multicentre, Phase 2-3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(8):1148–1159.
- Boynukalın FK, Güven S, Günalp S. Sperm DNA Hasarı ve Üremeye Yardımcı Teknikler. *J Turk Soc Obstet Gynecol*. 2014, 1: 52-58.
- Buck Louis GM, Sundaram R, Schisterman EF, Sweeney A, Lynch CD, Kim S, Maisog JM, Gore-Langton R, Eisenberg ML, Chen Z. Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study. *Fertil Steril*. 2014 Feb;101(2):453-62.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992;305(6854):609–613.
- Casper, Robert F. et al. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertility and Sterility*, Volume 65, Issue 5, 1996, 972 - 976
- Çelik Ö. Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. İstanbul, Nobel Kitabevi, 2011, 57-63
- Çelik-Özenci Ç. Akkoyun A. Spermatogenez. İçinde: Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ramazan D. (Çeviri editörü). *Histology and Cell Biology*, Kierszenbaum AL., 1. Baskı, Ankara Palme Yayıncılık, 2006; 531-550.
- Chiang C, Mahalingam S, Flaws JA. Environmental contaminants affecting fertility and somatic health. *Semin Reprod Med*. 2017 May;35(3):241-249.
- Clavert A, Montagnon D, Cranz C, Rumpler Y. Soluble seminal fluid proteins from various animal species. *Arch Androl*. 1985;14:177-9.
- Coster, D., Hevesy, G. On the New Element Hafnium. *Nature* 111, 252 (1923).

- Cramer S.D., Covino B.S., ASM Handbook, Volume 13B: Corrosion: Materials, 2005, Materials Park, Ohio, p354-359
- Cui, D., Han, G., Shang, Y., Liu, C., Xia, L., Li, L., & Yi, S. (2015). Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: A systematic review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, 444, 29– 36.
- Davidson J.A., Titanium molybdenum hafnium alloys for medical implants and devices, US Patent 5954724 (Sept.21, 1999).
- De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*. 2005 May-Jun;11(3):205-14
- De Jonge Christopher, Barrat Christopher L. R., *The Sperm Cell, Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press 2006: 1-25.
- Drabovich, Andrei P., et al. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nature Rev Urol* 11.5 (2014): 278.
- Du Plessis SS, Gokul S, Agarwal A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jan 1;5:224-31.
- Elia, J., Delfino, M., Imbrogno, N., Capogreco, F., Lucarelli, M., Rossi, T., & Mazzilli, F. (2009). Human semen hyperviscosity: Prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects. *Asian J Androl*, 11(5), 609– 615.
- Eroschenko, V. P. *Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle (Dokuzuncu Baskı)*. (2001). Palme Yayıncılık. s287
- Esfandiari N, Burjaq H, Gotlieb L, Casper RF. Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a prospective study. *Fertil Steril*. 2008;90:1739-43.
- Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. Baskı İstanbul Tıp Kitabevi, 2016;333-354
- Galimova EF, Amirova ZK, Galimov ShN. Dioxins in the semen of men with infertility. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015 Oct;22(19):14566-9.
- Gartner P.L. ,Hiatt L.J. ,*Colour Atlas and Text of Histology*, 6th edition, 2014: 435-452
- Gökçe A. Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Turk Urol Sem*. 2011; 2: 1- 7.
- Haley T. J. et al., The toxicologic and pharmacologic effects of hafnium salts. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 4, 238–246 (1962).

- Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Unexplained male infertility: potential causes and management. *Hum Androl* 2011, 1:2-16.
- Hanson BM, Aston KI, Jenkins TG, Carrell DT, Hotaling JM. The impact of ejaculatory abstinence on semen analysis parameters: a systematic review. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Feb;35(2):213-220.
- Hatae T, Okuyama K, Fujita M. Visualization of the cytoskeletal elements in tissue culture cells by bloc-staining with hafnium chloride after rapid freezing and freeze-substitution fixation. *J Electron Microsc (Tokyo).* 1984;33(2):186-90.
- Haynes W.M., CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2014-2015, pp. 4–14.
- Henkel, R.R., Schill, WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 108 (2003).
- Hernández-Ochoa I, García-Vargas G, López-Carrillo L, Rubio-Andrade M, Morán-Martínez J, Cebrián ME, Quintanilla-Vega B. Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. *Reprod Toxicol.* 2005 Jul-Aug;20(2):221-8.
- Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol.* 2008;636:1-15.
- Heuser JE, Kirschner MW. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J Cell Biol.* 1980 Jul;86(1):212-34.
- Hoffmann C, Calugaru V, Borcoman E, et al. Phase I dose-escalation study of NBTXR3 activated by intensity-modulated radiation therapy in elderly patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity or oropharynx. *Eur J Cancer.* 2021;146:135–144.
- Hricak H, Filly RA. Sonography of the scrotum. *Invest Radiol.* 1983 Mar-Apr;18(2):112-21.
- Huang, Y.-L., Tseng, W.-C., & Lin, T.-H. (2001). In Vitro Effects of Metal Ions (Fe²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺) on Sperm Motility and Lipid Peroxidation in Human Semen. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 62(4), 259-267.
- Huret JL. Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Arch Androl.* 1986;16:97-109.
- Hurst F.J., Separation of Hafnium from Zirconium in Sulfuric Acid Solutions Using Pressurized Ion Exchange, Government Reports Announcements Index, Issue 17, 1981.

- Ikeda K, Inoue K, Kanematsu S, Horiuchi Y, Park P. Enhanced effects of nonisotopic hafnium chloride in methanol as a substitute for uranyl acetate in TEM contrast of ultrastructure of fungal and plant cells. *Microsc Res Tech*. 2011 Sep; 74(9): 825-30.
- Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*. 1979;31:531-7.
- Jungwirth, A., Diemer, T., Kopa, Z., Krausz, C., Minhas, S., & Tuornaye, H. (2018). EAU guidelines on male infertility. Arnhem, the Netherlands: EAU Guidelines Office.
- Kalaycı Ş. *Histoloji*. Bursa. Uludağ Üniversitesi Basımevi. 1986; 374-77.
- Kaler LW, Neaves WB. Attrition of human Leyding cell population with advancing age. *Anat Rec*. 1978;192:513-21.
- Kan Ö, Alkılıç A, Yüce T, Berker B. Açıklanamayan İnfertilitede Yönetim. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2014; 23(3): 506-18.<https://doi.org/10.17827/aktd.93154>.
- Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö. *Özel Histoloji Ders Notları*. Adana, Çukurova Üniversitesi Kitapevi, 2000.
- Kayıkçı MA, Çam HK, Akman Y, Erol A. Erkek İnfertilitesini Değerlendirmede Semen Analizinin Özellikleri ve Rolü. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002, 4(3): 35-38.
- Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology*. 1st Edition. Editor: Kierszenbaum AL. Missouri, Mosby, Inc., Çeviri editörü: Demir R. 2002;531-64.
- Kumar S, Sharma A. Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. *Reviews on Environmental Health*. 2019;34(4): 327-338.
- Lay MF, Richardson ME, Boone WR, Bo-dine AB, Thurston RJ. Seminal plasma and IVF potential. Biochemical of seminal plasma of males from in vitro fertilization couples. *J Assist Reprod Genet*. 2001;18:144-50.
- Leung ML, Gooding GA, Williams RD. High-resolution sonography of scrotal contents in asymptomatic subjects. *AJR Am J Roentgenol*. 1984 Jul;143(1):161-4.
- Liguori, Giovanni & Ollandini, Giangiacomo & Napoli, Renata & Mazzon, Giorgio & Petrovic, Miloš & Trombetta, Carlo. (2011). *Anatomy of the Scrotum*. 10.1007/174_2011_170.
- Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, et al. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol*. 2012;8(9):1167–1181.

- Manfo FP, Jubendradass R, Nantia EA, Moundipa PF, Mathur PP. Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2014;228:57-82.
- Marill J, Anesary NM, Zhang P, et al. Hafnium oxide nanoparticles: toward an in vitro predictive biological effect? *Radiat Oncol*. 2014;9:150.
- Marill J, Mohamed Anesary N, Paris S. DNA damage enhancement by radiotherapy-activated hafnium oxide nanoparticles improves cGAS-STING pathway activation in human colorectal cancer cells. *Radiother Oncol*. 2019;141:262–266.
- Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*. 2001 Jun; 22(11):1253-62.
- Mehrpour O, Karrari P, Zamani N, Tsatsakis AM, Abdollahi M. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol Lett*. 2014 Oct 15;230(2):146-56.
- Mendiola J, Moreno JM, Roca M, Vergara-Juárez N, Martínez-García MJ, García-Sánchez A, Elvira-Rendueles B, Moreno-Grau S, López-Espín JJ, Ten J, Bernabeu R, Torres-Cantero AM. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environ Health*. 2011 Jan 19;10(1):6.
- Menkveld R. Sperm morphology assessment using strict (tygerberg) criteria. *Methods Mol Biol*. 2013;927:39-50.
- Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Castagnola M, Marana R. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. *Mol Reprod Dev*. 2013 May;80(5):350-7.
- Mohammadi, S., Esposito, M., Cucu, M. et al. Tissue response to hafnium. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12, 603–611 (2001).
- Moore Keith L., TVN Persaud, Mark G. Torchia. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Çev. Hakkı Dalçık. 10. baskı, Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul 2016: p 13, 260-281.
- Mortimer, D., & Templeton, A. A. (1982). Sperm transport in the human female reproductive tract in relation to semen analysis characteristics and time of ovulation. *Reproduction*, 64(2), 401-408.
- Munro NC, Currie DC, Lindsay KS, Ryder TA, Rutman A, Dewar A, Greenstone MA, Hendry WF, Cole PJ. Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax*. 1994 Jul;49(7):684-7.

- NCEH. Centers for Disease Control and Prevention. Third national report on human exposure to environmental chemicals: executive summary. In Third national report on human exposure to environmental chemicals: executive summary 2005.
- Nielsen, R.H. and (2013). Hafnium and Hafnium Compounds. In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology
- Oatley J.M., R.L. Brinster, The germline stem cell niche unit in mammalian testes, *Physiological Reviews*, 92 (2012), pp. 577-595
- Oldereid NB, Thomassen Y, Attramadal A, Olaisen B, Purvis K. Concentrations of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. *J Reprod Fertil*. 1993 Nov;99(2):421-5.
- Ortiz-Dosal LC, Ángeles-Robles G, Kolosovas-Machuca ES. Use of hafnium(IV) oxide in biosensors. *J Immunoassay Immunochem*. 2018;39(5):471-484.
- Ovalle WK, Nahirney P. *Netter's Essential Histology*. 1st Edition. Editor: Ovalle WK. Çeviri editörleri: Muftuoglu S, Kaymaz F, Atilla P. Saunders Elsevier, 2009;377-98.
- Overstreet JW, Coats C, Katz DF, Hanson FW. The importance of seminal plasma for sperm penetration of human cervical mucus. *Fertil Steril*. 1980;34:569-72.
- Ozan H. Erkek genital sistemi anatomisi. *Ozan Anatomi*, 2. Baskı, Ankara, Klinisyen Tıp Kitabevleri, 2005;305-12.
- Özkavukcu, Sinan & Aras, Duru. (2017). Sperm Preparation Methods for IUI and IVF. *Türk Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Dergisi*. 1. 92-98.
- Pandruvada, S., Royfman, R., Shah, T.A. et al. Lack of trusted diagnostic tools for undetermined male infertility. *J Assist Reprod Genet* 38, 265–276 (2021).
- Pignedoli CA, Curioni A, Andreoni W. Anomalous behavior of the dielectric constant of hafnium silicates: a first principles study. *Phys Rev Lett*. 2007 Jan 19;98(3):037602.
- Ramazanoğlu Ş., Zirkonyum ve Zirkon, *SAU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 6. Cilt, 2. Sayı (Temmuz 2002)
- Rengaraj D, Kwon WS, Pang MG. Effects of motor vehicle exhaust on male reproductive function and associated proteins. *J Proteome Res*. 2015 Jan 2;14(1):22-37.
- Robertson SA, Sharkey DJ. Seminal fluid and fertility in women. *Fertil Steril*. 2016 Sep 1;106(3):511-9.

- Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royere D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod.* 2013;28:462–470.
- Ross HM, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile Çeviri Editörü: Barış Baykal* 6. baskı. 2017: 784-829.
- Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji.* Çev A.Can Basaklar. 9. baskı, Palme yayıncılık, Ankara 2005: 328-343.
- Satar DA, Gençdal S. Sperm Değerlendirmesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2013; 22(4):532-42.doi: 10.17827/ aktd.29343.
- Şeftalioğlu Aysel. *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, Dördüncü Baskı.* Alp Ofset Matbaacılık, Ankara 2003: 14.
- Shahrokhi SZ, Salehi P, Alyasin A, Taghiyar S, Deemeh MR. Asthenozoospermia: Cellular and molecular contributing factors and treatment strategies. *Andrologia.* 2020 Mar;52(2):e13463.
- Shelley W. B., Chondral dysplasia induced by zirconium and hafnium. *Cancer Res.* 33(2), 287–292 (1973).
- Shelley WB, Hurley HJ, Mayock RL, Close HP, Cathcart RT. Intradermal tests with metals and other inorganic elements in sarcoidosis and anthraco-silicosis. *J Invest Dermatol.* 1958 Dec;31(6):301-3.
- Swan SH. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl.* 2006 Feb;29(1):62-8; discussion 105-8.
- Telisman S, Cvitković P, Jurasović J, Pizent A, Gavella M, Rocić B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect.* 2000 Jan;108(1):45-53.
- Toshimori Kiyotaka. *Dynamics of the Mammalian Sperm Head.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag 2005:1-10.
- Umeyama T, Ishikawa H, Takeshima H, Yoshii S, Koiso K. A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 1986 Sep;46(3):494-9.
- Üstüner M. Nonobstruktif azoospermik ve klinik varikoseli olan hastalarda varikoselektominin motil sperm eldesi ve spermatogenez üzerine etkileri. Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kocaeli, 2014 (Tez Danışmanı: Prof. Dr.Ali Gökalp).

- Vaquero-Aguilar C, Jiménez-Melendo M, Torres-Lagares D, Llana-Blasco O, Bruguera A, Llana-Blasco J, García-Calderón M, Velázquez-Cayón R, Gutiérrez-Pérez JL. Zirconia implant abutments: microstructural analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012 Jul-Aug;27(4):785-91.
- Vayena E, Rowe P, Griffin P. Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction. Report of a meeting on Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction held at WHO Headquarters In; 2002 17-21 September 2001; Geneva, Switzerland; 2002 p22-27.
- WHO (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (5th ed.). Geneva, Switzerland: WHO.
- Wong EW, Cheng CY. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 May;32(5):290-9.
- Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of azoospermia. *Spermatogenesis*. 2014 Jan 1;4(1):e28218.
- Young B, JW Healy. Wheater's Functional Histology A Text Atlas; 40th edition, 2000.
- Zhang P, Darmon A, Marill J, Mohamed Anesary N, Paris S. Radiotherapy-activated hafnium oxide nanoparticles produce abscopal effect in a mouse colorectal cancer model. *Int J Nanomed*. 2020;15:3843–3850.
- Zhang P, Marill J, Darmon A, Mohamed Anesary N, Lu B, Paris S. NBTXR3 Radiotherapy-Activated Functionalized Hafnium Oxide Nanoparticles Show Efficient Antitumor Effects Across a Large Panel of Human Cancer Models. *Int J Nanomed*. 2021 Apr 12;16:2761-2773.
- Zhang YH, A Campbell S, Karthikeyan S. Finite element analysis of hollow out-of-plane HfO₂ microneedles for transdermal drug delivery applications. *Biomed Microdevices*. 2018 Feb 17;20(1):19.
- Zhou J, Chen L, Li J, Li H, Hong Z, Xie M, et al. (2015) The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. *PLoS ONE* 10(7): e0132974.
- Zikrin RB, Hardy MP. Leydig cell function. *Infertility in the male*, 3rd Edition. Lipshultz LI, Howards SS. St Louis, Mosby. 1997;59-70.

8. EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın gönüllü

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesinde bireysel çalışma amaçlı yürüttüğümüz ‘Hafnium klorür’ un normospermik vakaların sperm viabilite ve motilite parametreleri üzerine etkisinin araştırılması’ 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. Bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Araştırmaya yaş aralığını 20-55 yaş aralığı olarak belirlediğimiz 20 kadar gönüllü alınacaktır. Araştırmanın çalışma süresi 6 aydır.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz izniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için sperm analizi sonrasında rutinde imha edilen sperm hücrelerini hafnium klorür adlı element ile muamele ederek canlılık ve hareketlerindeki değişiklikleri analiz edeceğiz.

Araştırmadan dolayı göreceğiniz 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 amaçlarda 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 çekme 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.

Tarih:

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 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:

Telefon:

İmza:

Katılımcı ile görüşen araştırmacı

Adı, soyadı:

Görevi:

Telefon:

İmza: