



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN ETKİNLİĞİNİN
FOSFOLİPAZ C ZETA, ANILIN MAVİSİ VE
ULTRASTRÜKTÜREL OLARAK KARŞILAŞTIRMALI
İNCELENMESİ**

Dr. ELİF KERVANCIOĞLU DEMİRCİ
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Şule Çetinel

2017 – İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Tez Sahibi : Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ
Tez Başlığı : Sperm Hazırlama Yöntemlerinin Etkinliğinin Fosfolipaz C Zeta,
Anilin Mavisi Ve Ultrastrüktürel Olarak Karşılaştırmalı İncelenmesi
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
Sınav Tarihi : 27/07/2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

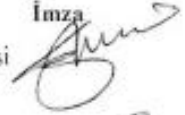
Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Şule ÇETİNEL

Kurumu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Şule ÇETİNEL
Prof. Dr. Feriha ERCAN
Prof. Dr. Serap ŞİRVANCI
Prof. Dr. Seyhan SOLAKOĞLU
Prof. Dr. Cem AKBAL

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 10/08/2017 tarih ve 48 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Gökşel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü


-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

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

Dr. Elif Kervancıoğlu Demirci

 İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim esnasında her türlü ilgisini ve desteğini gördüğüm, karşıma çıkan her zorluğun aslında kolay olduğuna inanmamı sağlayan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Şule Çetinel'e; eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, bilimin huzurlu bir çalışma ortamında en güzel meyveleri vereceğini öğreten çok kıymetli hocalarım başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Feriha Ercan, Prof. Dr. Serap Şirvancı, Doç. Dr. Dilek Akakın ve tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Cem Akbal'a, Histoloji ve Embriyolojiyi daha fakülte yıllarında sevmemi sağlayan Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu ve Doç. Dr. Ünal Uslu'ya, tez çalışmam boyunca Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadınoğum Anabilim Dalı ÜYTEM'de ilgisini ve yardımını esirgemeyen Dr. Naciye Erol ve pozitif yaklaşımları ile bütün ekibe, istatistik konusunda desteğiyle yanımda olan Prof. Dr. Gülnaz Nural Bekiroğlu'na, yol boyunca her konuda hem bilgi hem dostlukları ile yanımda olan sevgili Yrd. Doç. Dr. Naziye Özkan ve Dr. Özlem Tuğçe Çilingir'e, geçirdiğim tüm bu süre boyunca birlikte çalışma şerefini duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarıma, yardımlarından ve dostluklarından dolayı Arş. Gör. Mazhar Özkan ve Arş. Gör. Hüsniye Hacıoğlu Bay'a, elektron mikroskopi laboratuvarının temel direği Tek. Yücel Öztürk'e ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ışık mikroskopi laboratuvarının sorumluları Tek. Belgin Halıcı Terzi ve Hemş. Figen Akıncı'ya, beni yaşamları boyunca gurur kaynağı yapmış, bugün meslektaşları olabilmekten onur duyduğum, azim ve çalışkanlıklarıyla bana örnek olan babam Prof. Dr. M. Ertan Kervancıoğlu ve annem Yrd. Doç. Dr. Gülnaz Kervancıoğlu'na, varlığıyla bana neşe kaynağı olan kardeşim Eren Kervancıoğlu'na, manevi kardeşim Dr. Elisabeth Zissler'e, sınırsız sevgisi, sabrı ve desteğiyle bana güç veren eşim Yük. Müh. Kutan Demirci'ye teşekkür ederim...

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-2504160174 numaralı proje ile ve YÖK'ün ÖYP doktora öğrencilerine verdiği destek ile desteklenmiştir.

2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	
BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
1. TÜRKÇE ÖZET.....	1
2. İNGİLİZCE ÖZET.....	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi ve Spermatogenez.....	6
4.2. Semen	9
4.2.1. Sperm morfolojisi.....	10
4.2.1.1. Morfolojik değerlendirmesi.....	11
4.2.1.2. Sperm defektleri.....	12
4.2.1.3. Teratozoospermi indeksi.....	14
4.2.2. Sperm kromatini ile fertilitte ilişkisi.....	14
4.3. Erkek İnfertilitesi.....	15
4.4. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	16

4.5. Fertilizasyon ve Sperm.....	18
4.6. Fosfolipaz C Zeta (PLCZ).....	19
4.7. Oksidatif Stres ve Sperm.....	20
5. GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1. Örnek Hazırlanması.....	25
5.2. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	25
5.2.1. Yüzdürme yöntemi.....	25
5.2.2. Yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme yöntemleri.....	27
5.2.2.1. Yoğunluk gradyan yöntemi.....	27
5.2.2.2. Yoğunluğa yüzdürme yöntemi.....	28
5.3. Anilin Mavisini Boyaması.....	29
5.4. Fosfolipaz C Zeta Boyaması.....	29
5.5. Papanicolaou Boyası.....	30
5.6. Işık Mikroskopi Değerlendirmesi.....	30
5.6.1. Sperm sayısı ve hareketlilik.....	30
5.6.2. Sperm morfolojisi.....	31
5.6.3. DNA matüritesinin değerlendirilmesi.....	32
5.7. Floresan Mikroskopi Değerlendirmesi.....	32
5.8. Geçirimli Elektron Mikroskopi Takibi ve Değerlendirmesi.....	32
5.9. İstatistiksel Analiz.....	33
6. BULGULAR	34
6.1. Hareketlilik Bulguları	35

6.2. Morfoloji Bulguları.....	36
6.3. DNA Matüritesi.....	44
6.4. Fosfolipaz C Zeta Bulguları.....	50
6.5. Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları.....	54
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	66
8. KAYNAKLAR	73
9. ETİK KURUL ONAYI.....	81
10. ÖZGEÇMİŞ.....	82

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Tez çalışmasına dahil edilen 16 vakanın ve semenlerinin genel özellikleri

Tablo 2: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası total hareketli sperm yüzdesi

Tablo 3: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası normal morfolojili sperm yüzdesi

Tablo 4: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası Anilin mavisi boyanan sperm yüzdesi

Tablo 5: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası PLCZ boyanan sperm oranları



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İnsan testisinin sagital kesiti

Şekil 2: Spermatogenez

Şekil 3: Spermiyogenez

Şekil 4: Sperm başı ve organizasyonu

Şekil 5: İnsan sperminin anormal formlarından bazılarının şematik çizimi.

Şekil 6: Fosfolipaz C zetanın çalışma mekanizması

Şekil 7: Yüzdürme yöntemi

Şekil 8: Yoğunluk gradyan yöntemi

Şekil 9: Yoğunluğa yüzdürme yöntemi

Şekil 10: Neubauer lamı

Şekil 11: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası total hareketli sperm yüzdesi

Şekil 12: Normal morfolojili sperm yüzdesi ortalama ve standart sapmaları

Şekil 13: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası Anilin mavisi boyanan sperm yüzdesi

Şekil 14: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası PLCZ boyanan sperm oranı ortalama ve standart sapmaları

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1-6: Papanicolaou boyası, semen.

Resim 7-11: Papanicolaou boyası, yüzdürme yöntemi uygulanmış sperm.

Resim 12-13: Papanicolaou boyası, yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış sperm.

Resim 14: Anilin mavisi ile boyanmış yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış örnek.

Resim 15: Anilin mavisi ile boyanmış yoğunluğa yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek.

Resim 16: Anilin mavisi ile boyanmış yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek.

Resim 17: Anilin mavisi ile boyanmış yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış örnek.

Resim 18-19: PLCZ immunfloresan boyaması

Resim 20: Yüzdürme uygulanmış örneğin yarı ince kesitinin Toluidin mavisi boyalı mikrografi.

Resim 21: Yoğunluk gradyan uygulanmış örneğin yarı ince kesitinin Toluidin mavisi boyalı mikrografi.

Resim 22: Yoğunluğa yüzdürme uygulanmış örneğin yarı ince kesitinin Toluidin mavisi boyalı mikrografi.

Resim 23-29: Elektron mikrograf, yüzdürme yöntemi uygulanmış sperm.

Resim 30-31: Elektron mikrograf, yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış sperm.

Resim 32-33: Elektron mikrograf, yoğunluğa yüzdürme uygulanmış sperm.

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

°C	Santigrad Derece
ARS	Aşırı Rezidüel Sitoplazma
ART	Yardımcı Üreme Teknikleri
Ca ²⁺	Kalsiyum
cP	Centipoise, viskozite birimi
DAG	Diaçilgliserol
DGW	Yoğunluk (Dansite) Gradyan Santrifüjlemesi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dk	Dakika
FITC	Fluorescein isothiocyanate
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IP ₃	İnositol Trifosfat
IUI	İntrauterin İnseminasyon
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
KOK	Kumulus Oosit Kompleksi
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
ml	Mililitre
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
nm	Nanometre
OAD	Oosit Aktivasyon Bozukluğu

OAF	Oosit Aktivasyon Faktörü
OS	Oksidatif Stres
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PIP ₂	Fosfotidilinositol 4,5 Bifosfat
PLC	Fosfolipaz C
PLCZ	Fosfolipaz C Zeta
ROS	Reaktif oksijen radikalleri
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SDI	Sperm Anomali İndeksi
sn	Saniye
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling
ÜYTE	Üremeye Yardımcı Tedaviler
ÜYTEM	Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri
ZP	Zona Pellusida

1. TÜRKÇE ÖZET

Sperm Hazırlama Yöntemlerinin Etkinliğinin Fosfolipaz C Zeta, Anilin Mavisi ve Ultrastrüktürel Olarak Karşılaştırmalı İncelenmesi

Dr. Elif Kervancıoğlu Demirci

Prof. Dr. Şule Çetinel

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Üremeye yardımcı tedavi yöntemleri (ÜYTE) evli çiftlerin %10'unun sorunu olan infertilitede günümüzde yaygınlıkla uygulanmaktadır. Ancak deneme başına gebelik oranı hala %40'ların altındadır. Bu sebeple ÜYTE'de rutin kullanılan sperm hazırlama yönteminin seçiminde optimizasyona gereksinim duyulmaktadır. Amaçlanan, yardımcı üreme teknikleri uygulanması sırasında rutin kullanılan sperm hazırlama yöntemlerine ek olarak modifiye yoğunluğa yüzdürme yönteminin etkinliğinin rutin semen parametrelerine, DNA olgunluğuna, fertilizasyon sırasında oosit içindeki Ca^{2+} salınımlarını sağlayan ve oosit atıvasyon faktörü olan spermdeki fosfolipaz C zeta (PLCZ)'ya ve spermin ince yapısına etkilerini inceleyerek belirlemektir.

Gereç ve yöntem: İnfertilite polikliniğine başvuran 20 erkek hastanın semenine rutin semen analizi sonrası yüzdürme, yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme yöntemleri uygulandı. Hareketli sperm oranı, Anilin mavisi boyaması, Papanicolaou boyaması ve PLCZ immunfloresan boyası yapıp kalan örneklerle geçirimli elektron mikroskopi (TEM) incelemesi için elektron mikroskopi takibi yapıldı.

Bulgular: Yoğunluğa yüzdürme sonrası gözlenen hareketlilikteki ve PLCZ boyanma oranında artış istatistiki olarak yoğunluk gradyana göre anlamlı bulunurken yüzdürmeyle arasında bir fark gözlenmedi. Normal sperm oranlarında yoğunluğa yüzdürme, yüzdürmeden iyi iken; DNA olgunluğunda yöntemler arasında istatistiksel bir fark gözlenmedi. TEM ile yüzdürmede kuyruk anomalisinin, yoğunluk gradyanda baş anomalisinin, yoğunluğa yüzdürmede her ikisinin de az olduğu ayrıca yoğunluğa yüzdürmede normal ve normale yakın spermde artış olduğu dikkati çekti.

Sonuçlar: Yoğunluğa yüzdürmenin, yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemleriyle kıyaslandığında sadece yoğunluk gradyan yöntemine göre daha hareketli ve oosit aktivasyon faktörü içeren sperm elde etmesine rağmen diğer parametrelerdeki iyileşmenin istatistiksel anlamlı olmaması örnek sayısının azlığına bağlıdır. Bu tezde çalışılan yoğunluğa yüzdürme yönteminin ümit vaat eden bir yöntem olduğu ancak üzerinde çalışılması gerektiği düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: Sperm yıkama, Yüzdürme, Yoğunluk Gradyan, Fosfolipaz C Zeta, Elektron Mikroskopi

2. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)

Comparative Study of Effectiveness of Sperm Preparation Methods with Phospholipase C Zeta, Aniline Blue and Ultrastructural Analyses

Dr. Elif Kervancıoğlu Demirci

Prof. Dr. Şule Çetinel

Histology and Embryology Department

Aim: Nowadays, %10 of couples suffer from infertility and assisted reproductive techniques (ART) are widely applied. However, pregnancy rate per trial is below 40%, and optimization is needed. The aim of this thesis is to investigate the efficacy of three different sperm preparation methods used in the application of ART with routine semen parameters, DNA maturity, phospholipase C zeta(PLCZ) of sperm, which initiates Ca^{2+} oscillations during fertilization, so is the oocyte activation factor, and with the sperm ultrastructure.

Material and Methods: Semen samples of 20 male patients who applied to the fertility clinic were analysed routinely and prepared with swim-up, density gradient washing(DGW) and modified swim-down. Motility, Papanicolaou staining, Aniline blue staining and PLCZ immunofluorescent staining were performed. The remaining samples were examined with transmission electron microscopy(TEM).

Results: The motility and PLCZ staining rates of modified swim-down were statistically higher than DGW. Normal sperm rate of modified swim-down was better than of swim-up. There was no significant difference on DNA maturity found between the methods. TEM showed, decrease of tail anomalies with swim-up, decrease of head anomalies with DGW, both anomalies decreased and normal and subnormal sperms increased with modified swim-down.

Conclusion: Modified swim-down showed to select motile sperms and sperms with oocyte activation factor better than DGW. Nonsignificancy of other parameters is thought to be due to small sample size. It is thought that modified swim-down used in this thesis is a promising method but it should be studied.

Key Words: Sperm washing, Swim-up, Dansity Gradient, Phospholipase C Zeta, Electrone Microscopy

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezine (ÜYTEM) başvuran hastalara yapılan tanısal fonksiyon testleri, intrauterin inseminasyon (IUI) ve yardımcı üreme teknikleri (YÜT) için alınan semen örneğinden sperm eldesi için spermilerin seminal plazmadan ayrılması gerekmektedir (WHO, 2010).

Seminal plazma, fizyolojik olarak spermilerin servikal mukusa penetrasyonuna yardımcı olmaktadır (Overstreet ve ark., 1980). Doğal ilişki esnasında semenin içindeki sadece hareketli spermatozoonlar servikal mukustan geçerken hem seminal plazmadan ayrılmakta hem de aktive olmaktadır. Ovulasyonla birlikte sadece bu kapasite olmuş sperm kumulus oosit kompleksine (KOK) gider ve döllenmeyi gerçekleştirir. Klinikte de; doğal seleksiyona benzer sperm ayıklamak için yani hücre döküntülerinden, germ dışı hücrelerden, ölü spermilerden arınarak yüksek oranda hareketli ve normal morfolojili hücreleri elde etmek için sperm, seminal plazmadan ayrıştırılır (WHO, 2010). Bu amaçla günümüzde basit yıkama, yoğunluk gradyan yöntemi ve doğrudan yüzdürme (swim-up) yöntemleri rutinde en sık kullanılan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından onaylanmış yöntemlerdir.

Sperm hazırlama tekniği seçilirken semen analizi sonucuna göre sperm sayısı ve morfolojisine bakılarak karar verilmektedir (Canale ve ark., 1994). Örneğin yüzdürme tekniği sıklıkla normal kriterlere yakın semen örneklerinde tercih edilirken; oligo- asteno- veya teratozoospermi vakalarında yoğunluk gradyan tekniği önerilmektedir (WHO, 2010). Fakat sperm hazırlama yöntemlerinin spermin oosit aktivasyonuna ve fertilizasyona etkisi yeterince çalışılmamış bir konudur (Kashir ve ark., 2011).

Yüzdürme (swim-up) tekniği; semen kültür medyumu ile karıştırılıp santrifüj edilmesini takiben, pelletin üzerine kültür medyumu eklenerek hareketli spermilerin yüzdürülüp sadece hareketli spermilerin elde edilmesidir (Mortimer, 1994; Mortimer, 1994; WHO, 2010). Yöntem sayıca az sperm elde edilmesini sağlamasına rağmen hareketliliğe (motiliteye) göre bir ayırım yaptığı için semendeki toplam hareketli sperm yüzdesinin düşük olduğu vakalarda in vitro fertilizasyon (IVF) veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için elverişlidir (WHO, 2010).

Yoğunluk gradyan yönteminde silika kaplı silan içeren kolloidal yapıdaki yoğunluk gradyanları, hücreleri dansitelerine göre ayırır. Semen santrifüjlenir ve spermler gradyan solüsyonu içinden geçip tüpün dibinde yumuşak bir pellet oluşturur. Böylece normal yapıdaki spermler, diğer hücre tiplerinden (lökositler, germ dışı hücreler ve dejeneratif germ hücreleri) ve döküntülerden ayrılmıştır ve yüksek hareketli spermlerin elde edilmesi sağlanır (WHO, 2010).

Yoğunluğa yüzdürme yöntemi; tezde uygulanan diğer bir yöntem olup, aşağı yüzdürme (swim-down) metodunun bir modifikasyonudur ve yoğunluğa doğru spermlerin yüzmesi mantığına dayanmaktadır.

Önemi son on yılda fark edilen, insanda sperm başında lokalize bir protein olan Fosfolipaz C Zeta (PLCZ, PLC ζ) memelilerde oosit aktivasyon faktörü olarak anılmaktadır (Young ve ark., 2009).

PLCZ yokluğu, sitozoldeki Ca²⁺ salımını engeller böylece embriyo gelişiminde ilk basamak olan oosit aktivasyonu meydana gelemez (Yoon ve ark., 2008). ICSI'de başarı %70'lere kadar çıkabilse de, hiç fertilizasyon oluşmaması durumu ICSI sikluslarının %1-5'inde görülmektedir; yani PLCZ eksikliği varsa buna uygun tedavi yöntemleri uygulanabilme ihtimali olasıdır (Kashir ve ark., 2010). Muhtemel başka bir soru da ICSI'de morfolojik olarak iyi görünen spermler seçilmesine rağmen, fertilizasyonun oluşmaması durumunun fonksiyonel bir araştırma yapılmadığından kaynaklanıp kaynaklanmayabileceğidir. PLCZ'nın toplam seviyesi, lokalizasyonu ve pozitifliği parametrelerinin ICSI başarısı ile orantılı olduğuna dair yapılmış güncel bir çalışma da mevcuttur (Yelumalai ve ark., 2015). Ayrıca PLCZ lokalizasyonunun fertil erkeklerin ejakulatlarında değişik olabilmesi bireylerin veya ejakulatların oosit aktivasyon kapasitelerinin fertil popülasyonda bile birbirinden farklı olabileceği ihtimalini düşündürmektedir (Young ve ark., 2009).

Spermin elektron mikroskopi değerlendirmesi, semene uygulanan işlem esnasında kullanılan santrifüj ve diğer kimyasallar nedeni ile oluşabilecek vakuolizasyon, membran bozuklukları ve mitokondri hasarlarının incelenmesini sağlar. Morfolojiyi ince yapısal olarak değerlendirmek; sperm anomalilerini ışık mikroskobuna kıyasla daha doğru ve ayrıntılı verir ve YÜT sonuçları bu ince yapısal sperm anomalilerine dayanarak tahmin edilebilir. Bunun yanı sıra spermin nükleer anomalilerinin, DNA fragmantasyonu ve matüritesinin IVF sonuçlarını etkilediği

rapor edilmiştir. Klinikte sık kullanılan yoğunluk gradyan yöntemi veya yüzdürme yöntemlerinin anormal nükleer yapıli spermeleri azalttığı rapor edilmiştir ve bu sebeple tezde uygulanan yoğunluğa yüzdürme yöntemi standart yöntemlerle kıyaslandı (Kotwicka ve ark., 2007; Visco ve ark., 2010).

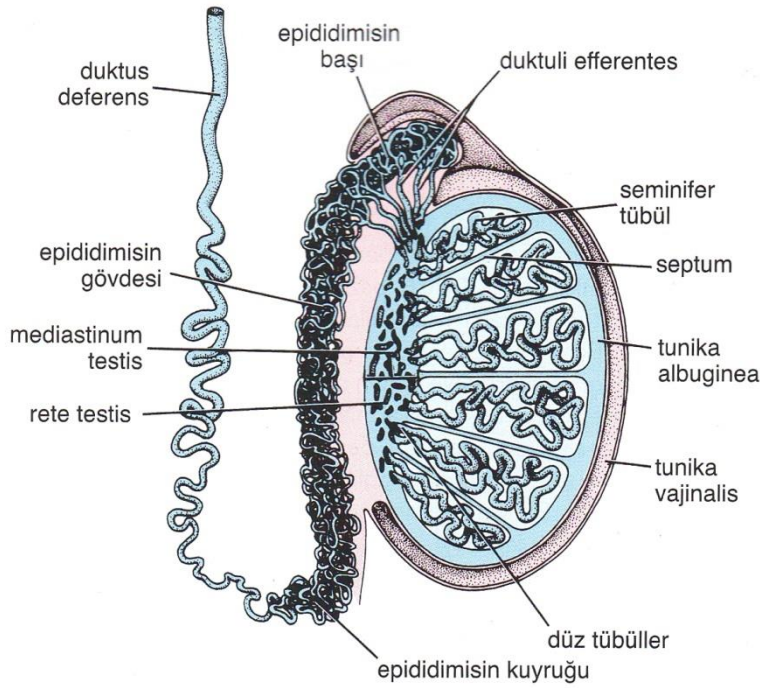
Tezin sınırlarını rutinde kabul görmüş teknikler ve onların modifikasyonları oluşturmaktadır. Ancak bu teknikler çoğunlukla morfolojik verimlilikleri açısından karşılaştırıldığında literatürde fonksiyonel veya ince yapısal değerlendirme açısından eksik kalmaktadır. Fosfolipaz C Zeta'nın oosit aktivasyon faktörü olması nedeniyle sperm hazırlama yöntemlerinin Fosfolipaz C Zeta pozitif spermi seçicilikleri bakımından ve sağlam DNA'ya sahip spermi seçiciliklerine bakılarak karşılaştırılması tezin konusunu oluşturmaktadır. Bilimde bugün gelinen durum, üremeye yardımcı tedavilerin başarısının rutin tekniklere yenileri eklenerek veya rutinde kullanılan yöntemlerin yeni parametreler ile sorgulanarak geliştirilmesi gerektiği yönündedir.

Tezin konusu ve kapsamı itibarıyla bu açığın sperm hazırlama yöntemleri açısından doldurulması planlandı. Tezin özgün değeri, sperm hazırlama yöntemlerinin ve modifikasyonunun daha önceden kullanılmış morfolojik değerlendirme yöntemlerine ek bir parametre getirerek fonksiyonel değerlendirmeyi yapacak olan oosit aktivasyon faktörünün de eklenip yapılmasıdır. Bilime katkısı, ÜYTE esnasında rutinde kullanılan yıkama yöntemlerini klasik morfolojik parametrelere ek olarak DNA fragmentasyonu, oosit aktivasyon faktörü tayini ve elektron mikroskopi incelemeleri ile yapmak, böylece morfolojik olduğu kadar fonksiyonel olarak da semeni en iyi hazırlayan yöntemi bulmak, literatürdeki güncel fonksiyonel değerlendirme eksikliğini doldurmak ve klinik kullanım için en uygun sperm hazırlama yöntemini belirlemektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi ve Spermatogenez

Erkek üreme sistemi; testisler, genital kanallar, aksesuar bezler ve penisten oluşur (Şekil 1). Testisin ana fonksiyonu hormonları ve spermi üretmektir. Latince tohum anlamına gelen semen, testislerde üretilen sperm, aksesuar bezlerden ve genital kanallardan üretilen salgılardan oluşur ve kadın üreme sistemine penis aracılığı ile giriş yapar.



Şekil 1: İnsan testisinin sagittal kesiti (Ross ve Pawlina, 2006: 784 - 828)

Testis kalın bağ dokusu yapısında olan tunica albuginea ile sarılıdır. Bu kapsülün altında gevşek damar tabakası olan tunica vasculosa bulunur. Bu tabaka testisin damar yapılarından zengin ve arasında Leydig hücrelerini barındıran interstisyel bağ dokusu yapıda stroması ile birleşir. Bu bağ dokusu lifleri, testisin uzun ve kıvrımlı tübülleri olan seminifer tübülleri destekler. Seminifer tübüller özelleşmiş çok katlı germinal epitel adı verilen epitel ile döşelidir. Bu epitel spermatojenik hücre serisi ve Sertoli hücrelerinden oluşur. Bazal membrana komşu yerleşimdeki immatür spermatojenik hücreler olan spermatogoniaları, lümene doğru

sırasıyla primer spermatozoidler, sekonder spermatozoidler, spermatidler ve kuyrukları lümenine uzanan spermatozoa izler.

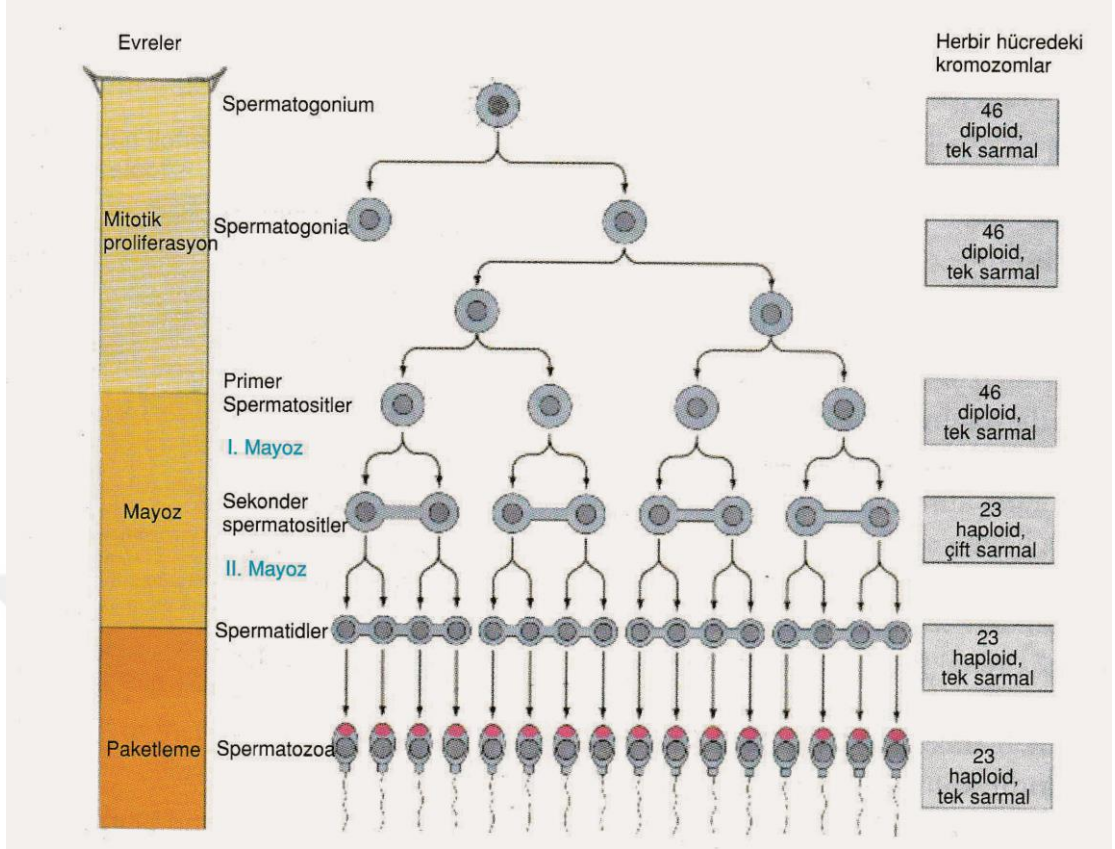
Ductuli efferentes mediastenden kaynaklanır ve testisin üst arka yüzünde bulunur; rete testisi ductus epididimise bağlar. Kanalin lümeninin karakteristik olarak düzensiz bir görünümü vardır ancak bazal yüzü düz bir görünümdeydir. Döşeyici epitel tek katlı değişen şekillerde uzun silyalı ve kısa silyasız hücrelerden oluşur. Bazal membranın altında düz kas lifleri bulunur. Ductus epididimis bağ dokusu ile sarılı uzun kıvrımlı tübüllerdir. Her bir tübül düz kas lifleri ile sarılıdır. Hem lümen hem de bazal yüzü düz görünümündedir. Tübül epitel uzun silindirik uzun hareketsiz stereosilyalı esas hücrelerden ve küçük bazal hücrelerden oluşan yalancı çok katlı epitelidir. Burada depolandıkları için, ductus epididimisin lümeninde olgun spermatozoalar görülür.

Ductus deferensin dar ve düzensiz bir lümeni, ince bir mukozası, onu çevreleyen uzunlamasına, enlemesine ve uzunlamasına tabakalı kalın düz kas ve adventisya bulunur. Lümen yalancı çok katlı stereosilyalı silindirik epitel ile çevrelenmiştir.

Prostat bezi, düz kas lifleri, kollajen ve elastik liflerden oluşan fibromusküler stromanın içindeki sekretuar tübüloasiner bezlerden oluşur. Bez içeriği yaşla birlikte dairesel birikimler göstererek sekretuar asinüs içine prostat taşı olarak birikir.

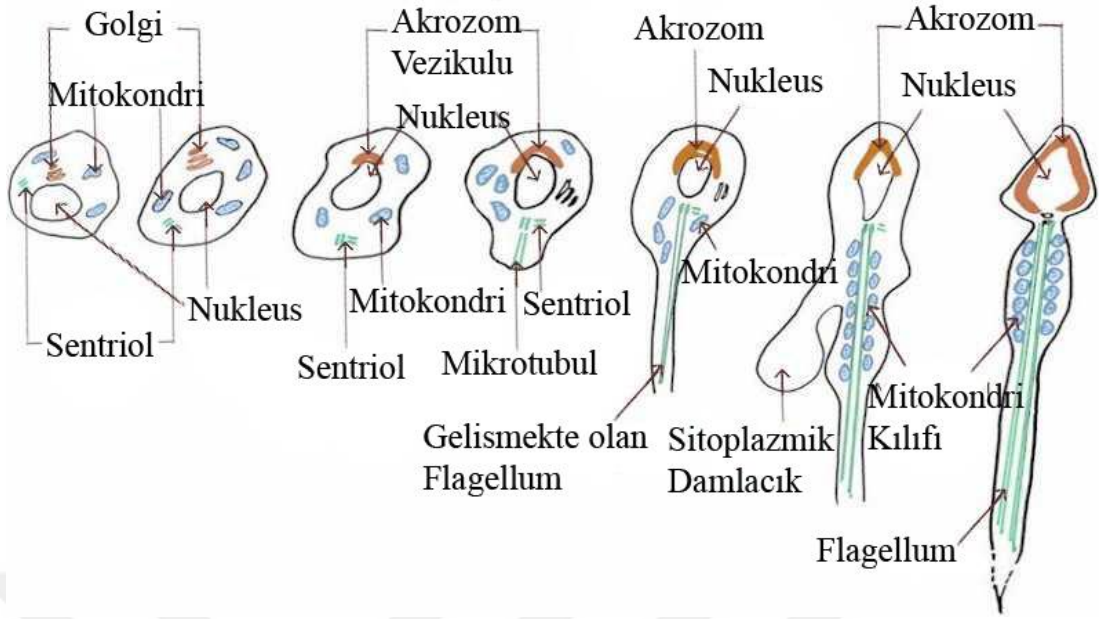
İki tane olan seminal veziküller, düzensiz lümenli çok kıvrımlı uzun cisimler ya da keseler olarak tanımlanabilir. Bez, kompleks primer kıvrımlar ve onlardan dallanan sekonder kıvrımlardan oluşur. Epitel kısa yalancı çok katlı ve bazal hücreli ve kısa silindirik ve ya kübik hücrelerden oluşur. Dışta uzunlamasına düz kas tabakası ve en dışta da adventisya ile sarılıdır.

Penis üç adet silindirik erektil dokunun (corpus cavernosum ve spongiosum) ve üretranın deri ile sarılmasından oluşur. Penil üretranın büyük kısmı yalancı çok katlı silindirik epitel ile döşeli iken, glans peniste çok katlı yassı epitele dönüşür. (Eroschenko ve Di Fiore, 2013)



Şekil 2: Spermatogenez (Delilbaşı, 2008)

Spermatogenez spermin (spermatozoon) olgunlaşması sürecidir. Primordiyal hücreler puberteye kadar uykudadırlar. Spermatogenez ergenlikteki gonadotropinlerin artması başlatır. Spermatisitogenez, mayoz ve spermiyogenez olmak üzere üç evreden oluşur. Spermatisitogenez, spermatogonyumun primer spermatisitlere farklılaşmasıdır. Ardından meydana gelen birinci mayotik bölünme bu primer spermatisitin diploid kromozomunun haploid kromozoma indirgenmesidir, sekonder spermatisit oluşur ve bu ikinci mayotik bölünme ile spermatidleri meydana getirir. Spermiyogenez de spermatidlerin olgun spermatozoaya farklılaşmasıdır (Gartner ve ark., 1998) (Şekil 2).



Şekil 3: Spermiyogenez

(<https://instruction.cvhs.okstate.edu/histology/mr/HiMRP4.htm>)

Spermiyogenezin (Şekil 3) golgi fazı, kepek aşaması, akrozomal faz ve olgunlaşma fazı olmak üzere dört evresi vardır. Spermiyogenezde: nükleus uzar, baştaki kromatin kondanse olur. Golgi aparatı nükleusun lümene bakan yüzünde (modifiye bir lizozom olan) akrozomal veziküle dönüşür. Sentriolden flagellum büyür. Mikrotübülleri flagellumun bir parçasını oluştururlar. Mitokondriyer orta parçanın etrafında kümelenirler. Fazla artık sitoplazma rezidüel cisim olarak atılır. Sitoplazmik köprüler kırılır ve spermier Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübüllerin lümeninde serbest hale gelirler. Spermatogoniumdan olgun spermatozoon hücreesine dönüşüm takribi 74 gün sürer (Sadler, 2011: 27-30).

4.2. Semen

Semen; sperm ihtiva eden seminal sıvıya denir ve içerik olarak sperm ve epididimis, duktus deferens, prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerden gelen salgı ile birlikte alkali bir yapıya sahiptir (Ross ve Pawlina, 2006: 784 - 828). Toplam semen miktarı 2-6 ml olmakla birlikte, bunun yalnızca %5'ini testislerin ürettiği sperm oluşturur (WHO, 2010).

Seminal sıvının % 65-75'i seminal veziküller tarafından üretilir ve içeriği amino asitler, sitrat, enzimler, flavinler, sperm hücreleri için temel enerji kaynağı olan

fruktoz, fosforilkolin, dişide yabancı olan sperme karşı olan bağışıklık yanıtı baskılamak için prostaglandinler, proteinler ve C vitamininden oluşur. Seminal sıvının %25-30'unu oluşturan prostat salgısı asit fosfataz, sitrik asit, fibrinolisin, prostat spesifik antijen, proteolitik enzimler, sperm hücrelerindeki DNA içeren kromatininin stabilizasyonuna yardım eden ve eksikliğinde spermatogenezin etkilendiği çinkoyu bulundurur. Seminal sıvının <%1'ını oluşturan bulboüretal bezlerin salgısı galaktoz, spermin vajina ve serviks boyunca hareketliliğini artıran ve spermlerin semenin dışına difüzyonunu engelleyen ve semene jelimsi bir yapı kazandıran mukus, (Litre bezlerinin de salgılanmasına katıldığı) Cowper sıvısı ve sialik asitten oluşur. (Ross ve Pawlina, 2006: 784 - 828)

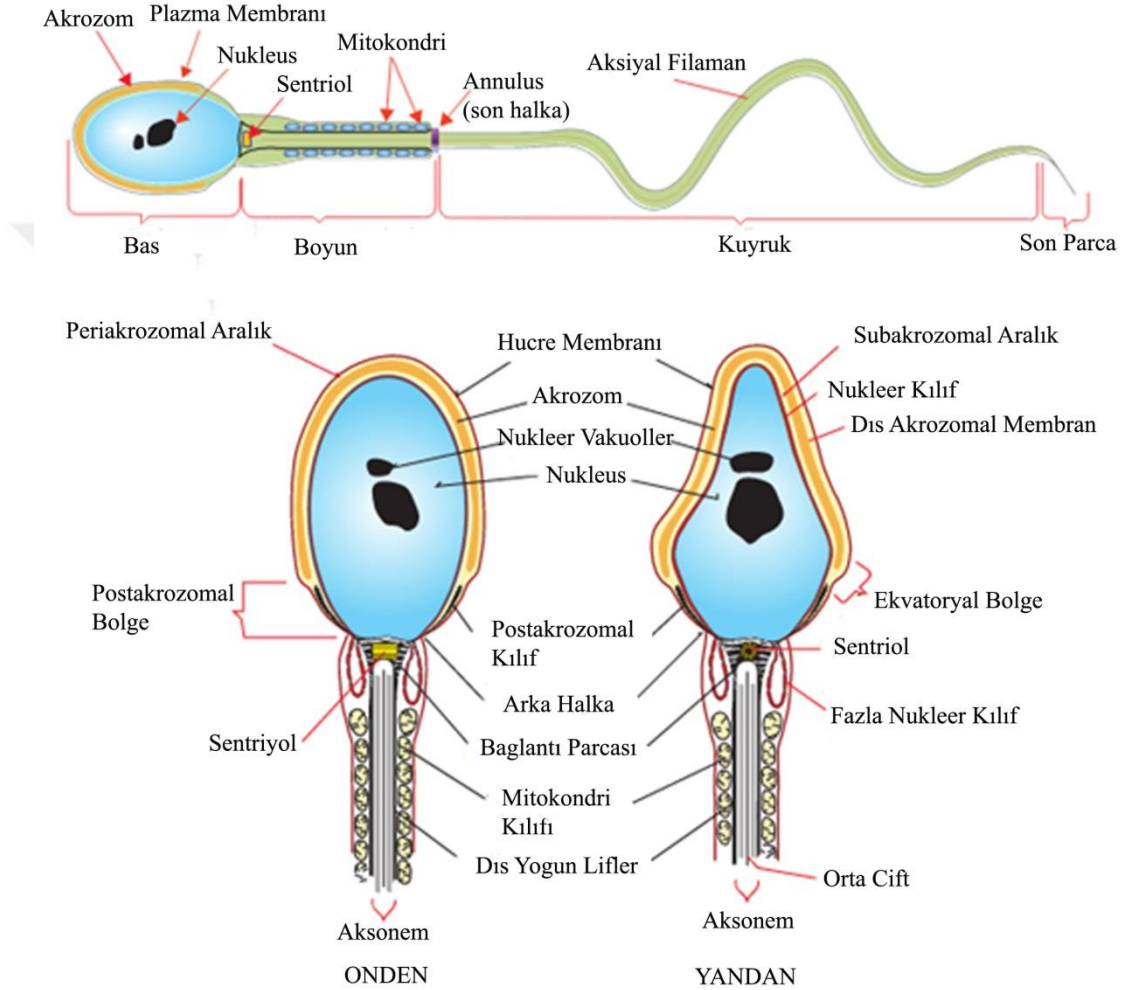
Semenin ortalama hacmi 3,4 ml, pH'sı 7,7, viskozitesi 3-7cP, ozmolaritesi 354 mOsm olmakla birlikte; 0,171 g protein, 18 mg sitrat, 10,2 mg sodyum, 9.25 mg fruktoz, 4,83 mg klorid, 3.71 mg potasyum, 3,47 mg glukoz, 2,11 mg laktik asit, 1,53 mg üre, 0.938 mg kalsiyum, 0,561 mg çinko, 0,374 mg magnezyum içerir (Owen ve Katz, 2005).

4.2.1. Sperm morfolojisi

Sperm; baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden oluşmaktadır. Uzunluğu yaklaşık 60 µm, boyu 4-5 µm ve eni 3 µm'dir. Baş ve kuyruk bölümleri dıştan plazma membranı ile sarılıdır (Ross ve Pawlina, 2006: 784 - 828). (şekil 4)

Sperm başı, dışı plazma membranı ile sarılmış olan çekirdek ve önünde akrozomdan oluşur. Akrozom proteazlar, asit fosfatazlar, hyalüronidaz, nöraminidaz, aril sülfataz, tripsine benzer bir proteaz olan akrozini bulundurur (Gartner ve Hiatt, 2007). Boyun veya bağlantı parçası yaklaşık 5µm uzunlukta olup; burada çekirdeğe tutunan proksimal sentriyol ve kuyruğun merkezindeki aksonemin kaynaklandığı distal sentriyol bulunur. Spermin kuyruğu flagellum yapılı, dış yoğun liflerle sarılı merkezde 9+2 mikrotübül dizilimli aksonemden meydana gelir. Kuyruk, mitokondrilerin bulunduğu orta parça ve fibröz bir kılıfın sardığı esas parçadan oluşur. Orta parça yaklaşık 5µm uzunlukta olup; 9+2 mikrotübüllü aksonem, onu çevreleyen dokuz dış yoğun lif ve dışındaki mitokondriyal sarmal kılıftan oluşur. Son halka da denilen annulus; mitokondriyal sarmalın altında, orta ve esas parçalar arasındaki yoğun halkadır. Esas parça yaklaşık 45µm uzunlukta olup; merkezdeki

aksonem, etrafında dış yoğun liflerle, dışta uzanan iki adet kolona tutunmuş fibroz iskelet kılıftan oluşur ve en uzun bölümdür. Fibröz kılıf ve dış yoğun lifler spermin öne hareketi sırasında iskelet oluşturan keratin proteinini içerir. Son parça yaklaşık 5µm uzunlukta olup; son 0,5-0,1 µm’de sonlanan 9+2 mikrotübüllü aksonem ve onu saran plazma membranından meydana gelen kısa bölümdür (Gartner ve Hiatt, 2007; Kierszenbaum, 2007).



Şekil 4: Sperm başı ve organizasyonu (Standring, 2015)

4.2.1.1. Spermin morfolojik değerlendirmesi

Baş, boyun, orta, ana/esas ve son parçadan oluşan spermin normal kabul edilebilmesi için; pratikte baş ve boyun “baş” olarak değerlendirilirken, orta ve

ana/esas parçalar “kuyruk” olarak değerlendirilir –çünkü son parça küçük olduğu için zor ayırt edilir- ve bu iki bölümünün normal olması gerekmektedir.

Sperm başı ortalama uzunluğu 4,1 µm, genişliği 2,8 µm, uzunluğun genişliğe oranı yaklaşık olarak 1,5’tur (WHO, 2010). DNA’yı içerir, korur ve fertilizasyon esnasında onu oosite aktarır. Sperm başı kondanse elektron yoğun haploid nükleusu, önünde akrozomu ve dışında plazma membranını ihtiva eder.

Baş oval şekilde ve düzenli sınırlıdır, ayrıca %40-70’ini kaplayan bir akrozom bulunur (WHO, 2010). Akrozom büyük vakuol veya küçük iki vakuol içermemeli aynı zaman da bu vakuollerin kapladığı alan sperm başının %20’sini geçmemelidir ve postakrozomal bölgede herhangi bir vakuol bulunmamalıdır (WHO, 2010).

Orta parça düzgün sınırlı, ince ve yaklaşık baş uzunluğunda olmalıdır. Ekseni başın ekseni ile aynı hizadadır. Muhtemel rezidüel sitoplazmanın sperm başının üçte birinden daha büyük alan kaplaması anormal olarak kabul edilir (WHO, 2010).

Ana parça, orta parçadan daha ince olmakla birlikte uzunluğu boyunca aynı genişlikte kalmalıdır. Uzunluğu 45µm, yani başın yaklaşık 10 katıdır.

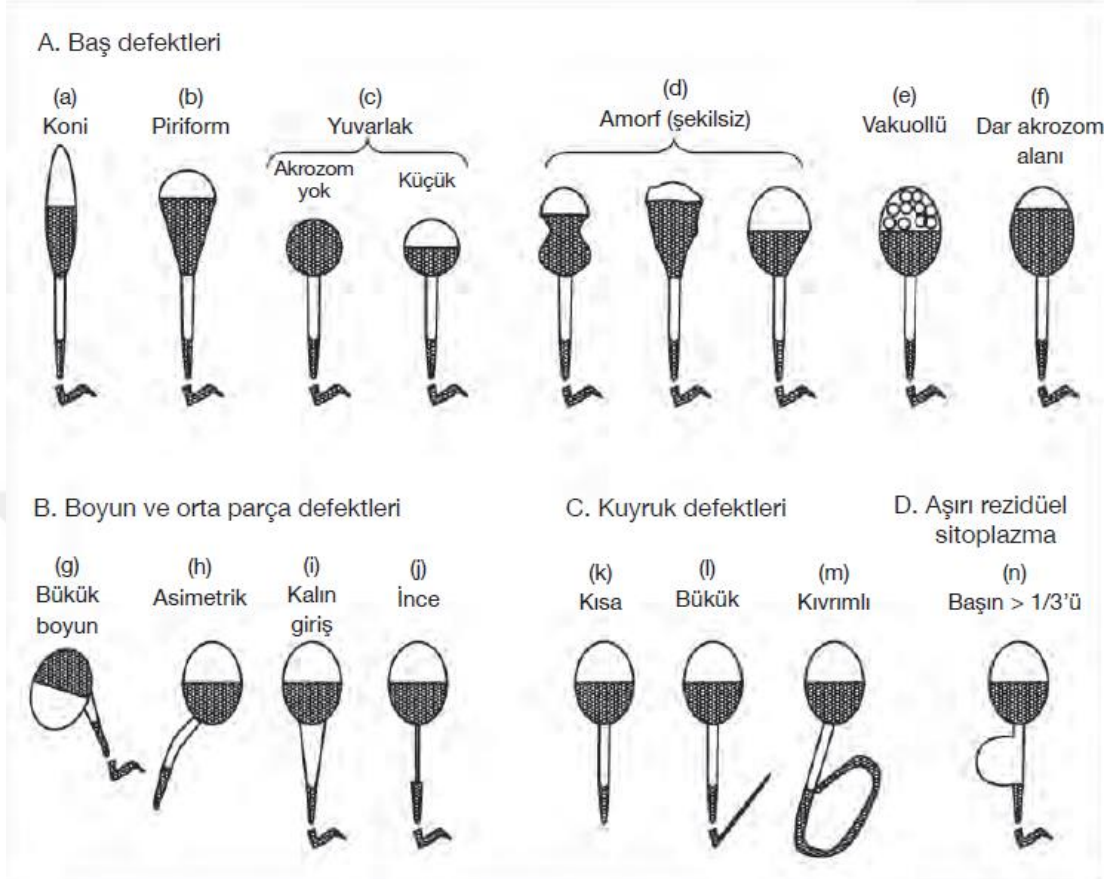
4.2.1.2. Sperm defektleri

A. Baş defektleri: Küçük, büyük, armut şekilli, amorf, yuvarlak, vakuollü (büyük veya ikiden fazla her halukarda %20’den fazla alanı kaplayan veya postakrozomal bölgede), başın <%40 veya >%70 alanını akrozomun kaplaması ve çift baş olarak sayılmaktadır. (Şekil 5)

B. Boyun ve orta parça anomalileri: başa asimetric bağlanma, kalın veya aşırı ince, düzensiz, keskin açılı kıvrılmış yapıları boyun ve orta parçaları kapsamaktadır.

C. Ana/esas parça: sayısının birden fazla olması, kısa olması, keskin açılı bükülmeleri olması, genişliğinde düzensizlikler, sarmal olması veya bu anomalilerin birlikte olmasını kapsamaktadır.

D. Aşırı rezidüel sitoplazma (ARS): spermatogenezdeki aksaklıkta oluşan bir anomalidir. Sperm başının $\geq 1/3$ ’ünden geniş ve düzensiz boyanmış sitoplazmaya sahip ve orta parça anomalileri ile ilişkilidir (Mortimer ve Menkveld, 2001). Aşırı sitoplazmanın ve “sitoplazma damlacığı” aynı şekilde tanımlanmaması gerekmektedir (Cooper, 2005).



Şekil 5: İnsan spermının anormal formlarından bazılarının şematik çizimi. A. Baş defektleri, B. Boyun ve orta parça defektleri, C. Kuyruk defektleri ve D. Aşırı rezidüel sitoplazma (WHO, 2010)

Normal morfoloji < 4 olduğunda in vivo gebelik oranı %11,5 olurken, % 4-9 olduğunda %21,15 olmaktadır (Van Zyl ve ark., 1990). Normal sperm morfolojisi < 4 olduğunda IVF'te fertilizasyon oranı % 59,3 olurken, gebeliğin %15,2 olduğu ve normal sperm morfolojisi > 4 olduğunda IVF fertilizasyonu %76,6 olurken, gebelik oranının % 26 olduğu bildirilmiştir (Coetzee ve ark., 1998)

DSÖ'nün 2010 kılavuzuna göre patolojik semen örneklerinin isimlendirmesinde; oligozoospermi sperm konsantrasyonu $15 \times 10^6/\text{ml}$ ve total sperm sayısı $< 39 \times 10^6/\text{ml}$ olan örnekleri, astenozoospermi < 32 ileri hareketli sperm, teratozoospermi < 4 normal morfolojili sperm, oligo-asteno-teratozoospermi her üç patolojinin birlikteliğini, azospermi ejakulatta sperm olmaması durumunu, kriptozoospermi taze örnekte sperm bulunmayıp santrifüj sonrası pelette gözlenmesi, aspermi ejakulatin

olmaması ve lökospermi ejakulatta $>1 \times 10^6$ /ml lökositin bulunması durumlarıdır (WHO, 2010).

4.2.1.3. Teratozoospermi indeksi

Teratozoospermi indeksi (TZI); spontan in vivo fertilizasyon şansını, sperm morfolojisindeki anomali oranına göre hesaplayan bir parametredir. Morfoloji değerlendirilirken her bir spermde birin üstünde patoloji ile karşılaşılabilir. TZI her bir sperme düşen bozukluğun sayısını, böylece anomali şiddetini vermektedir. TZI için eşik değerler DSÖ tarafından 1,60; Menkveld tarafından 2,09 olmak üzere subfertil olarak belirlenmiş, fertil grupta $< 1,51$ olması beklenmektedir (Menkveld ve ark., 2001; WHO, 2010).

TZI toplam anomali sayısının, anormal sperm sayısına bölünmesi ile hesaplanır:

$$TZI = \frac{\text{Baş anomali} + \text{Orta parça anomali} + \text{Ana parça anomali} + \text{Aşırı miktarda rezidüel sitoplazma [hacmi sperm başının üçte birinden fazla olan]}}{\text{Toplam sayılan sperm sayısı} - \text{Normal morfolojili sperm}}$$
 (WHO, 2010)

Aşırı miktarda rezidüel sitoplazma WHO 1999'da bir boyun anomali olarak sayılırken, WHO 2010 kriterlerinde ayrı bir defekt olarak sayılmış, böylece TZI'nin olabileceği maksimum değer 3 iken 4 olmuştur.

4.2.2. Sperm kromatini ile fertilité ilişkisi

İnfertilité tedavilerinde en aktif ve morfolojik olarak normal spermi seçmek ile en sağlam DNA'ya sahip spermi seçmek paraleldir çünkü anormal sperm parametreleri ile sperm kromatin yapı analizi arasında korelasyon bulunmaktadır. Bunun yanı sıra normal veya normale yakın morfolojili spermde de yüksek seviyede DNA parçalanması ile karşılaşılabilir (Gardner, 2006).

Morfolojik bozuklukların önemi; artan DNA parçalanma süreci ile birlikte (Gandini ve ark., 2000), yapısal kromozom anormalileri (Lee ve ark., 1996), immatür kromatin (Dadoune ve ark., 1988) ve anöploidi (Devillard ve ark., 2002; Martin ve ark., 2003) insidansındaki artış ile ilişkili olmasıdır. O sebeple, sperm kuyruğu da (orta parça ve ana parça) değerlendirilmesine rağmen, başın şekli önemlidir (WHO, 2010).

Spermin kromatininin ve DNA'sının normalliğini değerlendirmek için birçok metod kullanılmıştır. Bunlara örnek olarak Anilin Mavisi gibi histona veya akridin oranj gibi nükleik aside bağlanan boyalar verilebilir. Sperm kromatinini değerlendirmek için yapılan testlerin sonuçları birbirleri (Chohan ve ark., 2006) ile spermin morfolojisi, hareketliliği ve canlılığıyla orantılı sonuç vermektedir (WHO, 2010).

Anilin mavisi spermde kromatin kondenzasyonunu, lizin rezidülerini ve artık histonları boyaması dolayısı ile anormal histon varlığını gösteren, bu yolla nükleer instabilitenin olup olmadığını ortaya çıkartan asidik bir boyadır. Hasarlı DNA'ya sahip spermde rezidüel histonların açığa çıkması ile Anilin mavisinin nükleoproteinleri boyaması prensibi ile çalışır. Artmış Anilin mavisi boyanması gevşek paketlenmiş kromatini gösterir (Shamsi ve ark., 2011). Anilin mavisi sebebi açıklanamayan infertil vakalarda daha yüksek oranda sperm pozitif boyanmaktadır. (Foresta ve ark., 1992)

4.3. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesi; Kartagener sendromu, kistik fibrozis, androjen reseptör eksikliği, çölyak hastalığı yada inmemiş testis gibi nedenlerle konjenital de olabilir; enfeksiyon (ör: kabakulak, gonore, tüberküloz), endokrin hastalıklar (tirotoksikoz, diabetes mellitus), sistemik hastalıklar (nedeniyle hormonal disfonksiyon veya androjen eksikliği) ya da çeşitli ilaç (alkilleyici ajanlar) kullanımları ve radyoterapi nedeniyle sonradan kazanılmış (akkiz) da olabilir.

Erkek infertilitesinde DSÖ rehberine göre idiyopatik semen bozuklukları %50-75,1, varikozel %12,3, ürogenital faktörler %6,6, immünolojik faktörler %3,1, diğer hastalıklar %3, kazanılmış faktörler %2,6, konjenital anomaliler %2,1, cinsel faktörler %1,7 ve endokrin bozukluklar %0,6 etyoloji insidansını oluşturmaktadır. (WHO, 1999)

4.4. Sperm Hazırlama Yöntemleri

Spermilerin in vitro ortamda seminal plazma ile uzamış sürelerde maruziyeti kapasitasyonu inhibe ederken (Rogers ve ark., 1983), spermın fertilizasyon yeteneğini düşürür (Kanwar ve ark., 1979) In vivo ortamda ise hareketli sperm, kadın genital sisteminde servikal mukus içinde ilerlemeleri nedeniyle seminal plazma ve hareketsiz sperm, doğal olarak ayrılırlar. Bu sebeple yardımcı üreme tekniklerinde likefaksiyonun ardından sperm mümkün olduğunca hızlı bir şekilde seminal plazmadan ayrılmalıdır.

Ayrıca intrauterin inseminasyon için yıkanmadan taze semenin kullanımı halinde; semenin prostaglandin içeriği nedeniyle uterus krampları (Sahmay ve ark., 1989) oluşabileceği ve ayrıca endometrit ve pelvik enflamatuvar hastalık ile karşılaşılabilir de bilinmektedir.

İyi bir sperm hazırlama yönteminin amacı; hareketli sperm, diğer sperm, immatür veya ölü sperm, bozuk kromatinli sperm, anormal morfolojili sperm, ortadan kaldırmak, sperm dışı hücreleri ve bakteri, virüs gibi yapıları uzaklaştırmak ve reaktif oksijen radikallerini bertaraf etmektir.

İnfertilite tedavilerinde zamanla birçok sperm hazırlama tekniği geliştirilmiştir. Bunlar;

1. Yıkama ve santrifüj,
2. Migrasyon yöntemleri: yüzdürme (swim-up), self migrasyon sedimentasyon, albumin sütunlarına doğru yüzdürme (swim-down), Nikel meş migrasyon
3. Filtrasyon yöntemleri: cam yünü ile filtrasyon, glass-bead ayırma yöntemi, Sephadex sütunları, transmembran filtrasyon
4. Yoğunluk gradyan santrifüjlemesi (yoğunluk gradyan yöntemi veya dansite gradyan yöntemi): Percoll ile izole gradyan, mini-percoll gradyan, Nycodenz gradyan, Ficoll ile sperm seçimi, parafin altında sedimentasyon olarak sayılabilir.

Bu yöntemlerin birçoğu günümüzde kullanılmamaktadır. Genel olarak tercih edilen yöntemler üç kategoride sınıflandırılabilir: basit dilüzyon ve yıkama, sperm yüzdürme (swim-up), ve yoğunluk (dansite) gradyan santrifüjlemesi (Gardner, 2006).

Basit yıkama ve dilüzyon; ilk IVF uygulamalarında semenin bir kültür medyumu ile volümünün 2-10 katı olacak şekilde dilüe edilmesi, santrifüjlenmesi, ardından süpernatantının uzaklaştırılarak peletin kültür medyumu ile resüspende edilmesi ve

bu işlemlerin iki veya üç defa uygulanmasına dayanır. Yöntem basit ve ucuz olmakla birlikte, negatif yönü cansız veya hareketli olmayan sperm ile lökositler, epitel hücreleri ve hücre artıklarının örneğin içinde var olmaya devam etmesidir (Gardner, 2006). Ayrıca düşük kaliteli sperm ayrılmadığı sürece tekrarlayan santrifüjlerde reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşumunu artırdığı da bildirilmiştir (Aitken ve Clarkson, 1988).

Yüzdürme (swim-up) yönteminde, konik bir tüpe alınıp 45° eğilerek geniş bir yüzere yayılması sağlanan sperm, kendi hareketi ile yüzerek hareketsiz popülasyondan ayrılır. Doğada kadın genital sisteminde sperm kendi hareketi ile ilerlemesi mantığına dayanır. Yüzdürme, kadın infertilitesi söz konusu ise, normospermi durumunda ve hareketli sperm yüzdesi zaten yüksekse ve sperm dışı yuvarlak hücre sayısı düşük ise tercih edilen standart bir yöntemdir. Klinikte sıklıkla yıkama sonrası yüzdürme yöntemi kullanılmaktadır.

Aşağı yüzdürme yöntemi; yerçekiminin çekim gücünden faydalanarak hücreleri tabakalandırma mantığına dayanır ve bu geçmişte hücre kültür tekniklerinde kullanılmıştır. Teknik ÜYTEM'de 1990'lı yıllarda albumin, Percoll, vb. ile denenmiş ancak IVF'in o dönemdeki yoğun kullanımı nedeniyle rağbet görmemiştir (Gonzales ve Pella, 1993; Ing ve ark., 1991; Kaneko ve ark., 1987).

Yoğunluk gradyan yönteminde günümüzde HEPES içinde hidrofilik silan ile kovalent bağlı olarak stabilize edilmiş silika partiküllerinin kolloid süspansiyonu olan yoğunluk gradyanları veya kaynaklarda yer alan şekliyle Percoll (silan yerine polivinilpirolidon kaplıdır), albumin, Nycodenz, Ficoll ve sükröz polimerleri gibi malzemelerle farklı yoğunlukta tabakalar oluşturulup; hücreler dansitelerine göre ayrılır. Günümüzde Percoll kullanımında endotoksin ile kontaminasyon riski sebebiyle Nycodenz tercih edilmektedir (Delilbaşı, 2008). Percoll yerine tercih edilebilecek diğer ürünler olarak: Puresperm, Isolate gradient, Ixaprep, PureCeption, Purewash, Silselect sayılabilir. Bu ürünlere polisükröz eklenmiştir bu sebeple izoozmotiktirler (Gardner, 2006). In vivo insan kullanımı için onaylanmış, iritan olmayan çok düşük toksisiteye sahip ürünlerdir.

Yoğunluk gradyan yönteminde iki tabaka kullanımı tercih edilmektedir. Konsantrasyonla sperm sayısı ters orantılı olmakla birlikte normal spermi arttırmak için alt katmanın konsantrasyonu yüksek tutulmalıdır. Bu sebeple alt tabaka için

minimum %80'lik bir konsantrasyon tercih edilmektedir. Santrifüj hızının veya süresinin artırılması spermde santrifüj hasarının görülmesine sebep olması nedeniyle (Mortimer, 1994); semen ideal olarak 300 g'de santrifüjlenir ve hareketli spermler gradyan solüsyonu içinden süzülerek geçip tüpün dibinde yumuşak bir pellet oluşturur. Böylece normal yapıdaki spermler, diğer hücre tiplerinden yani lökositler, germ dışı hücreler ve dejeneratif germ hücreleri ve döküntülerden ayrılmıştır (WHO, 2010). Yoğunluk gradyan yönteminin uygulanması sırasında %80 ya da %90 gibi farklı yoğunluklar alt faz için denenmiştir. Buna ek olarak uygulanacak gradyan miktarı da normal spermde daha fazla tutulmakla birlikte hareketli spermin çok az olduğu veya total sperm sayısının çok düşük olduğu vakalarda daha az tutulmaktadır.

4.5. Fertilizasyon ve Sperm

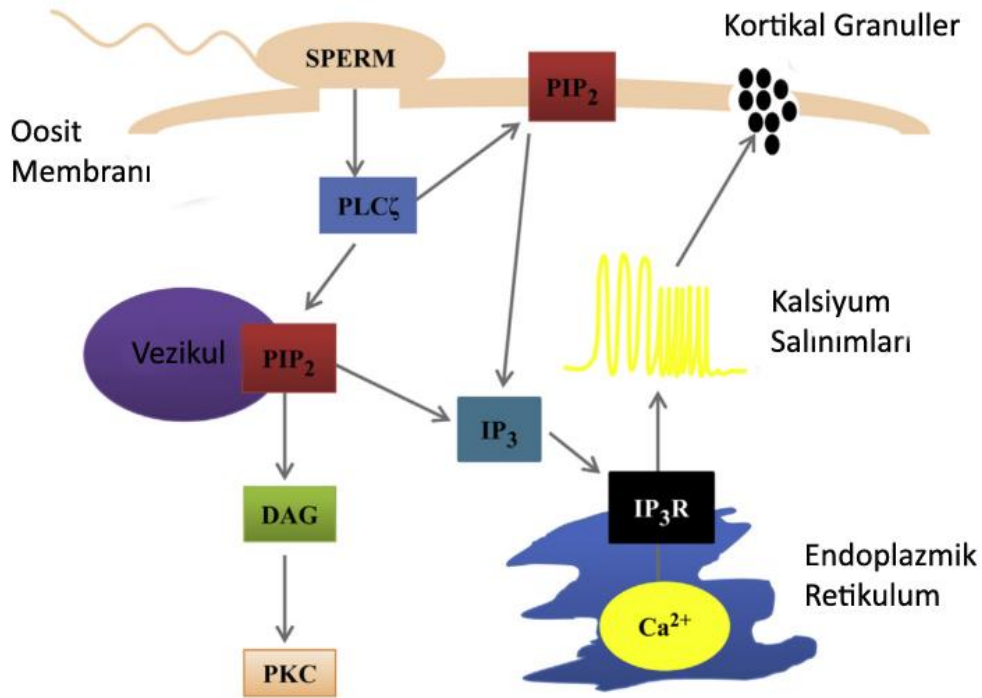
Fertilizasyonun birbirini izleyen dört temel aşaması vardır. İlk olarak fertilizasyonu gerçekleştirecek spermin seçimi, ikinci olarak bu spermin oositin kılıfını geçip içeri girmesi, üçüncü olarak sperm ve oositin sitoplazmik membranlarının birleşmesi ve son olarak iki cinsiyetin nükleer materyallerinin geri dönüşümsüz olarak birleşmesi yani nükleer singamidir (Gardner, 2006).

Sperm ejaküle edildikten sonra kadın genital sistemine girer. Kat ettiği yol boyunca semen içeriğinden arınır ve ejakülasyon sonrası değişiklikler geçirir. Bu değişiklikler inseminasyon ve fertilizasyon arasındaki ara fazlardır (Yanagimachi, 1994).

Semen, aksesuar bezler kaynaklı kalsiyum içerikli salgılar ve işlevsel olan ve olmayan heterojen bir sperm topluluğundan oluşmaktadır. Sperm, membranı stabilize eden, sterolden zengin seminal plazmadan ve asidik vajen ortamından, serviksteki mukusa doğru göç eder. Spermin plazma membranı mukustaki ince yapılı elementler tarafından temizlenir ve böylece plazma membranından emilmiş moleküllerden ve sterollerden arındırılması kolaylaştırılmış olur. Spermle birlikte lökositler de servikal mukusa ulaşır. Bunlar ürettikleri ROS ile fonksiyonel spermi kapasitasyona sevk eden bir etki yaratırken fonksiyonu bozuk spermlere zarar verirler ve böylece daha sonraki fertilize edebilecek sperm topluluğundan uzaklaşmasını sağlarlar. Uterusa giren topluluk böylelikle daha homojen olur.

4.6. Fosfolipaz C Zeta (PLCZ)

Gametlerin füzyonunun ardından; yani sperm zona pellusidayı geçtikten sonra nükleer materyal oosit içine girerken fosfolipaz C zeta (PLCZ) ooplazmaya salınır (Swann ve ark., 2006). Hücre membranındaki veya hücre içi veziküllerde bulunan fosfoinositol difosfatı (PIP₂) hidrolize eder; böylece diaçilgliserol (DAG) ve inositoltrifosfat (IP₃) ortaya çıkar. DAG, protein kinaz C (PKC) yolağını aktive eder; IP₃ da endoplazmik retikulum üzerinde yer alan reseptörüne (IP₃Rs) bağlanarak, hücre içi özel amplitüd ve frekanslı Ca²⁺ salınımlarının başlamasını sağlar (Şekil 6). Oosit böylece aktive olur, arrestteki oosit mayoza devam eder ve kortikal granüller perivitellin aralığa salınır (Amdani ve ark., 2013). Fertilizasyonu takiben Ca²⁺ salınımları pronükleus oluşumunda sonlanır (Marangos ve ark., 2003).



Şekil 6: Fosfolipaz C Zeta'nın çalışma mekanizması (Amdani ve ark., 2013)

PLCZ; memelilerde bu işlevleri ile çözülebilir sperm faktörü ve oosit aktivasyon faktörü olarak tanımlanmıştır (Saunders ve ark., 2002).

Sperm baş bölgesinde (Young ve ark., 2009) bulunan PLCZ'nin tam lokalizasyonu konusunda çeşitli görüşler mevcuttur. Genel olarak ekvatoryal yerleşimli rapor edilen PLCZ'in, en çok bulunduğu ikinci lokalizasyonu

postakrozomal bölgedir ve bunun dışında akrozomal ve bu bölgelerin kombinasyonları şeklinde de görülebilmektedir.

Fertilizasyonda elzem bir basamak olan kapasitasyon ile sperm akrozomundan glikoproteinler uzaklaşır, plazma membranının içindeki moleküller yer değiştirir, hücre Ca^{2+} ve sodyum seviyesi yükselirken, sperm hiperaktive olur. PLCZ'nın da kapasitasyon sonrası lokalizasyonunun değiştiği ve baskın olarak ekvatoryal ve bir miktar akrozomal lokalizasyonlu iken, kapasitasyon sonrası postakrozomal lokalizasyonunun anlamlı olarak arttığı bildirilmiş ve bunun akrozom reaksiyonunun indüklenmesinde role sahip olduğu öne sürülmüştür (Grasa ve ark., 2008).

4.7. Oksidatif Stres ve Sperm

Enerji üretilirken oksijenin %2'si, serbest radikaller denilen reaktif oksijen türleri (ROS) olarak kaçar. Başka bir deyişle oksijen metabolizması sırasında çıkan yan ürünlerdir. ROS'un en az bir eşlenmemiş elektronu vardır ve bu en dışta olduğu için yüksek düzeyde reaktif moleküllerdir. Oksidatif stres; reaktif oksijen radikallerinin tetiklediği artmış hücre hasarının yarattığı durumdur ve spermde fonksiyon bozukluğu yapmasından dolayı erkek infertilitesinin nedenlerinden biri olarak sayılmaktadır (Agarwal ve ark., 2014).

Serbest radikaller DNA zincirlerine bağlanıp onları kırarak mutasyonlara sebep olan çok reaktif moleküllerdir. Ayrıca hücre membranındaki yağlara ve proteinlere bağlanarak onlara hasar verebilirler. Bunun yanı sıra serbest radikaller mitokondriyi inhibe edip, enerji üretim mekanizmasını bozabilir. Spermde ise ROS üretimi; plazma membranında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz sistemi veya daha çok mitokondride nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) bağlı oksidoredüktaz reaksiyonu olmak üzere iki yol ile olmaktadır. Hareketlilik için aktif olarak enerji gerekmesi nedeniyle sperm bol mitokondri bulundurması, asıl oksidatif stres kaynağını mitokondri yapmaktadır (Henkel, 2011). Öyle ki, insan sperminde en çok üretilen ROS olan O_2^- lipid peroksidaz yolağını başlatarak membran akışkanlığını etkileyerek sperm fonksiyonunu bozabilir (Chen ve ark., 2013; Sikka, 2001).

Yani; ROS ve metabolitleri DNA, lipid, protein yapılarına saldırıp, enzim sistemlerini değiştirip, tamir edilemeyecek değişiklikler yaratabilir, hücre ölümüne

sebepler olabilir ve sonuç olarak erkek infertilitesine yol açacak semen parametrelerinde düşüşe neden olabilir. Fizyolojik sınırlardaki ROS; kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyon ve spermin oosit ile füzyonu için gerekli olsa da; patolojik seviyelerde, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve apoptoza sebep olabilmesi nedeniyle sperm kalitesini kötü etkileyip, fertilizasyon kapasitesini tamamen bozabilir. ROS üretiminde endojen kaynaklar olarak lökositler, immatür spermatozoa ve varikozel sayılabilirken; eksojen kaynaklar olarak toksinler, sigara, alkol ve radyasyon sayılabilir (Agarwal ve ark., 2014).

Spermatozoa oksidatif stres kaynaklı hasarı tamir edemez çünkü gerekli sitoplazmik enzim tamir mekanizması eksiktir (Saleh ve Agarwal, 2002). Hücre membranları doymamış çoklu yağ asitlerinden zengindir, bu da onları oksijen kaynaklı hasara, böylece lipid peroksidasyonuna açık kılar. Lipid peroksidasyonu kaynaklı hücre içi ATP kaybı; aksonem hasarına, sperm canlılık kaybına ve artmış orta parça morfolojik defektlerine sebep olur ve bunların hepsi düşük sperm hareketliliği ile ilişkidir (Bansal ve Bilaspuri, 2010; Gharagozloo ve Aitken, 2011).

Semende olgun spermle birlikte; immatür sperm, lökositler ve epitel hücreleri de bulunur. Çoğunlukla nötrofillerden ve makrofajlardan oluşan lökositler ROS'un temel endojen kaynağını oluştururlar. Bu peroksidaz pozitif lökositler prostat ve seminal vezikül kaynaklıdır ve herhangi hücre içi veya hücre dışı stimulanla normalin yüz katı ROS üretip oksidatif strese sebep olabilirler ve bu durum spermin hücre membranında lipid peroksidasyonu ile sonuçlanabilir (Agarwal ve ark., 2003). Lökositospermi (1×10^6 /ml) durumunda olduğu gibi anormal yüksek lökosit konsantrasyonları sperm hasarına sebep olur (WHO, 2010). Lökositler tarafından üretilen ROS'un ayrıca spermde belirgin hareketlilik kaybı, morfoloji bozulması, hiperaktivasyonda ve oosit penetrasyonunda azalmaya sebep olan zararlı etkileri vardır (Koppers ve ark., 2011)

İmmatür spermelerde, örneğin spermiogenez aşamasında bir durma (arrest) yaşandığında orta parça etrafında fazla rezidüel sitoplazma kalır ve bu NADPH sistemini aktive ederek spermatozoanın ROS üretmek için elektron kaynağını oluşturur, böylece muhtemel bir oksidatif stres oluşturur. Aşırı rezidüel sitoplazma bu sebeple sperm hareketliliğini, morfolojisini, fertilizasyon potansiyelini etkiler (Rengan ve ark., 2012).

Lipid peroksidasyonu sırasında meydana gelen olaylar zincirinin bir sonucu olarak azalmış aksonem protein fosforilasyonu ve spermin hareketsizleşmesinin, hareketlilik parametresine etkisi olabilir (Agarwal ve ark., 2014).

YÜT'te ROS birikimine sebep olan üç in vitro etken vardır: endojen savunma mekanizmalarının eksik olması, spermatozoanın çeşitli manipulasyonlara maruz kalması, çevrenin oksidatif strese duyarlı olması (Agarwal ve ark., 2014).

Potansiyel bir ROS kaynağı da semen hazırlığı sırasında immatür spermler tarafından ROS üretimidir. Santrifüj sırasında antioksidanlardan zengin seminal plazmanın olmaması veya lökositler, in vivo'dan yüksek olan in vitro parsiyal oksijen basıncı, ışık ve kültür medyumları gibi etkenlerden zarar görmesidir. Işığa beş dakikadan fazla maruziyetin H₂O₂ seviyelerini artırdığı bildirilmiştir. Kültür medyumları için de; Ham's F-10'da bulunan Fe, Cu gibi metal iyonları ROS oluşumunu kolaylaştırır, bunun yanı sıra albumin güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir ve spermin membranlarını korur ancak DNA hasarına karşı etkili değildir ve son olarak kültür medyumları H₂O₂ üretimini artıran amin oksidazı yüksek miktarda içerir (Agarwal ve ark., 2006; du Plessis ve ark., 2008; Twigg ve ark., 1998).

YÜT uygulanacağı zaman rutin olarak sperm hazırlık aşamasında spermatozoaya santrifüj işlemi uygulanmaktadır. Bu santrifüj işleminin ROS üretimini artırdığı ve erkek gametlerinde oksidatif strese sebep olduğu gösterilmiştir (Aitken ve Clarkson, 1988). ROS'un tekrar eden santrifüj sikluslarında anlamlı olarak arttığı görülmüştür (Agarwal ve ark., 1994). Ayrıca santrifüjün gücünden ziyade santrifüjün süresinin önemli olduğu ve daha çok DNA fragmantasyonuna ve dolayısı ile YÜT'teki negatif etkilerine neden olduğu gözlemlenmiştir (Agarwal ve ark., 2003; Shekarriz ve ark., 1995).

Spermin yüksek miktar ROS'a maruziyeti DNA fragmantasyonları meydana getirir (Agarwal ve ark., 2003). Normal spermin DNA fragmantasyonunun büyük bir kısmı seminifer tübüllerden ve epididimisten geçerken meydana gelir. Farklı araştırma grupları tarafından; ejaküle edilen spermin testiküler spermden daha yüksek DNA fragmantasyonuna sahip olduğu (TUNEL ile) gösterilmiş (Greco ve ark., 2005), epididimisten elde edilen spermin ise testiküler spermden daha yüksek DNA fragmantasyonuna sahip olduğu yayınlanmıştır. Spermlerin epididimiste sıkıca paketli olması kısa ömürleri nedeniyle immatür ve matür spermlerin yakın temas

halinde olarak ROS hasarının meydana gelmesine sebep olur (Steele ve ark., 1999). Benzer mekanizma santrifüj uygulanmış semenin peletinde spermlerin sıkıca paketlenmiş olmasından da meydana gelir (Agarwal ve ark., 2006).

Agarwal ve ark.; sperm hazırlama yöntemlerinden yoğunluk gradyan yöntemi, cam yünü filtrasyonu ve migrasyon-sedimentasyon yöntemlerinin lökositleri uzaklaştırarak ROS seviyelerini düşürseler de, alternatif bir yöntem olarak magnetic activated cell sorting (MACS) yöntemini apoptotik spermatozoayı anneksin-V bağlı manyetik parçacıklarla uzaklaştırdığı için; hareketli, canlı, normal morfolojideki daha yüksek fertilizasyon potansiyeline sahip spermleri seçmesi nedeniyle önermişler (Agarwal ve ark., 2008). Ayrıca fazla lökosit içeren veya immatür veya hasarlı spermi çok olan örneklerin yüzdürme veya basit yıkama ile muamele edilmemesi gerektiğini çünkü bu tekniklerde semenin bütün hücre içeriğinin dipteki pelet içerisinde birbiri ile temas halinde olmaya zorlandığını da belirtmişlerdir (Agarwal ve ark., 2006).

Oksidatif stres, sperm plazma membranının akışkanlığına etki ettiği gibi sperm nükleusunun DNA bütünlüğüne (integrity) de saldırıda bulunmaktadır. ROS kaynaklı DNA hasarı gamet hücrelerinin apoptozu, bunu takip eden sperm sayısında düşüklük ve düşük semen kalitesi ile sonuçlanır (Agarwal ve ark., 2003). Yoğunluk gradyan yöntemi ve yüzdürme yöntemlerinin (akridin oranj ve flow sitometri ile) karşılaştırıldığı bir çalışmada yoğunluk gradyan yönteminin sağladığı hareketlilikteki artışın DNA bütünlüğü ile ilişkili olmadığı, bilakis ejakulat ile benzer seviyede olduğu, bir düzleme sağlamadığı bulunmuş ancak yüzdürme ile DNA bütünlüğünün arttığını gözlemlenmiştir (Zini ve ark., 2000). Bunun üzerine rutinde kullanılan yöntemlerin sperm DNA hasarını minimize edecek şekilde yeniden gözden geçirilmesi gerektiği sonucuna varılabilir (Agarwal ve ark., 2003). Keza DNA'sı hasarlı sperm YÜT'te kullanımı tartışmalıdır (Twigg ve ark., 1998). Sperm DNA hasarı teorik olarak endojen endonükleazlar tarafından tamir edilebilir ancak tam yapılamayan onarım genetik anomalinin YÜT'te muhtemel olarak aktarımı ile sonuçlanır (Maione ve ark., 1997; Perry ve ark., 1999; Zini ve ark., 2000).

İnfertil erkeklerin semenlerinde fertil kontrollere göre daha fazla apoptoz rastlanması ve bu farkın yoğunluk gradyan yöntemi uygulaması sonrası matür

fraksiyonda hala istatistik olarak anlamlı sebat etmesi, yoğunluk gradyan yönteminin yeterli olmadığını göstermektedir (Agarwal ve ark., 2003).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Örnek Hazırlanması

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (protokol numarası: 09.2016.185) etik onay ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan izin alınarak, teze katılmayı kabul eden vakalardan imzalı aydınlatılmış onam formu yazılı olarak alındı.

Çocuk istemi nedeni ile ÜYTEM'e başvuran 20 erkek hastadan 3 günlük cinsel perhiz sonrası steril kap içine masturbasyon ile semen örneği alındı. Teze alınma kriteri olarak sperm konsantrasyon 10×10^6 /ml belirlendi.

Likefiye olması için 30 dakika beklendi. Likefaksiyonu takiben viskozite ve pH'ya bakıldı. Likefiye olmayan örneklere mekanik likefaksiyon uygulandı. Tamamıyla likefiye olmuş örnek iyice karıştırılarak bir lama damlatıldı; üzeri 22x22 mm'lik lamel ile kapatılıp faz kontrast mikroskopta hareketli sperm oranı ve yaklaşık sperm sayısı belirlendi. Takribi sperm sayısına göre 5 veya 20 kat dilüe edilip improved Neubauer lamı ile sayım yapıldı.

Her örnekten 5-15µl sperm %0,01 Poly-L-Lysine kaplı lamlara 45 derecelik açı ile ince bir şekilde yayılarak, üçer adet yayma elde edilip havada kurutuldu, immunfloresan boyama için -10°C metanol ile 5 dakika; Anilin mavisi boyaması için 0,2 M fosfat tamponlu (pH 7,2) %3'lük glutaraldehitte 30 dakika, PAP boyama için % 96 alkol ile 15 dakika fikse edildi.

Geriye kalan semen örneği üç eşit bölüme ayrılarak (ortalama 1'er ml) yüzdürme, yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme yöntemleri ile yıkama işlemleri yapıldı.

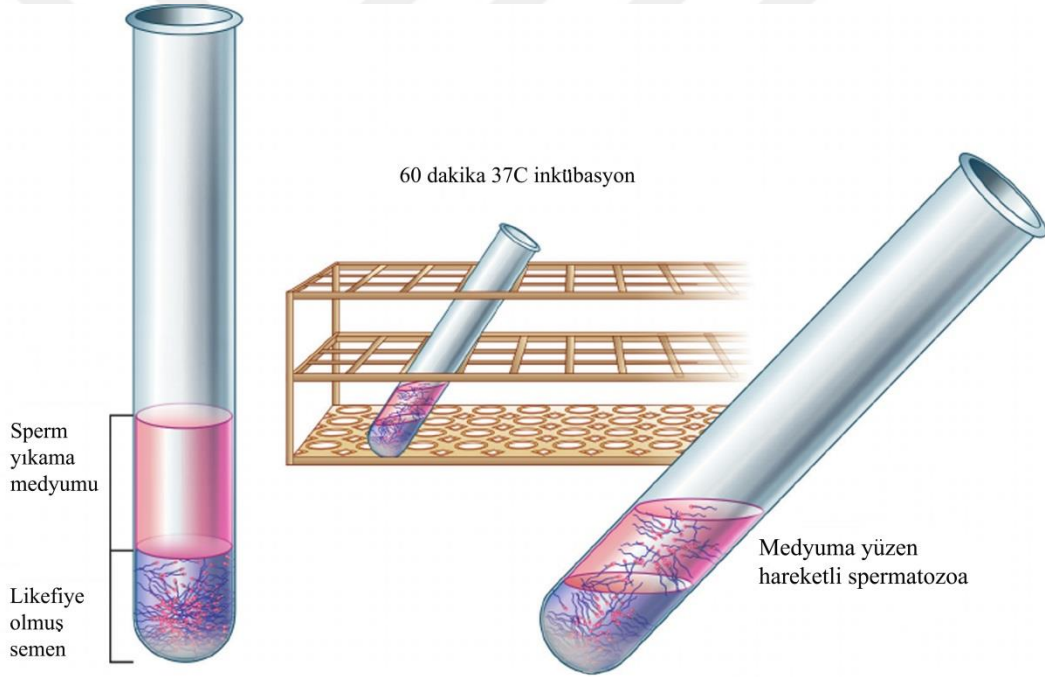
5.2. Sperm Hazırlama Yöntemleri

Yüzdürme, yoğunluk gradyan yöntemi ve yoğunluğa yüzdürme yöntemi olmak üzere üç sperm hazırlama yöntemi uygulandı.

Kültür medyumu olarak Vitrolife 10136 G-IVF Plus medyum kullanıldı.

5.2.1. Yüzdürme yöntemi

Yüzdürme için semen örneği iyice karıştırıldı. Steril 15 ml'lik konik polistiren tüp içine 1 ml semen koyulup üzerine 1,2 ml kültür medyumunu eklendi. Semen-kültür medyumunu ara yüzey alanını artırmak için, tüp yatay düzlemle 45 derece açı yapacak şekilde eğildi, 37°C'de %5 CO₂ ortamda 1 saat inkübe edildi. Tüp dik duruma getirildi ve kültür medyumunun en üstteki 1 ml'lik kısmını ayrıldı (Şekil 7). Hareketli spermlerden oluşan bu kısım, kültür medyumunun 1,5–2,0 ml'siyle seyreltildi. Beş dakika boyunca 440 g'de santrifüjlendi ve üst fazı atıldı. Sperm konsantrasyonu, toplam motilite ve ileri hareketi değerlendirmek için, 0,5 ml kültür medyumunu içinde sperm pelleti yeniden süspansiyon haline getirildi.



Şekil 7: Yüzdürme yöntemi (Beydola ve ark., 2013)'dan modifiye edilmiştir

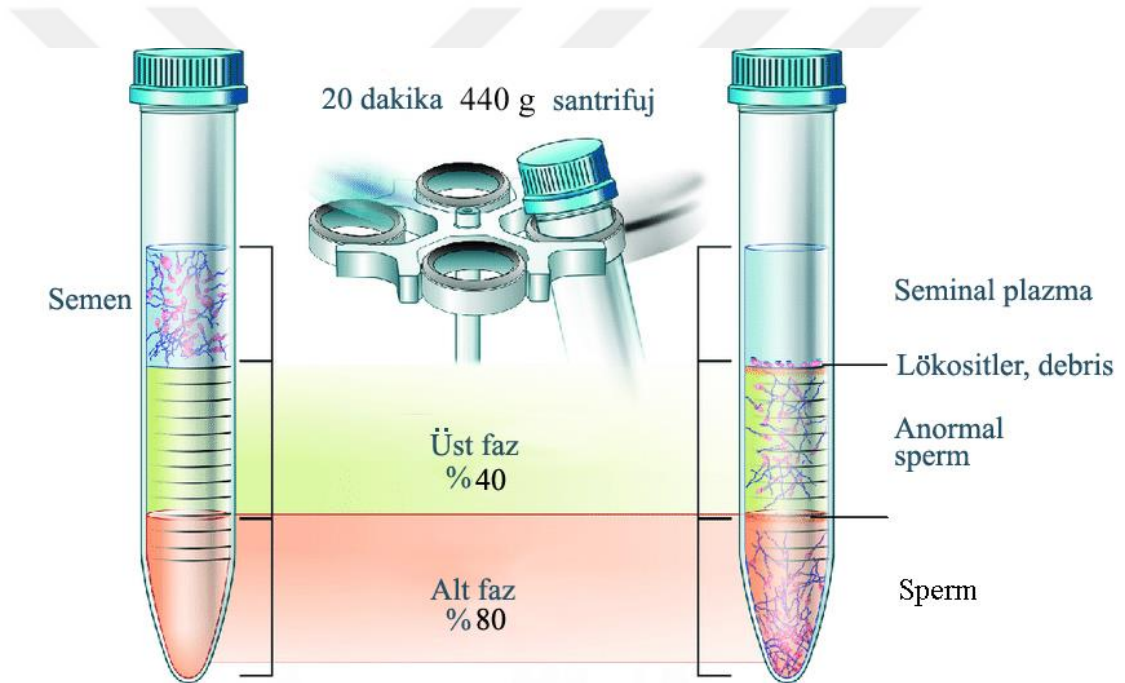
Yıkama yapılan örnek; lama yayılıp üzeri lamel ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelenip değerlendirilmesi yapıldı, Neubauer lamı ile sayıldı. Örnekten birer damla alınarak %0,01 Poly-L-Lysine kaplı lamlara üç yayma yapılarak havada kurutuldu ve ardından biri immunfloresan boyama için metanol ile; diğeri Anilin mavisi boyaması için 0,2 M fosfat tamponlu (pH 7,2) %3'lük glutaraldehitte 30 dakika, Papanicolaou (PAP) için %96 alkol ile 15 dakika fikse

edildi. Yüzdürme işleminden kalan örnek elektron mikroskobu takibi için 0,1 M fosfat tamponu ile tamponlanan % 2,5 glutaraldehit fiksatifinde 4-12 saat süreyle +4°C’de fikse edildi.

5.2.2. Yoğunluk Gradyan ve Yoğunluğa Yüzdürme

Yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme yöntemlerinde kullanılmak üzere (Vitrolife Spermgrad ve Vitrolife G-MOPS kullanılarak) %40’lık ve %80’lik yoğunluk gradyanları hazırlandı. Dört saat 37°C %5 CO₂’de inkübe edildi.

5.2.2.1. Yoğunluk gradyan yöntemi



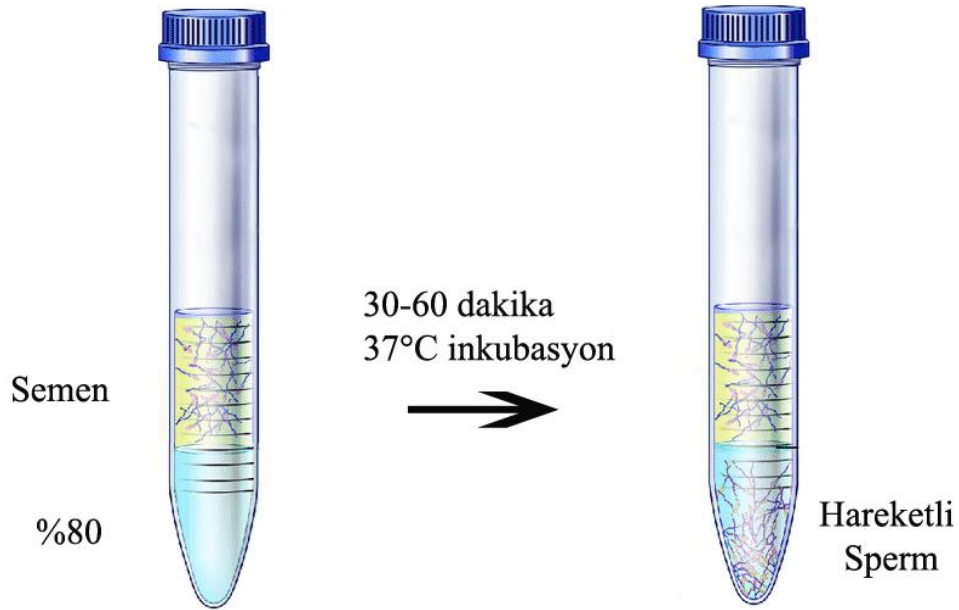
Şekil 8: Yoğunluk gradyan yöntemi (Beydola ve ark., 2013)’dan modifiye edilmiştir.

Yoğunluk gradyan yöntemi için 1 ml % 40’lık yoğunluk gradyan medyumunu 1 ml % 80’lik yoğunluk gradyan medyumuna koyularak bir test tüpü içinde yoğunluk gradyan medyumunu hazırlandı. Semen numunesi iyice karıştırıldı. Yoğunluk gradyan medyumuna üzerine 1 ml semeni yerleştirilip, 20 dakika 440 g’de santrifüjlendi (Şekil 8). Sperm pelletinden süpernatantının (üst fazın) çoğu atıldı. Nazikçe pipetlenerek (kontamine edici yoğunluk gradyan medyumunun dışarı

alınmasına yardımcı olmak için), 3 ml kültür medyumunu içinde sperm pelleti yeniden süspansiyon haline getirildi ve 6 dakika 440 g'de santrifüjlendi. Yıkama işlemi tekrarlandı. Son oluşan pellet, 0,5 ml yeni kültür medyumunu içinde nazikçe pipetlenerek yeniden süspansiyon haline getirildi.

5.2.2.2. Yoğunluğa yüzdürme yöntemi

Yoğunluğa yüzdürme yöntemi için 2 ml % 80'lik gradyan medyumunu hazırlandı. Semen numunesi iyice karıştırıldı. Yoğunluk gradyan medyumunun üzerine 1 ml semeni yerleştirilip 30 dakika 37°C inkübatörde bekletildi, pipetle girilip dipten 1 ml'lik kısım aspire edildi (Şekil 9). 3 ml kültür medyumunu içinde sperm pelleti yeniden süspansiyon haline getirildi ve 6 dakika 440 g'de santrifüjlendi. Tekrar yıkandı ve pelet 0,5 ml yeni kültür medyumunu ile resüspende edildi.



Şekil 9: Yoğunluğa yüzdürme yöntemi. 15 ml'lik steril konik tüp içine alta yerleştirilen 1ml %80'lik yoğunluk gradyanı ve üzerine yerleştirilen 1ml semen görülmektedir.

Yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme yöntemleri ile yıkanan örnekler; bir damla lama damlatılıp üzeri 22x22 lamel ile kapatılarak faz kontrast mikroskopunda incelenip değerlendirilmesi yapıldı. Örnekten birer damla alınarak %0.01 Poly-L-Lysine kaplı lamlara üç yayma yapılarak havada kurutuldu ve ardından biri immunfloresan boyama için 5 dakika -10°C metanol ile; diğeri Anilin Mavisi boyaması için 0.2M fosfat tamponlu (pH 7.2) %3'lük glutaraldehitte 30 dakika ve PAP için %95 alkol ile 15 dakika fikse edildi. Yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme yöntemlerinden kalan örnekler elektron mikroskobu takibi için 0,1 M fosfat tamponu ile tamponlanmış % 2,5 glutaraldehit fiksatifinde 4-12 saat süreyle +4°C'de fikse edildi.

5.3. Anilin Mavisi Boyaması

Anilin Mavisi boyaması: Likefiye olmuş semen ve her üç yıkamadan elde edilen toplam dört örnekten glutaraldehit ile fikse edilen preparatlar %5 Anilin mavisi ve asetik asit karışımı (pH 3.5) ile 5 dakika boyandı. (Terquem ve Dadoune, 1983)

5.4. Fosfolipaz C Zeta Boyaması

Metanol (-10°C) ile 5 dakika fiksasyonun ardından 3 defa PBS (Sigma) ile yıkanan preparatlar, PBS ile dilüe edilmiş %10'luk normal eşek serumu (Santa Cruz sc-2044) ile 20 dakika bloklandı. Gece boyu +4°C'de 1:200 dilüsyonda anti-PLCZ antikor (Santa Cruz PLCZ-1 antibody) ile nemli ortamda inkübe edildi.

Ertesi gün PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Oda sıcaklığında 1:200 dilüsyonda FITC florokromla konjuge sekonder antikor (SC 2024 - eşek anti-keçi IgG-FITC 200 µg/0,5 ml) ile karanlıkta 40 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 defa yıkandı. Kapama medyumunu (Sigma Fluoroshield) ile kapatıldı. Preparatların kenarları mühürlendi. Boyanmış preparatlar aynı gün incelendi ve fotoğraflandı. İncelendikten sonra +4°C'de preparat kutusunda karanlıkta tutularak gereği halinde incelenmek için muhafaza edildi.

5.5. Papanicolaou Boyası

Havada kurutulmuş semen yaymaları minimum 15 dakika % 95 etanol (Merck) içinde fikse edildi. Sırasıyla 30 saniye %80 etanol, 30 saniye %50 etanol, saf su, 4 dakika Harris hematoksilin (Merck Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution), 30 saniye saf su, 6 kez batırılarak asidik etanol, akan musluk suyu altında 5 dakika, 30 saniye %50 etanol, 30 saniye %80 etanol, en az 15 dakika %95 etanol, 1 dakika G-6 oranj (Merck Papanicolaou's solution 2a Orange G solution (OG 6)) boyama, 3 defa 30 saniye %95 etanol, 1 dakika EA-50 yeşili (Merck Papanicolaou's solution 3b polychromatic solution EA 50), 2 defa 30 saniye %95 etanol, 2 defa 15 saniye %100 etanol, 1 dakika ksilen-alkol 1:1 karışımı, 1 dakika ksilenden geçirilerek entellan (Sigma) ile kapatıldı.

5.6. Işık Mikroskopik Değerlendirme

Histokimyasal boyaların değerlendirilmesi için Olympus BX51 fotomikroskop 100x objektif ile kullanıldı.

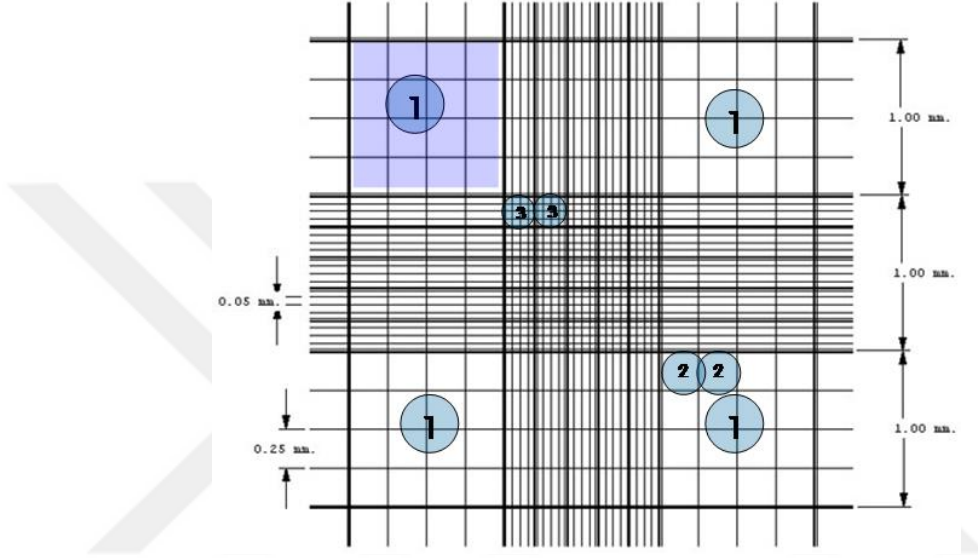
5.6.1. Sperm sayısı ve hareketliliği

Semen numunesinin alınmasının ve 30 dakika likefaksiyonunun ardından Neubauer lamı ile 10µl örneğin sayı ve kaba hareketlilik değerlendirmesi 20x10 büyütmede faz kontrast mikroskop kullanılarak yapıldı. Sperm hazırlama yöntemleri uygulandıktan sonra aynı işlemler tekrarlandı.

Hareketlilik değerlendirilirken spermeler: 1) Hızlı, ileri hareketli: Oda sıcaklığında $\geq 20\mu\text{m/sn}$ hız; 2) Yerde hareketli: $\geq 5\mu\text{m/sn}$ hız; 3) Hareketsiz olmak üzere sınıflandırıldı. Her numunede en az 400 sperm hareketlilik özelliği iki ayrı incelemede değerlendirildi ve hareketlilik oranı % cinsinden kaydedildi.

Sayım Neubauer lamı kullanılarak yapıldı. Boyutu 22x22mm lamel 0,1 mm yükseklikle Neubauer laminın üzerine kapatıldığında kamaranın 2 adet 3x3 mm'lik gridi kapanmış olur. Gridlerin her birinde 1x1mm'lik 9 büyük kare bulunmaktadır. Köşelerdeki 4 kare 16 bölmeye, ortadaki kare ise 25 bölmeye ayrılmıştır. Ortadaki 25 kare ayrıca ayrıca kendi içinde 16 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 10).

Sayısının düşük olduğu düşünölen örnekler $\times 5$, $>10 \times 10^6$ olduğu düşünölen örnekler $\times 20$ dilösyon solösyonu (50 g sodyum bikarbonat (NaHCO_3) ve 10 ml %35 formalin 1000 ml distile su içinde çözölüp, içine 0,25 g tripan mavisi eklendi, $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı) ile dilüe edildi. Sayım dilösyona bağlı olmak üzere her büyük karedeki (Şekil 10'da 1 ile işaretili) sperm sayısı $\times 10\,000/\text{ml}$ olarak hesaplandı.



Şekil 10: Neubauer lamı. 1 ile işaretilenmiş kare 1x1 mm alanı, 2 ile işaretilenmiş kare 0,25x0,25 mm alanı göstermektedir.

(<http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/neubauer-chamber-cell-concentration-1.php>)

5.6.2. Sperm morfolojisi

Papanicolaou (PAP) boyası ile boyanan preparatların ışık mikroskopi incelemeleri Olympus BX51 mikroskop (Olympus Corporation, Japonya) ve Leica DMLB mikroskop 10x100 büyütme ile yapılıp, fotoğraflandı.

Papanicolaou boyaması değerlendirilirken WHO 2010 kılavuzunda belirtilen morfoloji kriterleri kullanıldı, her bir boyanmış preparatta 400 sperm baş anomalileri, boyun anomalileri, kuyruk anomalileri, sitoplazmik damlacık bulunma durumu ve normal sperm sayıları sayıldı, ardından teratozoospermi indeksi (TZI) – (baş anomalisi+boyun anomalisi+sitoplazmik damlacık+kuyruk anomalisi) / (sayılan

sperm sayısı - normal sperm) – hesaplandı. Normal sperm oranları; sayılan normal sperm sayısının, toplam sayılan sperm sayısı olan 400'e bölünmesi ile hesaplandı.

5.6.3. DNA Olgunluğu Değerlendirmesi

Anilin Mavisi boyası için yaymalar morfoloji değerlendirmeleri ile aynı şekilde yapıldı. Anilin mavisi boyaması değerlendirilirken her bir preparatta boyanmış ve boyanmamış olarak en az 400 sperm sayıldı. Değerler % olarak kaydedildi.

5.7. Floresan Mikroskopi Değerlendirmesi

PLCZ boyanmış preparatlar herhangi bir solma ihtimaline karşı boyandıkları gün karanlık ortamda Leica DMLB led floresan mikroskop ile sabit %16 intensite ve 470 nm'si ile 10x100 büyütmede incelendi, ardından karanlıkta buzdolabında muhafazaya alındı.

PLCZ değerlendirilirken her bir preparatta en az 400 sperm ışık ve floresan görüntülerine eş zamanlı bakılarak boyanmış ve boyanmamış olarak sayıldı. PLCZ boyanmış ve boyanmamış sperm tayini yapılırken; sperm olan alanda önce ışık mikroskobu ile sperm sayıldıktan sonra aynı alanda floresan özelliğe geçilerek ivedilikle PLCZ ışıma veren spermler sayıldı, ardından bir sonraki alana geçildi. Işık ve floresan ile aynı alan değerlendirildi.

5.8. Geçirimli Elektron Mikroskopi Takibi ve Değerlendirmesi

Glutaraldehitte primer fiksasyonu yapılan örnekler PBS'e alınarak +4°C derecede elektron takibine kadar bekletildi.

Örnekler ikincil fiksasyon için osmiyum tetroksite alındı. Bir saat %1'lik osmiyum tetroksit fiksasyonundan sonra PBS'e alındı; sırasıyla %70, %90, %96, %100'lük olmak üzere alkol serilerinden ve ardından propilen oksitten geçirilip suyu alındı. Epon 812 (Sigma) ile gömme işlemi yapıp polimerizasyonu için 60°C etüvde gece boyu bekletildi.

Elde edilen epon bloklar Leica Ultracut R Ultramikrotom ile 1000 nm'lik kalınlıkta yarı ince kesitleri cam bıçak ile alınıp lam üzerinde Toluidin Mavisi ile boyanarak ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Olympus Corporation, Japonya)

kesit alanı doğrulandıktan sonra gerekli olması halinde küçültüldü. Elmas bıçak (Diatome) ile 60-90 nm'lik ince kesitler kesildi ve bakır gridlere alındı. Bir gece kuruması için beklendi ve ertesi gün el ile kontrastlama işlemi yapıldı

Kontrastlama işlemi: Uranil asetat %2'lik ile %50'lik metanol 1:1 oranında 1,5ml'lik bir tüpe alındı. 2. bir 1,5ml'lik tüpte 1 ml kurşun nitrat ile trinatriyum sitrat karıştırıldı. Her iki tüp de alüminyum folyo ile sarılıp 400g'de 15 dk santrifüj edildi. Parafin kaplı petriye uranil asetat damlacıkları yapılarak kontrastlanacak gridler içinde 40 dakika bekletildi, ardından su damlacığına alınıp, 20'şer ml distile su ile yıkandı. Aynı yıkama işlemi petrinin kenarında NaOH eklendikten sonra gridlerin 4 dakika kurşun sitratta bekletilmesinin ardından tekrarlandı. Böylece uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlama işlemi tamamlandı.

Elektron mikroskopu incelemeleri ve fotoğraflamaları Jeol (TEM 1200 EXII-Japonya) geçirimli elektron mikroskopu ile yapıldı. Kontrastlanan ince kesitlerdeki spermlerin, baş bölgesinde plazma membranının intakt olup olmadığı, eğer intakt değil ise membran düzenini yitirip yitirmediği veya tamamen kaybolması ayrıca plazma membranının altında şişme olup olmadığı, akrozomal içeriğin elektron yoğunluğu, akrozomdaki vezikülasyonlar, vakuolizasyonlar ve akrozomun gözlenmemesi; nükleusda ise kondanzasyon durumu, vakuol var ise sayısı ve boyutları ile kuyruk bölgesindeki yapısal anomaliler değerlendirildi.

5.8. İstatistik

İstatistik analizde öncelikle hareketlilik, normal morfolojili sperm yüzdesi, Anilin mavisi boyanma yüzdesi verilerinin normal dağılımını test etmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Verilerden normal dağılım normal sperm sayısı ve PLCZ boyanan sperm oranı için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ardından Tukey testi, normal dağılmayan hareketlilik, Anilin mavisi verileri için Friedman testi ve ardından Dunn testi uygulandı. İstatistiksel analiz ve hesaplamalar SPSS 15.00 ve MS-Excel 2013 ile yapıldı. İstatistiksel kararlarda $p < 0,05$ anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışmaya kabul eden 20 hastanın semenine rutin semen analizi yapıldı. Örnekleri tez kriterlerine uygun olan 16 tanesinin semenine sperm hazırlama yöntemleri uygulandı (Tablo 1).

Tablo 1: Tez çalışmasına dahil edilen 16 vakanın ve semenlerinin genel özellikleri. Baş, boyun, kuyruk, aşırı rezidüel sitoplazma anomalisi (ARS) gösteren sperm yüzdesi ve normal sperm (N) yüzdesi ortanca, en düşük değer, en yüksek değer, ortalama ve standart sapma (SD) olarak gösterildi.

	Kabul edilen vakalar (n=16)		Kabul edilmeyen vakalar (n=4)	
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma
Yaş	34,06	7,353	32,25	4,5
Hacim, ml	3,35	2,033	2,725	1,05
pH	7,975	0,3215	8,125	0,25
Konsantrasyon, /ml	58 360 000	38 070 000	6 963 000	1 344 000
Total hareketlilik	43,13	20,04	29,75	8,808
İleri Hareketlilik	31,56	21,78	22,25	7,676
Baş %	77,78	11,99	96,91	2,061
Boyun %	46,17	14,78	56,06	5,87
Kuyruk %	23,64	10,56	29,22	12,52
ARS %	6,85	3,804	5,531	2,144
N%	5,675	2,876	0,925	0,6702
TZI	1,544	0,2005	1,878	0,09465

6.1. Hareketlilik

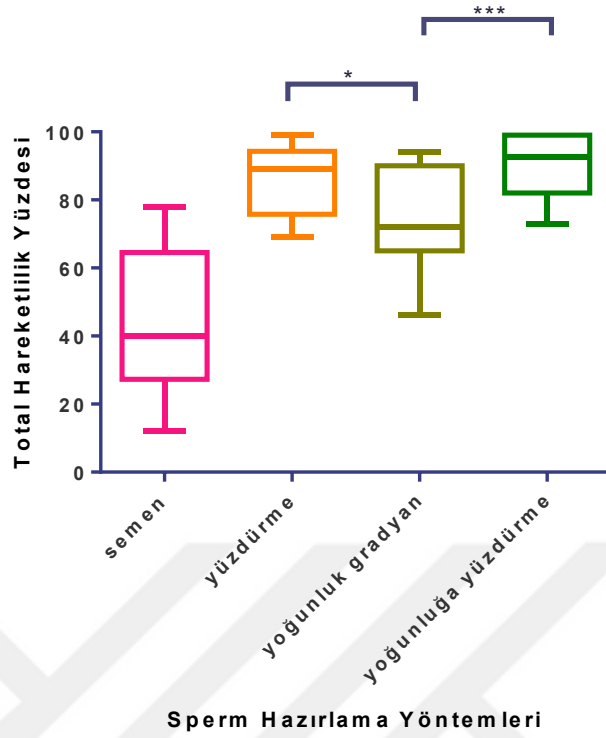
Başlangıç semenindeki, yüzdürme, yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme yöntemleri sonrası elde edilen örneklerdeki hareketli sperm oranları ortanca, en düşük, en yüksek, ortamala ve standart sapmaları olmak üzere tablo 2’de gösterildi.

Sperm hazırlama yöntemleri sonrası hareketlilik verilerinin bir kısmı normal dağılımlı olmadığından, yapılan Friedman testine göre semen, yüzdürme, yoğunluk gradyan yöntemi, yoğunluğa yüzdürme grupları arasındaki fark ($p<0.0001$) anlamlı bulundu ve ardından yapılan Dunn çoklu karşılaştırmasına göre semen ile her üç metot arasında hareketlilikte anlamlı fark görüldü ($p<0,0001$).

Yüzdürme, yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme gruplarının karşılaştırıldığı Friedman testinde yıkama sonrası grupların hareketlilik verileri arasındaki fark saptandı ($p=0,0004$). Dunn testine göre yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme arasındaki fark anlamlı ($p<0,001$), yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemleri arasındaki fark anlamlı ($p<0,05$), yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürme grupları arasındaki fark anlamsız bulundu (Şekil 11).

Tablo 2: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası total hareketli sperm yüzdesi

<i>Hareketlilik %</i>	Semen	Yüzdürme	Yoğunluk Gradyan	Yoğunluğa Yüzdürme
Ortanca	40,00	89,00	72,00	92,50
En düşük	12,00	69,00	46,00	73,00
En yüksek	78,00	99,00	94,00	99,00
Ortalama	43,13	85,94	74,44	90,19
Standart Sapma	20,04	9,909	14,43	9,282



Şekil 11: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası total hareketli sperm yüzdesi. Karşılaştırmalar: Yüzdürme ile yoğunluk gradyan , * $p < 0,05$; yoğunluk gradyan ile yoğunluğa yüzdürme, *** $p < 0,001$

6.2. Morfoloji Bulguları

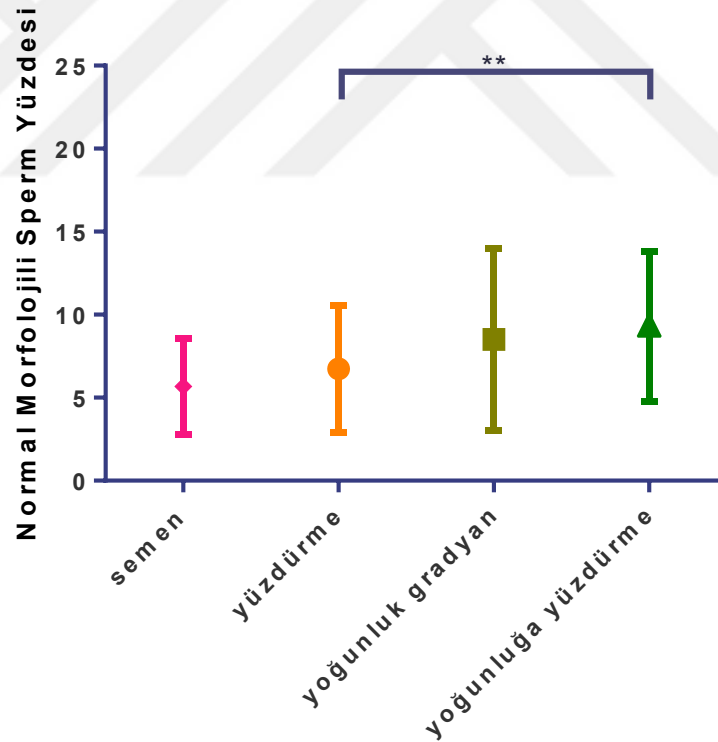
Papanicolaou boyası ile boyanan spermeler; resim 1-13'te normal sperm ve anomalili spermelere (baş, boyun, kuyruk, ARS anomalilerine) örnekler de verildiği üzere değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonrasında elde edilen örneklerdeki normal sperm oranları ortanca, en düşük, en yüksek, ortamala ve standart sapma değerleri olmak üzere tablo 3'te gösterildi. Sperm hazırlama yöntemleri sonrası Papanicolaou boyası ile boyanan spermdeki normal sperm oranı dağılımı normal idi. Tekrarlı ölçümlerde varyans analizine göre semen, yüzdürme, yoğunluk gradyan yöntemi, yoğunluğa yüzdürme grupları arasındaki fark anlamlı bulundu ($p=0,0006$).

Yüzdürme, yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme gruplarının karşılaştırıldığı tekrarlı ölçümlerde varyans analizinde yıkama sonrası grupların normal sperm oranları arasında fark vardı ($p=0,0109$). Ardından yapılan Tukey testine göre yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürme arasındaki fark anlamlı ($p < 0,01$),

yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemleri arasındaki fark anlamsız ($p>0,05$), yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme grupları arasındaki fark anlamsız ($p>0,05$) bulundu. Ayrıca ortalamalar arasında normal sperm sayısı açısından yoğunluğa yüzdürme>yoğunluk gradyan>yüzdürme>semen sıralaması mevcuttu (Şekil 12).

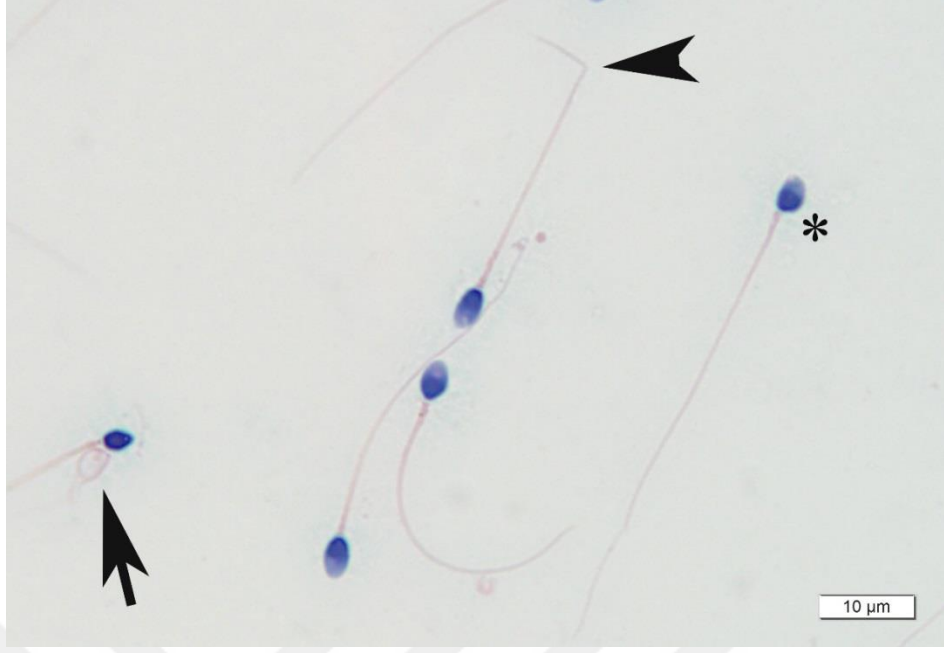
Tablo 3: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası normal morfolojili sperm yüzdesi ortanca, en düşük değer, en yüksek değer, ortalama ve standart sapma (SD) olarak gösterilmektedir.

<i>Normal Morfoloji %</i>	Semen	Yüzdürme	Yoğunluk Gradyan	Yoğunluğa Yüzdürme
Ortanca	6,000	6,100	8,000	9,650
En düşük	0,2000	6,731	8,513	9,300
En yüksek	10,00	17,00	21,00	19,00
Ortalama	5,675	6,731	8,513	9,300
Standart Sapma	2,876	3,811	5,454	4,495

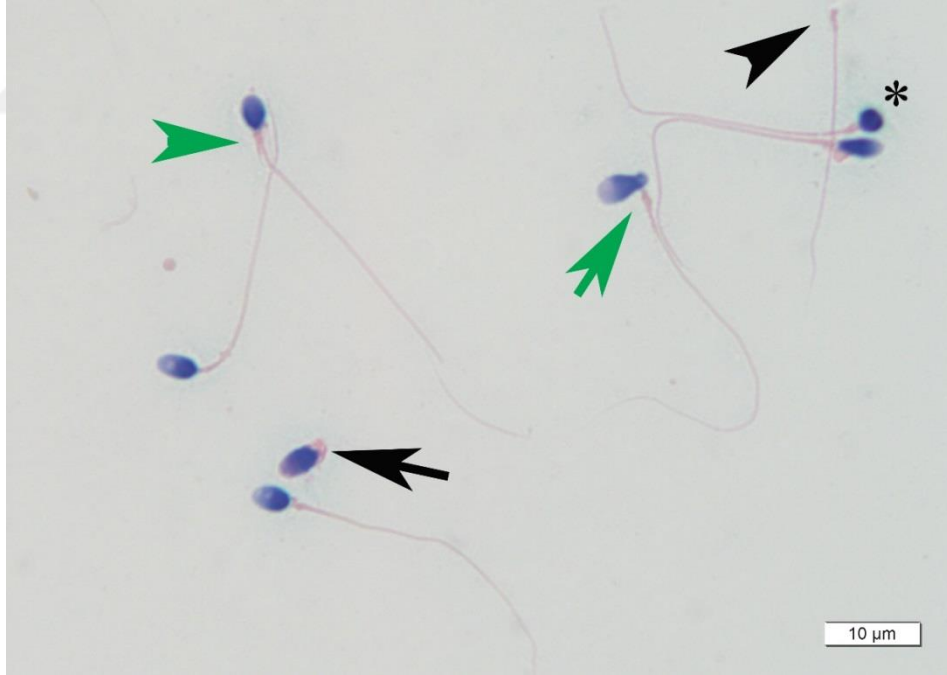


Sperm Hazırlama Yöntemleri

Şekil 12: Normal morfolojili sperm yüzdesi ortalama ve standart sapmaları. Karşılaştırmalar: Yüzdürme ile yoğunluğa yüzdürme, ** $p<0,01$



Resim 1: Papanicolaou boyası, semen. Ok: başın>1/3 aşırı rezidüel sitoplazma, okbaşı: bükük kuyruk anomalisi, yıldız: düzensiz baş



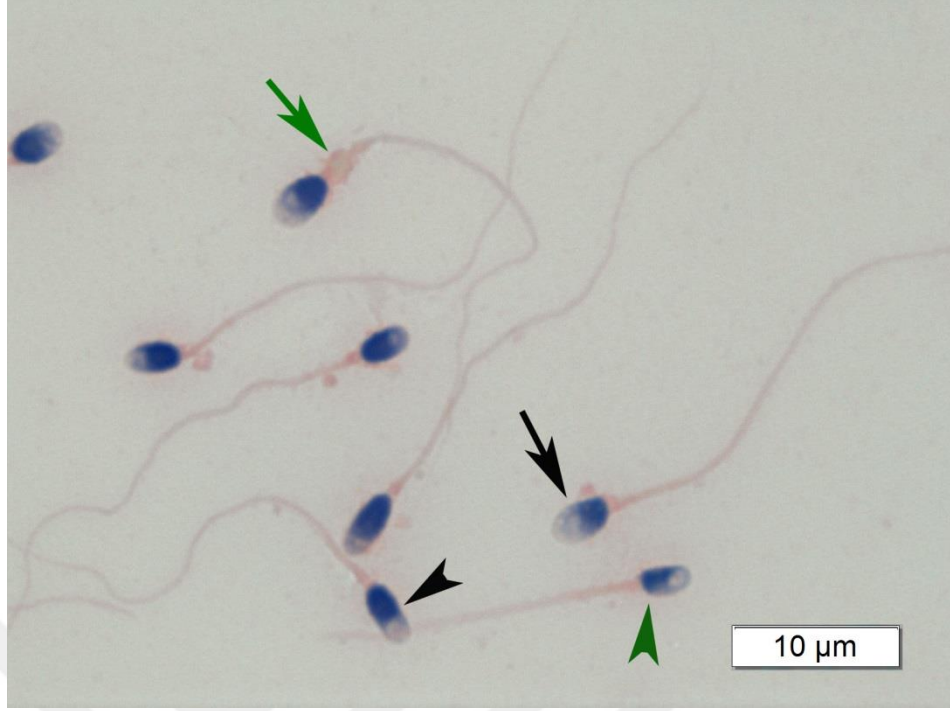
Resim 2: Papanicolaou boyası, semen. Siyah ok: ağır kuyruk anomalisini, siyah okbaşı: iğne başlı spermi, yeşil ok: kırık boyun anomalisini, yeşil okbaşı: kalın girişli boyun anomalisini, asteriks: yuvarlak başlı spermi göstermektedir.



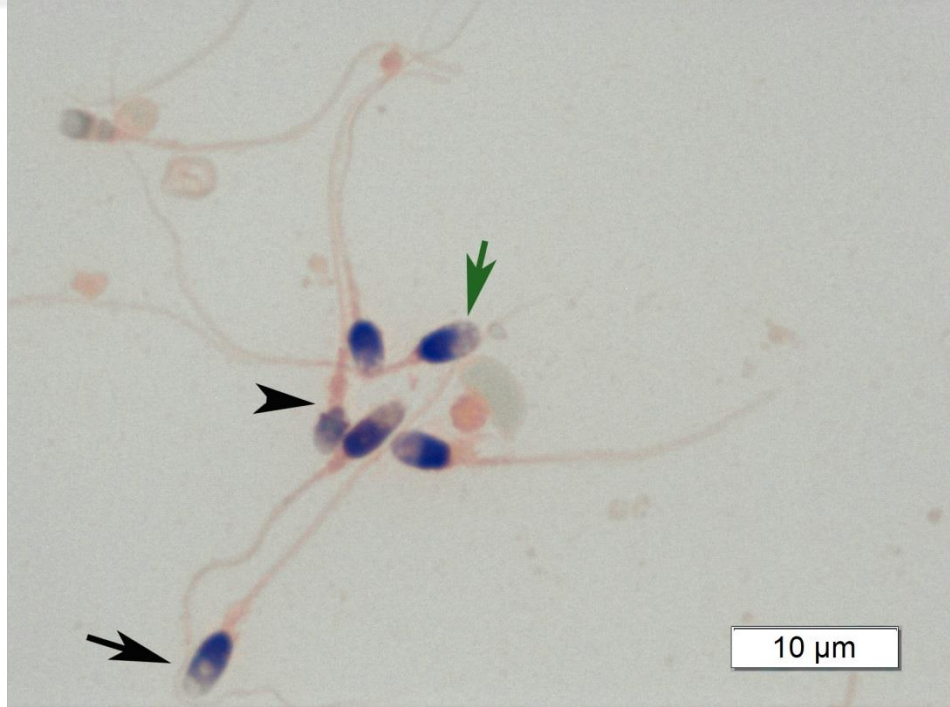
Resim 3: Papanicolaou boyası, semen. Ok: Kuyruk ve boyun anomalisini, okbaşı: başı küçük bir vakuol içeren göstermektedir.



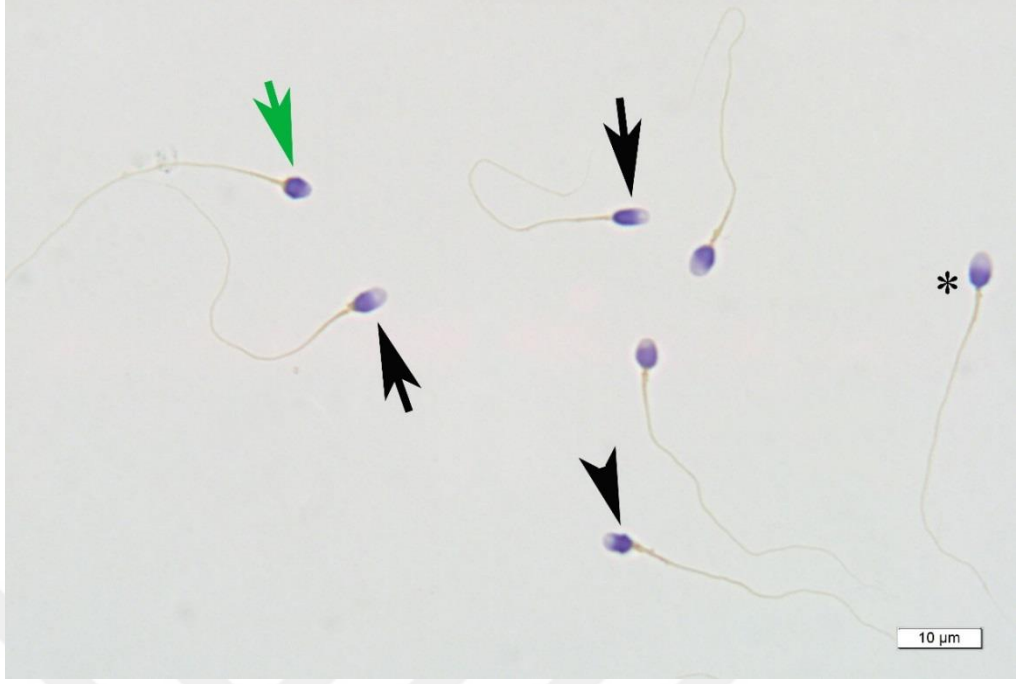
Resim 4: Papanicolaou boyası, semen. Okbaşı: bükük boyun anomalili ve baş anomalili spermi, ok: immatür, anormal boyunlu ve kısa kuyruklu anormal bir spermi göstermektedir.



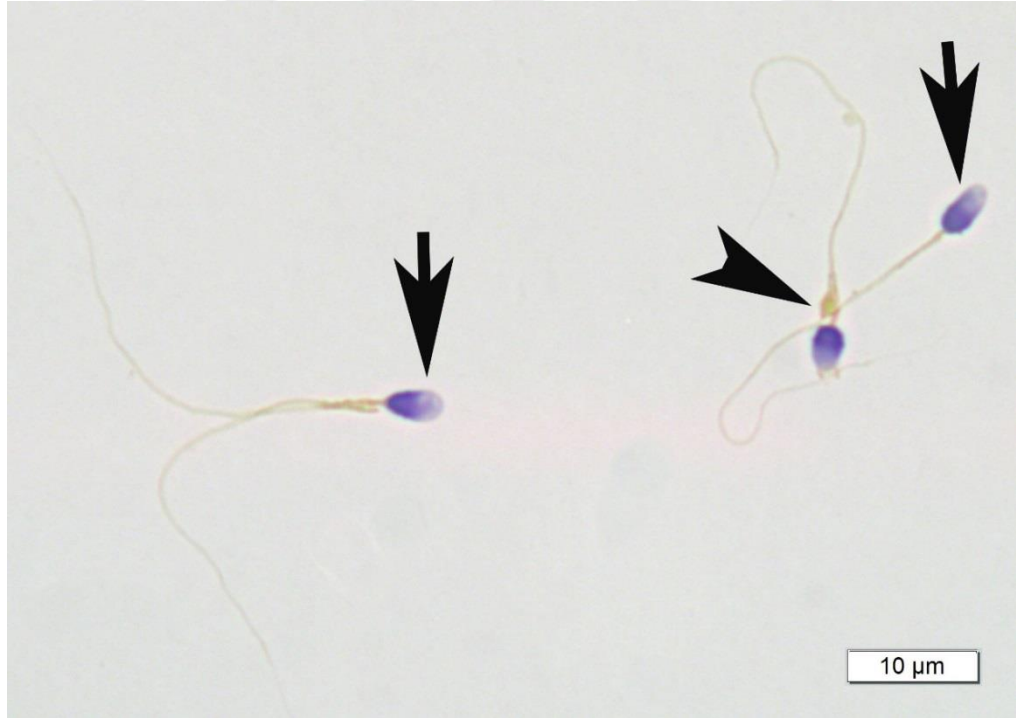
Resim 5: Papanicolaou boyası, semen. Siyah ok: vakuollü başlı, düzensiz akrozomlu ve kalın girişli boyun anomalisi olan sperm, yeşil ok: düzensiz akrozomlu vakuollü başlı ve aşırı rezidüel sitoplazmalı sperm, siyah okbaşı: konik başlı sperm, yeşil okbaşı: düzensiz başlı büyük vakuollü başlı olan sperm göstermektedir.



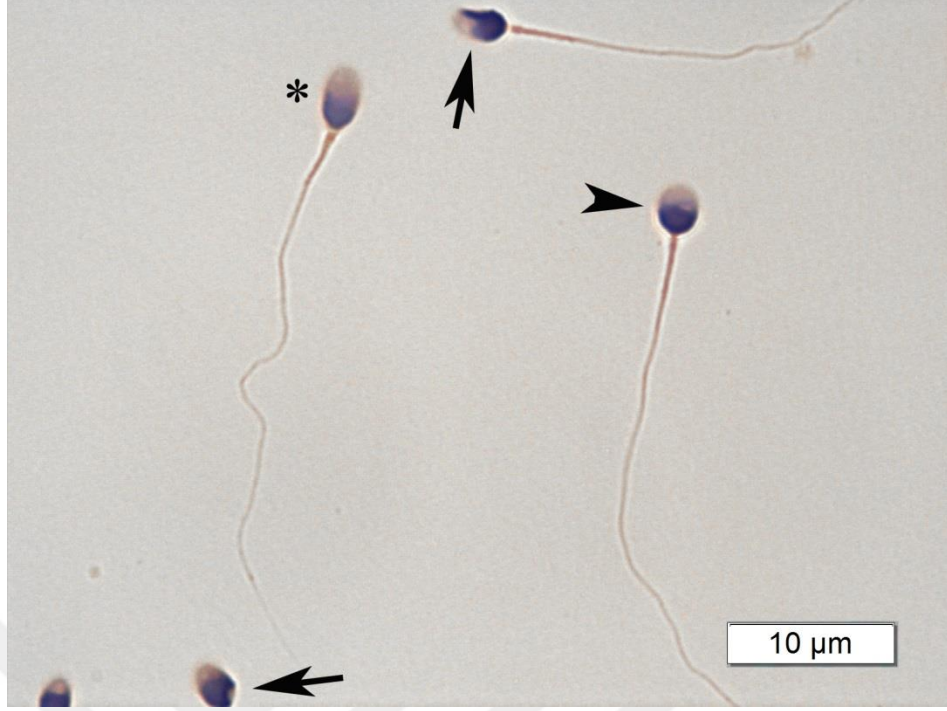
Resim 6: Papanicolaou boyası, semen. Siyah ok: vakuollü konik başlı sperm, yeşil ok: multivakuollü başlı sperm, okbaşı: küçük başlı, aşırı rezidüel sitoplazmalı sperm



Resim 7: Papanicolaou boyası, yüzdürme yöntemi uygulanmış sperm. Siyah ok: uzamış baş anomalisi, siyah okbaşı: düzensiz baş anomalisi, yeşil ok: akrozom anomalisi, yıldız: normal sperm



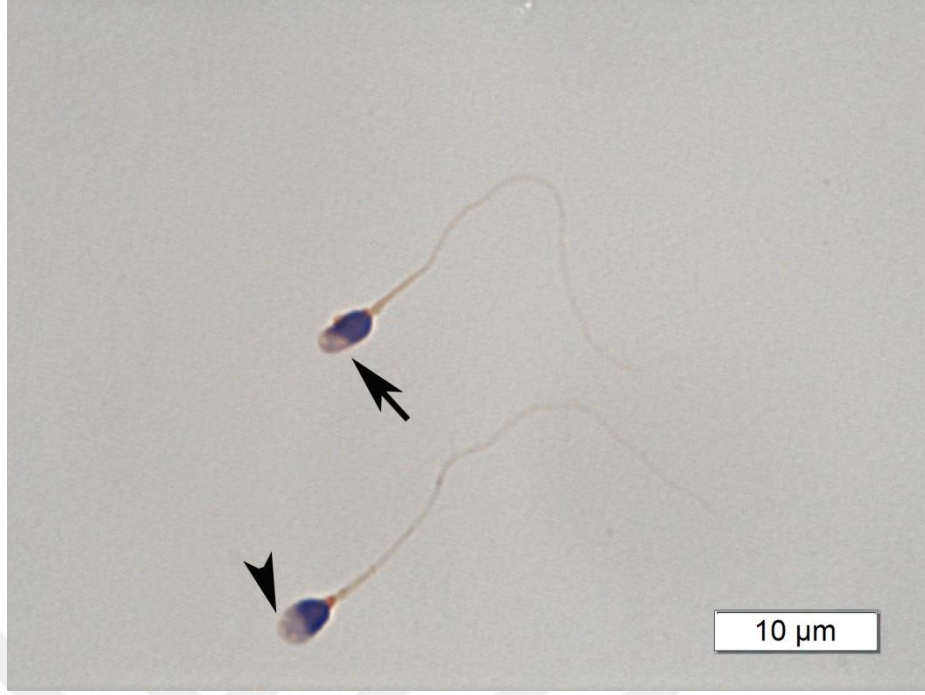
Resim 8: Papanicolaou boyası, yüzdürme yöntemi uygulanmış sperm. Ok: Başta ikiden fazla vakuol, okbaşı: aşırı rezidüel sitoplazma



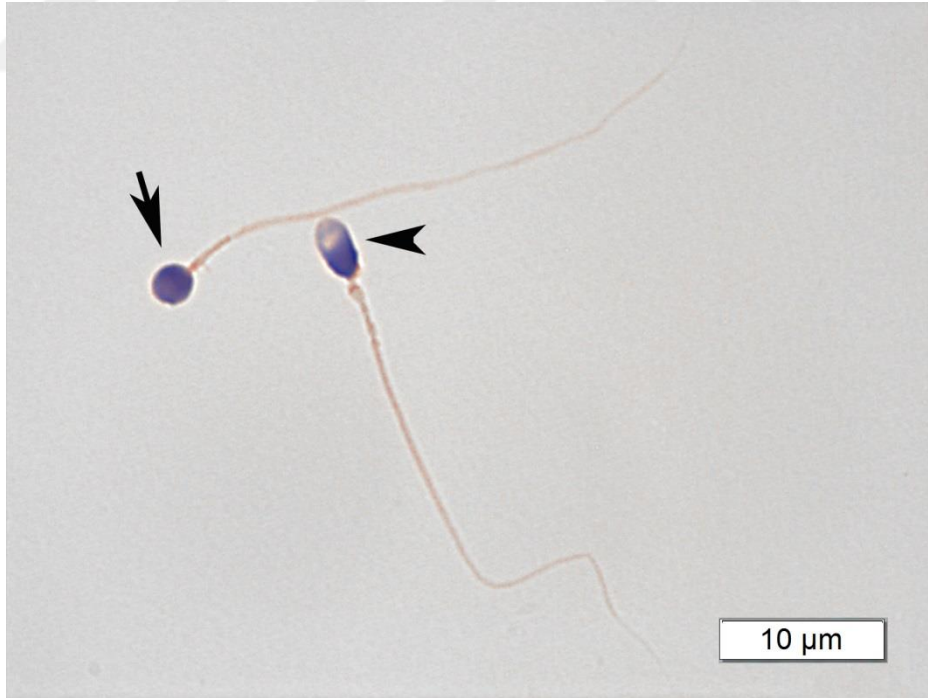
Resim 9: Papanicolaou boyası, yüzdürme yöntemi uygulanmış sperm. Ok: Düzensiz başlı sperm, okbaşı: geniş küçük başlı spermi, asteriks: normal sperm



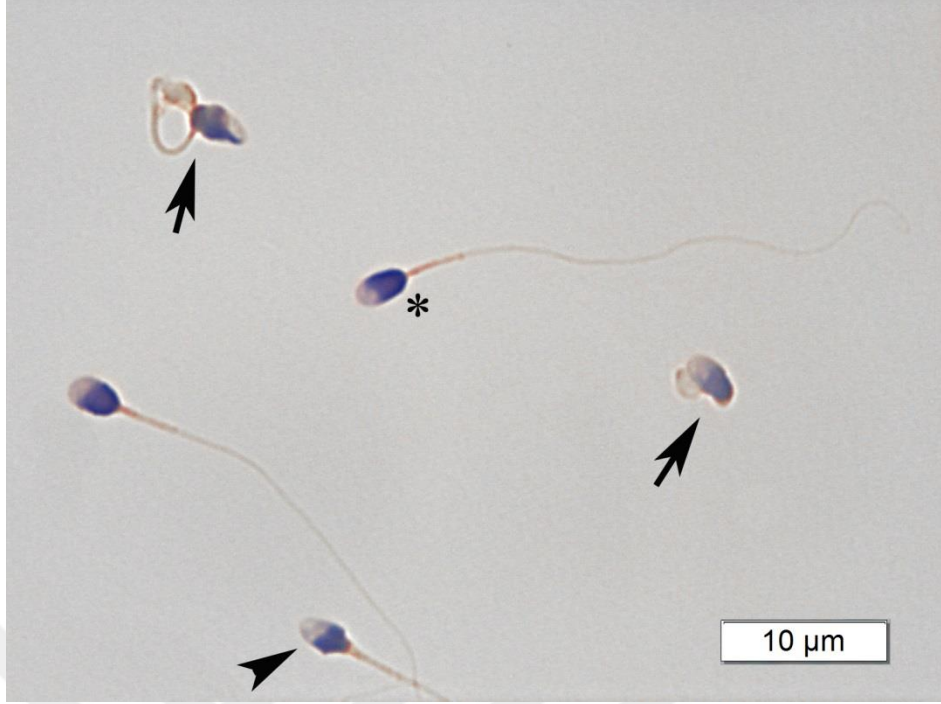
Resim 10: Papanicolaou boyası, yüzdürme yöntemi uygulanmış sperm. Ok: düzensiz akrozomlu ve düzensiz başlı sperm



Resim 11: Papanicolaou boyası, yüzdürme yöntemi uygulanmış sperm. Okbaşı: 2'den fazla vakuollü sperm, ok: büyük vakuollü ve düzensiz başlı sperm.



Resim 12: Papanicolaou boyası, yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış sperm. Ok: yuvarlak başlı akrozomsuz sperm, okbaşı: vakuollü anormal boyunlu, kırık kuyruklu sperm göstermektedir.



Resim 13: Papanicolaou boyası, yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış sperm. Ok: ağır anomalili spermler, okbaşı: amorf başlı sperm

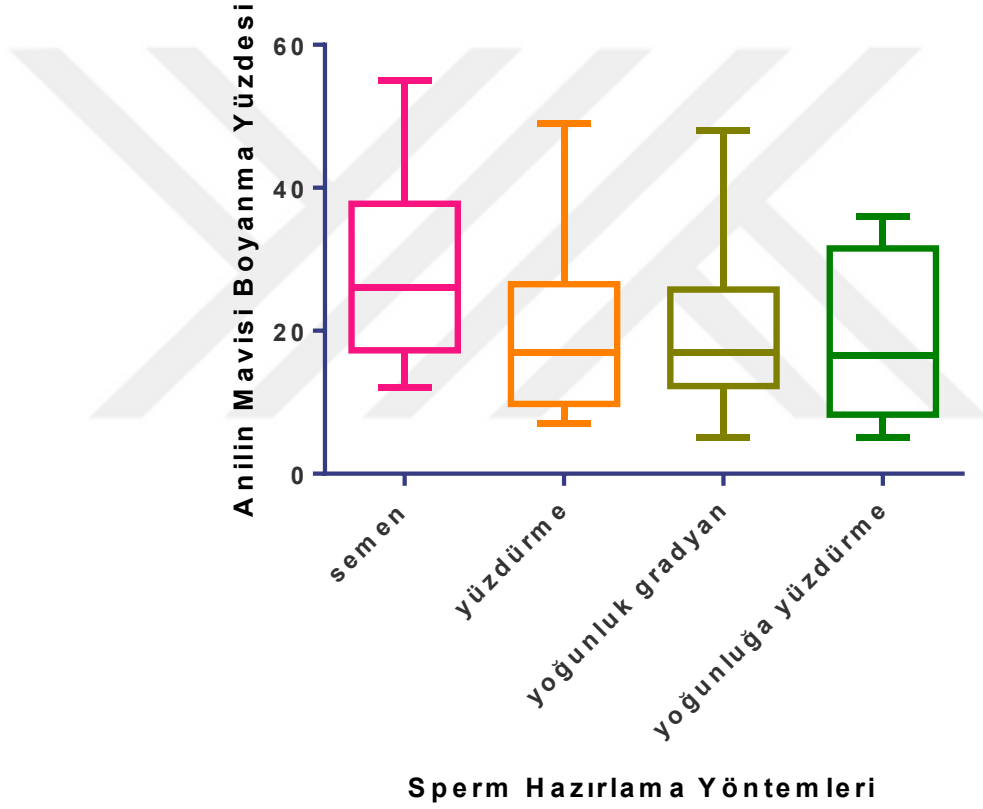
6.3. DNA Matüritesi

Anilin mavisi boyanan ve boyanmayan spermler resim 14-17'de görüldüğü gibi değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonrasında elde edilen örneklerdeki anilin mavisi boyanan sperm oranları ortanca, en düşük, en yüksek, ortamala ve standart sapmaları olmak üzere tablo 3'te gösterildi. Sperm hazırlama yöntemleri sonrası Anilin mavisi ile boyanan sperm sayıları verileri normal dağılım göstermedi ve Friedman testine göre semen, yüzdürme, yoğunluk gradyan yöntemi, yoğunluğa yüzdürme grupları arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0,0001$).

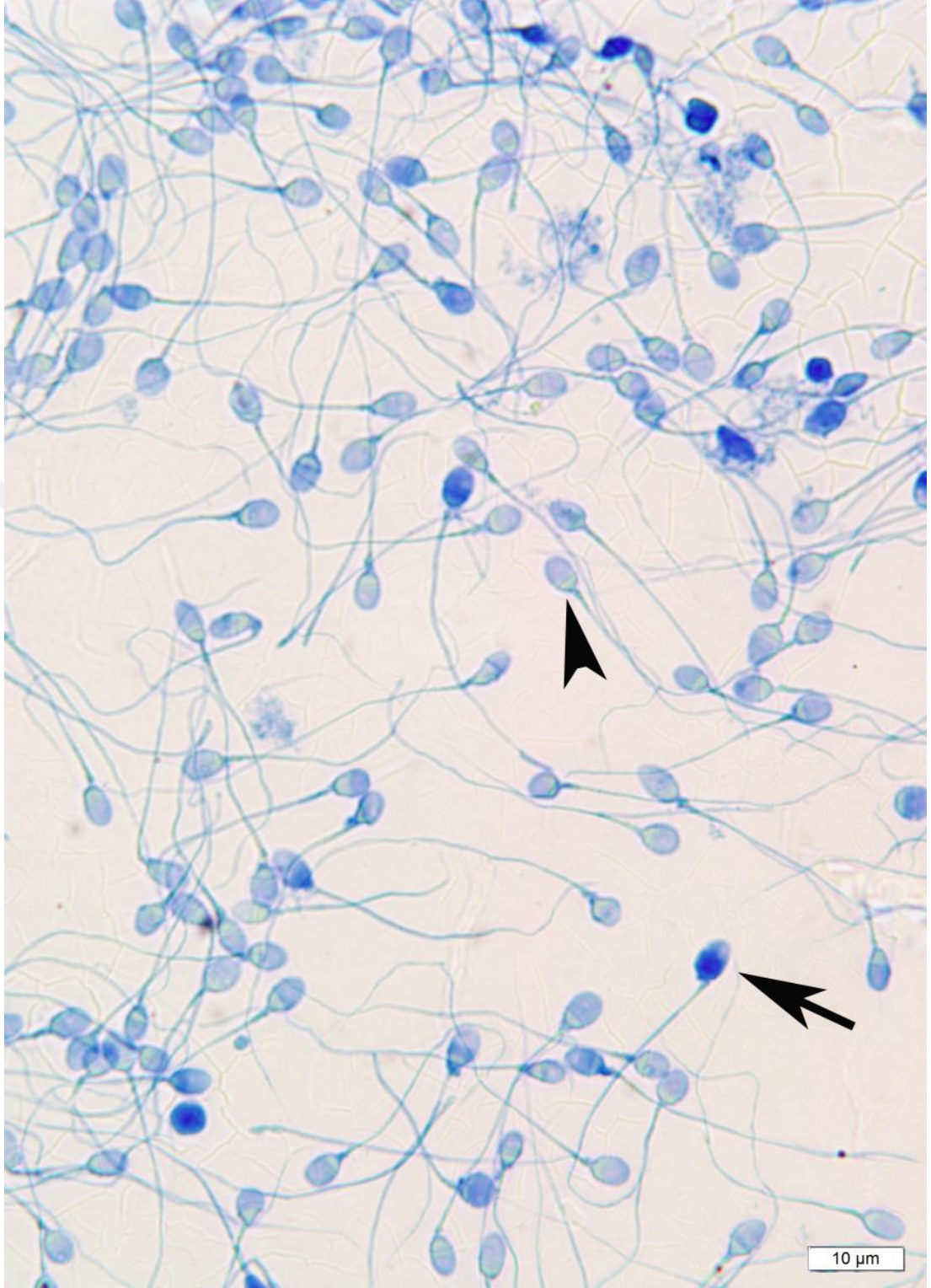
Yüzdürme, yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme gruplarının karşılaştırıldığı Friedman testinde yıkama sonrası grupların hareketlilik verileri arasındaki fark yoktu ($p > 0,05$). Ardından yapılan Dunn testine göre yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme arasındaki fark anlamsız ($p > 0,05$), yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemleri arasındaki fark anlamsız ($p > 0,05$), yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürme grupları arasındaki fark anlamsız ($p > 0,05$) bulundu (Şekil 13).

Tablo 4: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası Anilin mavisi boyanan sperm yüzdesi

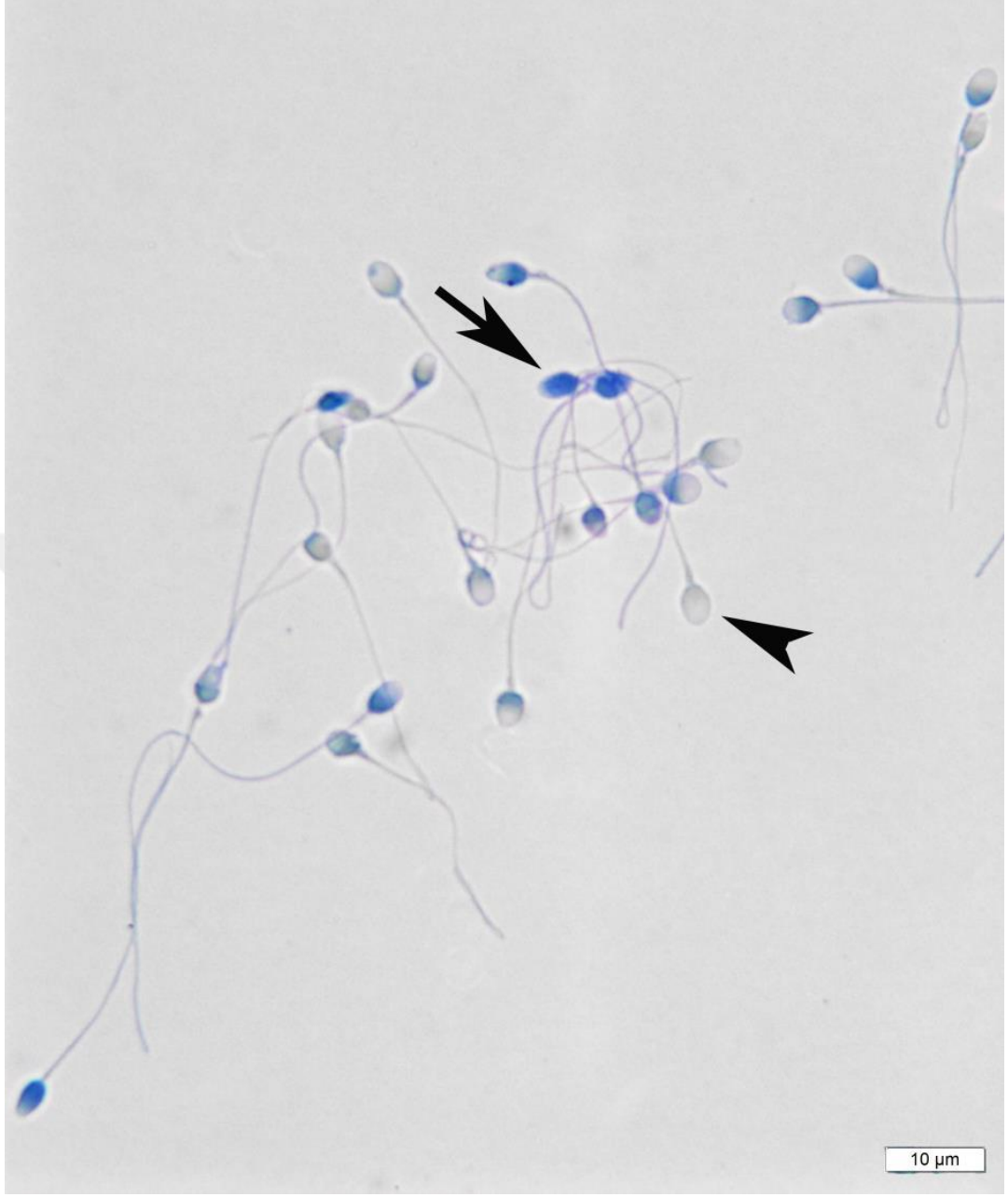
<i>Anilin Mavisi %</i>	Semen	Yüzdürme	Yoğunluk Gradyan	Yoğunluğa Yüzdürme
Ortanca	26,00	17,00	17,00	16,50
En düşük	12,00	7,000	5,000	8,250
En yüksek	55,00	49,00	48,00	36,00
Ortalama	27,69	20,13	20,94	18,31
Standart Sapma	12,84	12,54	12,47	11,42



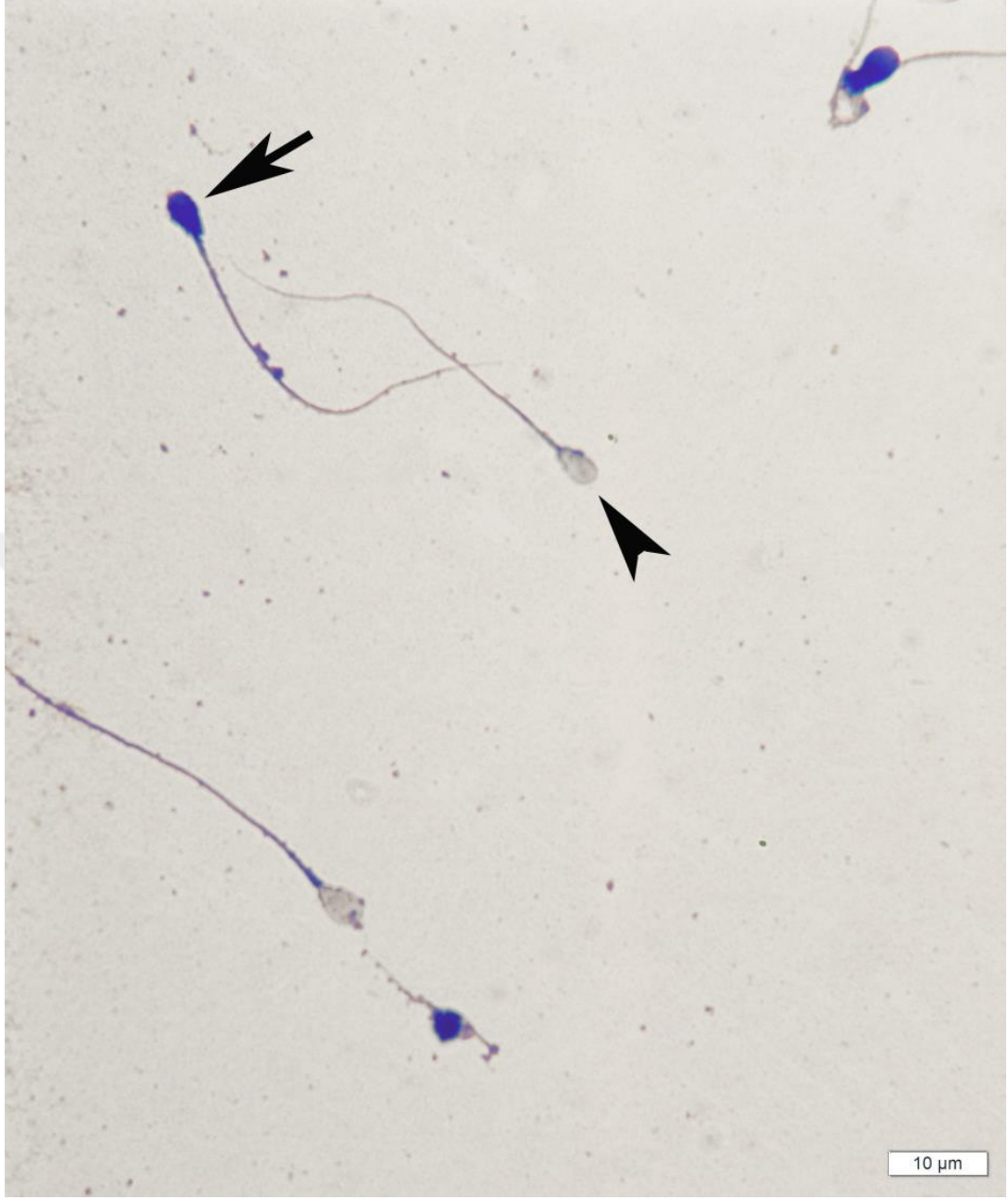
Şekil 13: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası Anilin mavisi boyanan sperm yüzdesi.



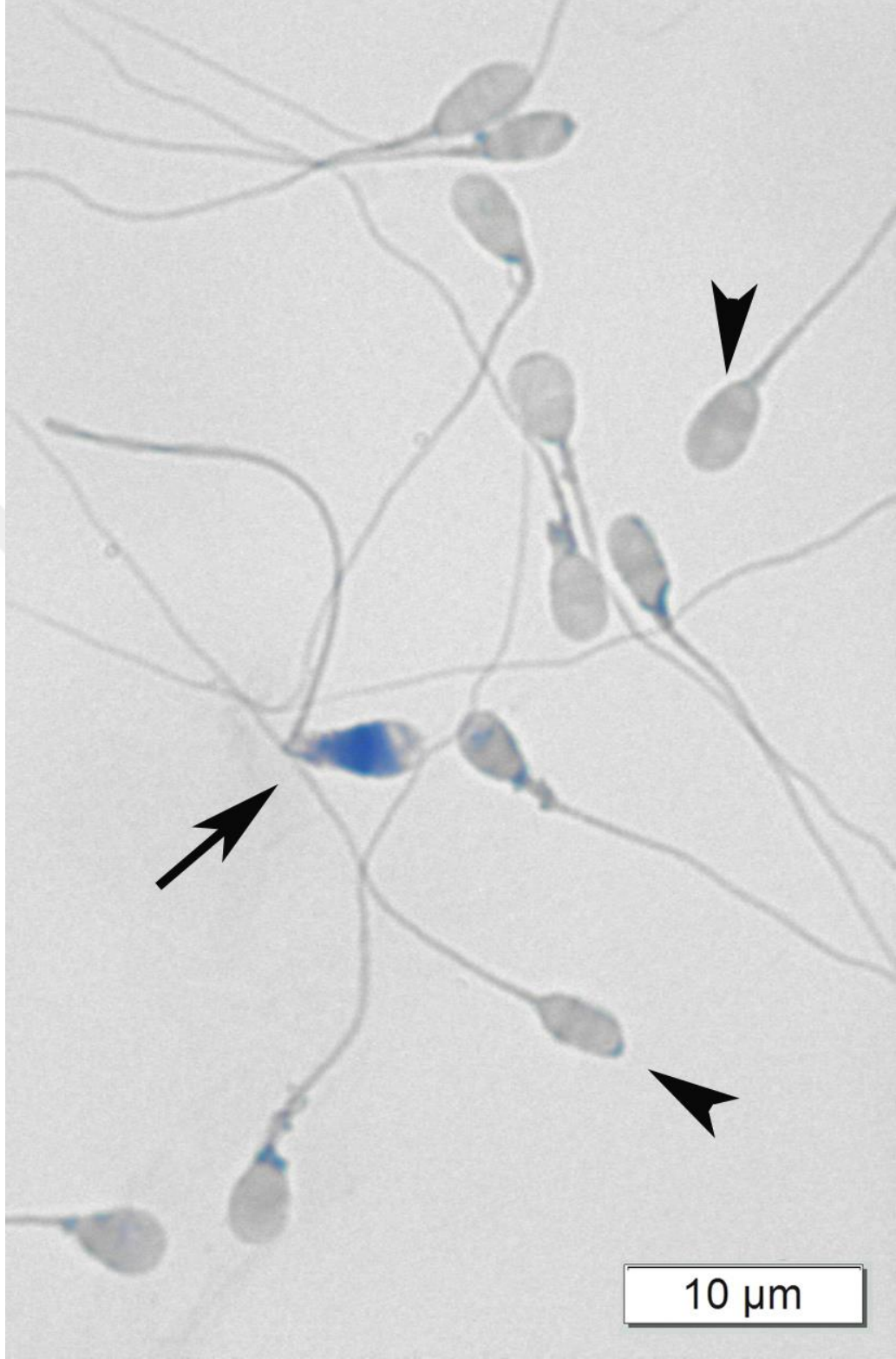
Resim 14: Anilin mavisi ile boyanmış yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış örnek. Anilin mavisi pozitif spermler (ok) ve negatif spermler (ok başı) görülmektedir.



Resim 15: Anilin mavisi ile boyanmış, yoğunluğa yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Anilin mavisi pozitif spermler (ok) ve negatif spermler (ok başı) görülmektedir.



Resim 16: Anilin mavisi ile boyanmış yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. 5 adet 3'ü boyanmış (ok), 2'si boyanmamış (ok başı) sperm görülmektedir.



Resim 17: Anilin mavisi ile boyanmış yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış örnek. Anilin mavisi pozitif spermler (ok) ve negatif spermler (ok başı) görülmektedir.

6.4. Fosfolipaz C Zeta Bulguları

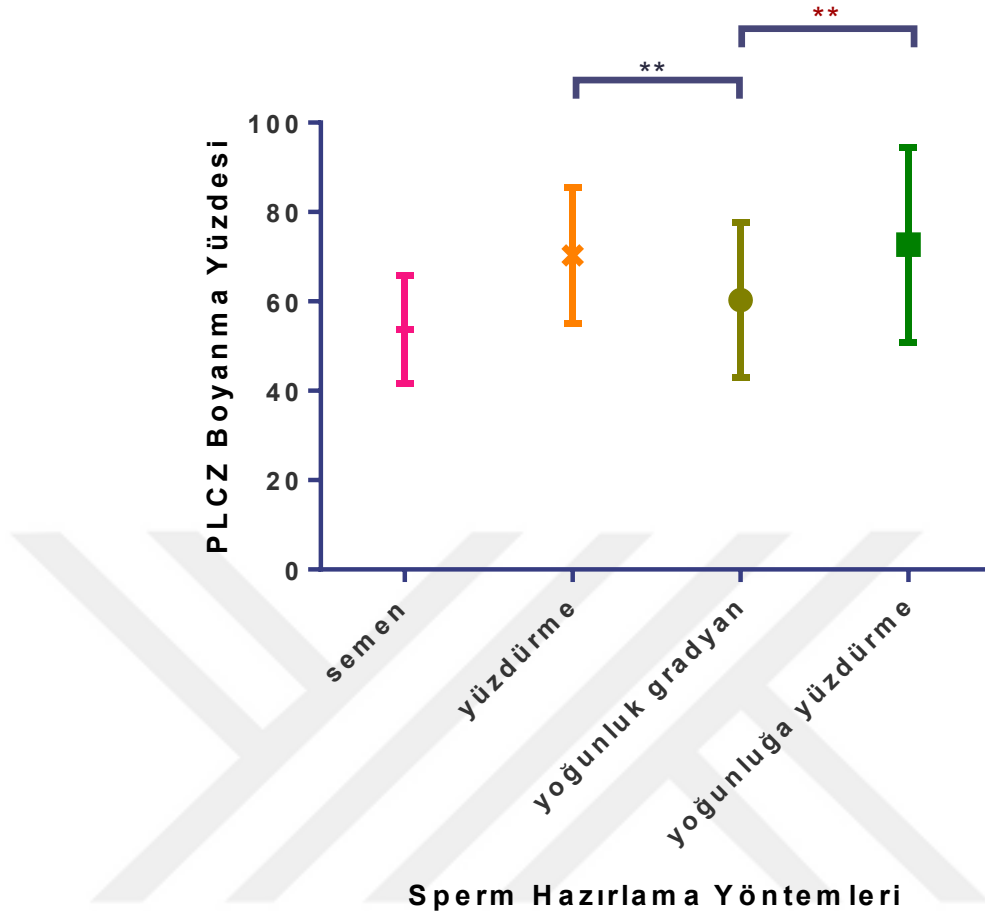
Fosfolipaz C Zeta (PLCZ) immün floresan boyama yapılan spermiler; resim 18-19'da boyanmış ve boyanmamış spermiler ışık ve floresan eş alan görüntüleri değerlendirilerek incelendi. Bu değerlendirmeler sonrasında elde edilen örneklerdeki PLCZ pozitif boyanan sperm oranları ortanca, en düşük, en yüksek, ortalama ve standart sapma değerleri olmak üzere tablo 5'te gösterildi.

Sperm hazırlama yöntemleri sonrası PLCZ ile boyanan sperm oranlarının dağılımı normal saptandı. Tekrarlı ölçümlerde varyans analizine göre semen, yüzdürme, yoğunluk gradyan yöntemi, yoğunluğa yüzdürme grupları arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0,0001$).

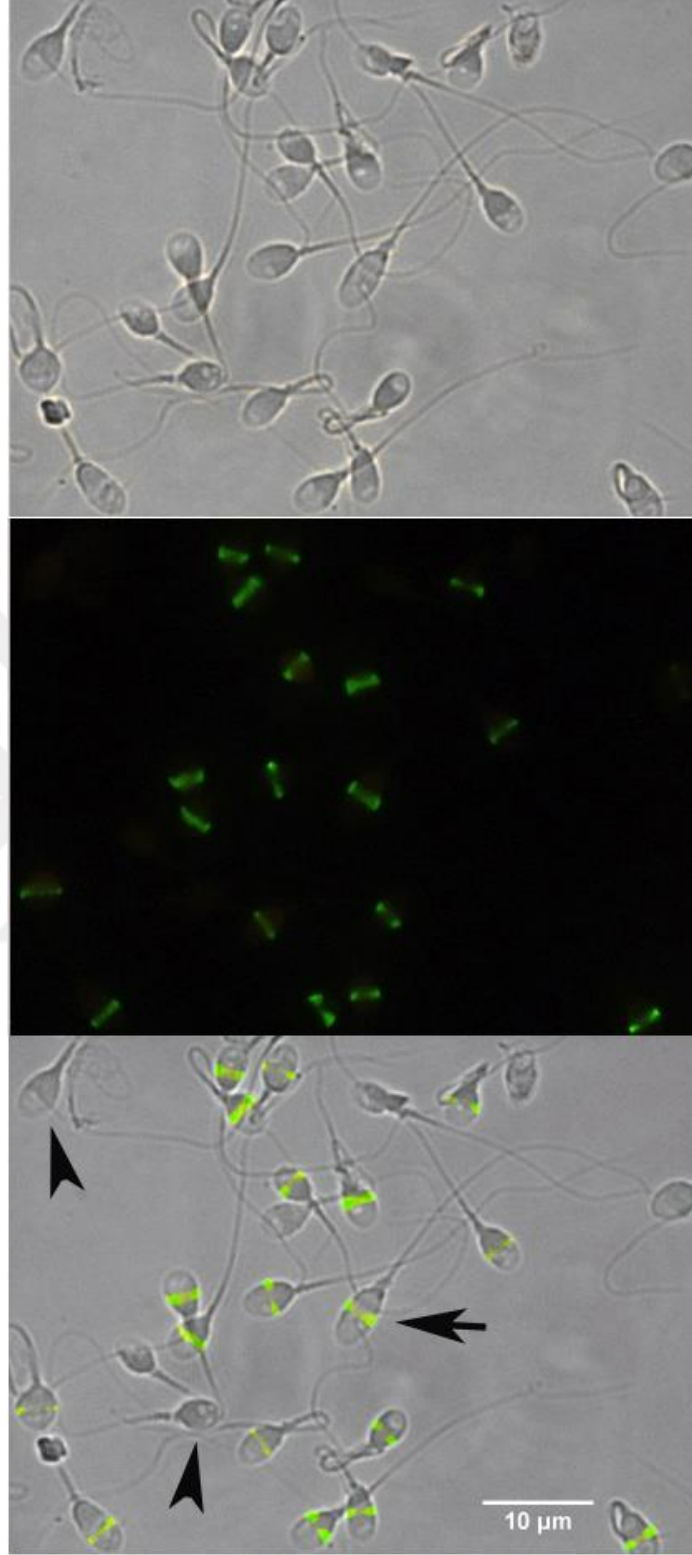
Yüzdürme, yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme gruplarının karşılaştırıldığı tekrarlı ölçümlerde varyans analizinde yıkama sonrası grupların PLCZ pozitif boyanan sperm oranları arasında fark vardı ($p < 0,0001$). Ardından yapılan Tukey testine göre yüzdürme ve yoğunluk gradyan arasındaki fark anlamlı ($p < 0,01$), yoğunluğa yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemleri arasındaki fark anlamlı ($p < 0,01$), yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürme grupları arasındaki fark anlamsız ($p > 0,05$) bulundu (Şekil 14).

Tablo 5: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası PLCZ boyanan sperm oranları

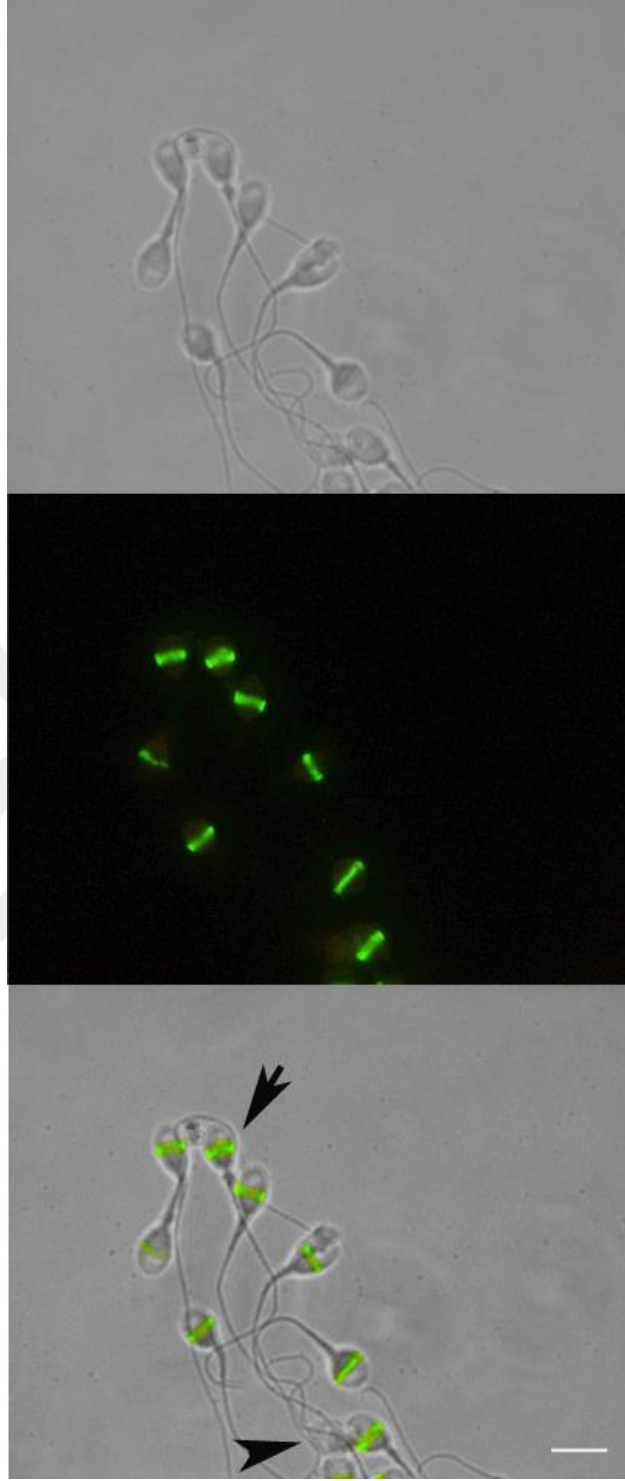
<i>PLCZ boyanması %</i>	Semen	Yüzdürme	Yoğunluk Gradyan	Yoğunluğa Yüzdürme
Ortanca	52,50	66,00	55,00	77,00
En düşük	36,00	49,00	37,00	32,00
En yüksek	76,00	93,00	96,00	97,00
Ortalama	53,63	70,25	60,25	72,69
Standart Sapma	12,10	15,26	17,41	21,82



Şekil 14: Sperm hazırlama yöntemleri sonrası PLCZ boyanan sperm oranı ortalama ve standart sapmaları. Karşılaştırmalar: yüzdürme ile yoğunluğa yüzdürme, ** p<0,01; yüzdürme ile yoğunluk gradyan ** p<0,01



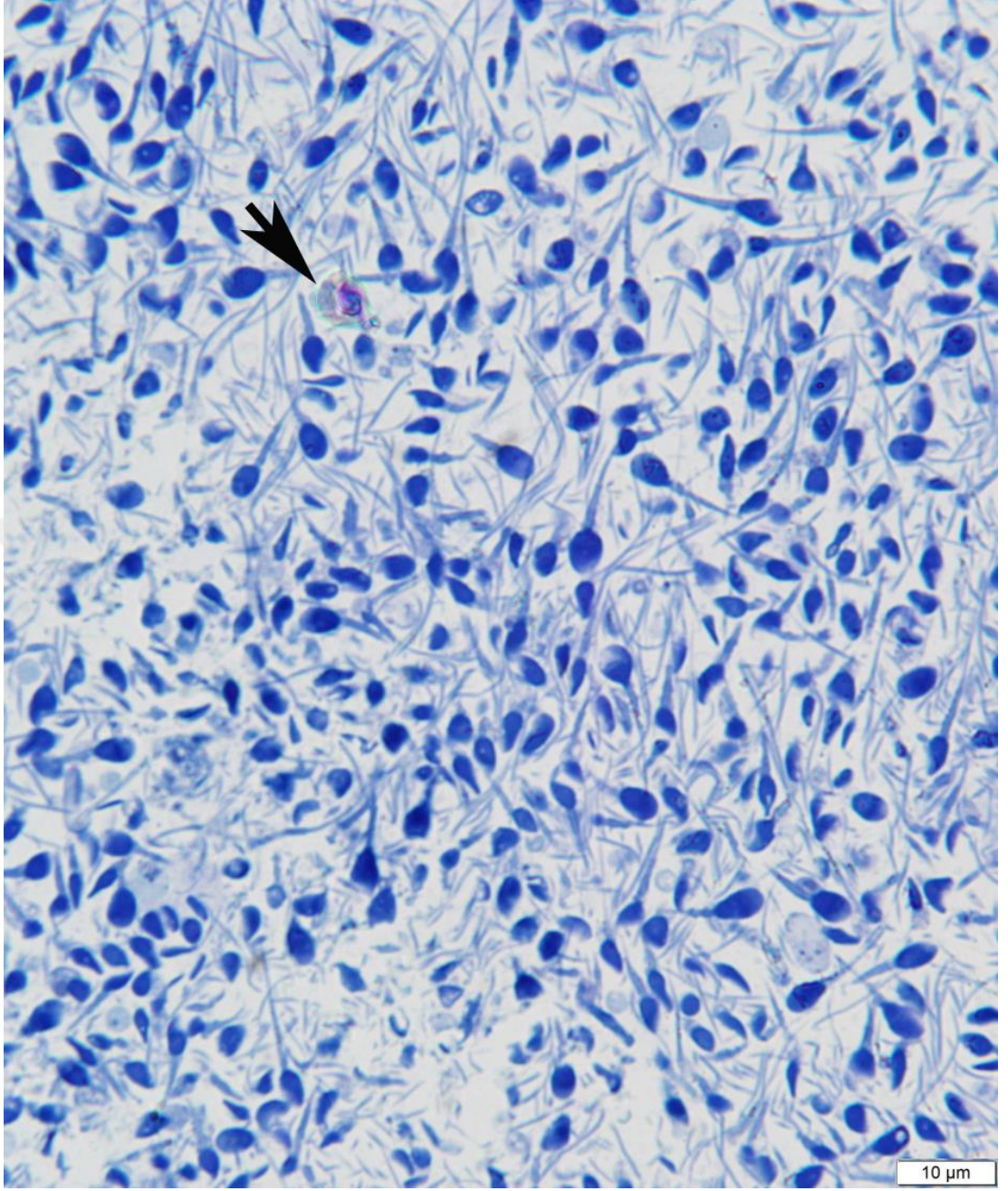
Resim 18: PLCZ immunfloresan boyaması. Üstte ışık mikroskopi, ortada floresan mikroskopi ve altta her iki görüntünün birleştirilmiş mikrografları. PLCZ boyanmış 18 sperm ve boyanmamış 7 sperm olmak üzere toplam 25 sperm başı görülmektedir.



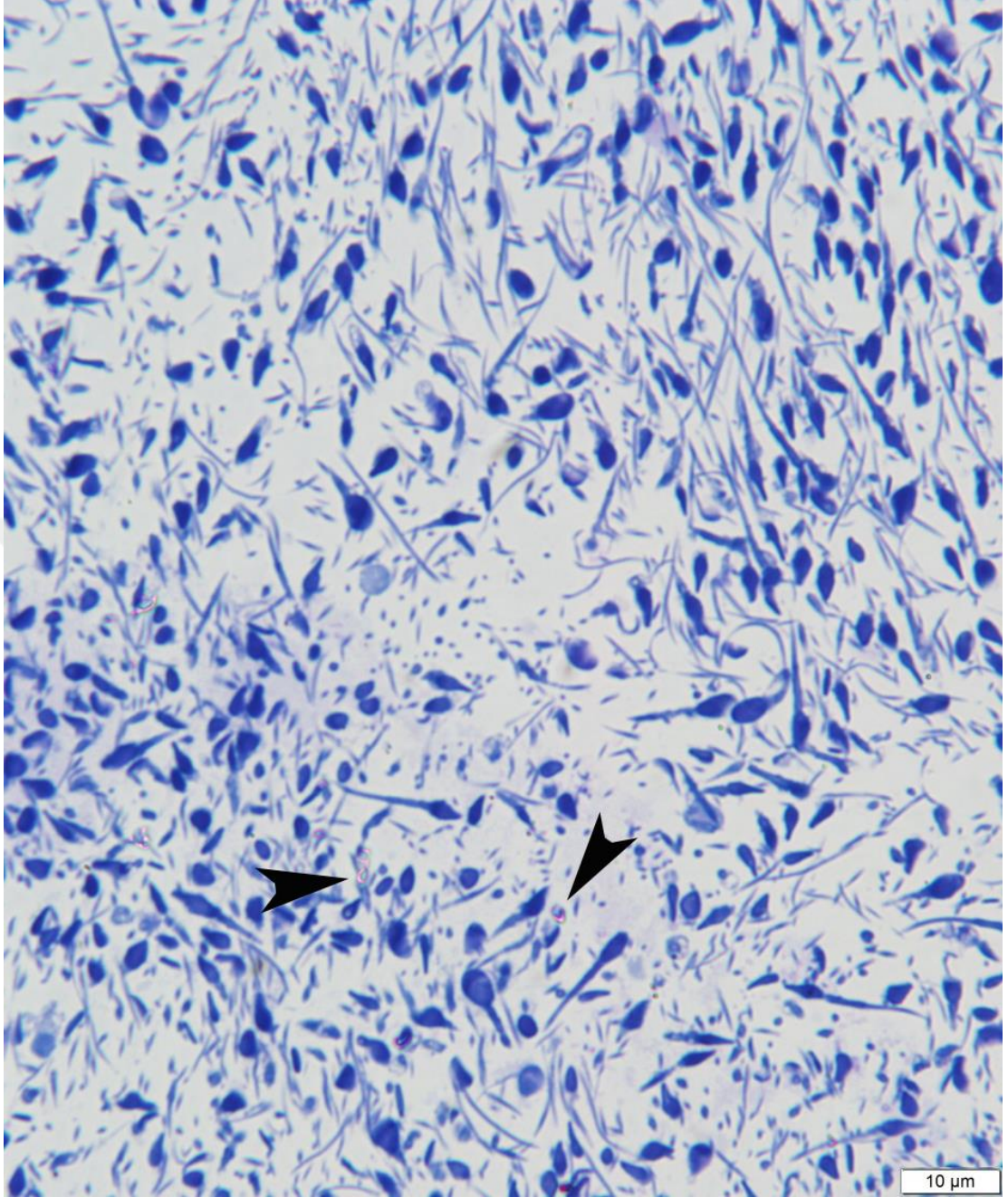
Resim 19: PLCZ immunfloresan boyaması. Üstte ışık mikroskopi, ortada floresan mikroskopi ve altta her iki görüntünün birleştirilmiş mikrografları. Yoğunluk gradyan yöntemi ile hazırlanmış örnekte 9 adet sperm başı bütün olarak görülmektedir. Bunlardan sadece bir tanesi boyanmamıştır, diğer spermeler yüksek floresan yoğunluğunda ışımaya vermektedirler. Bar 5 μm

6.5. Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları

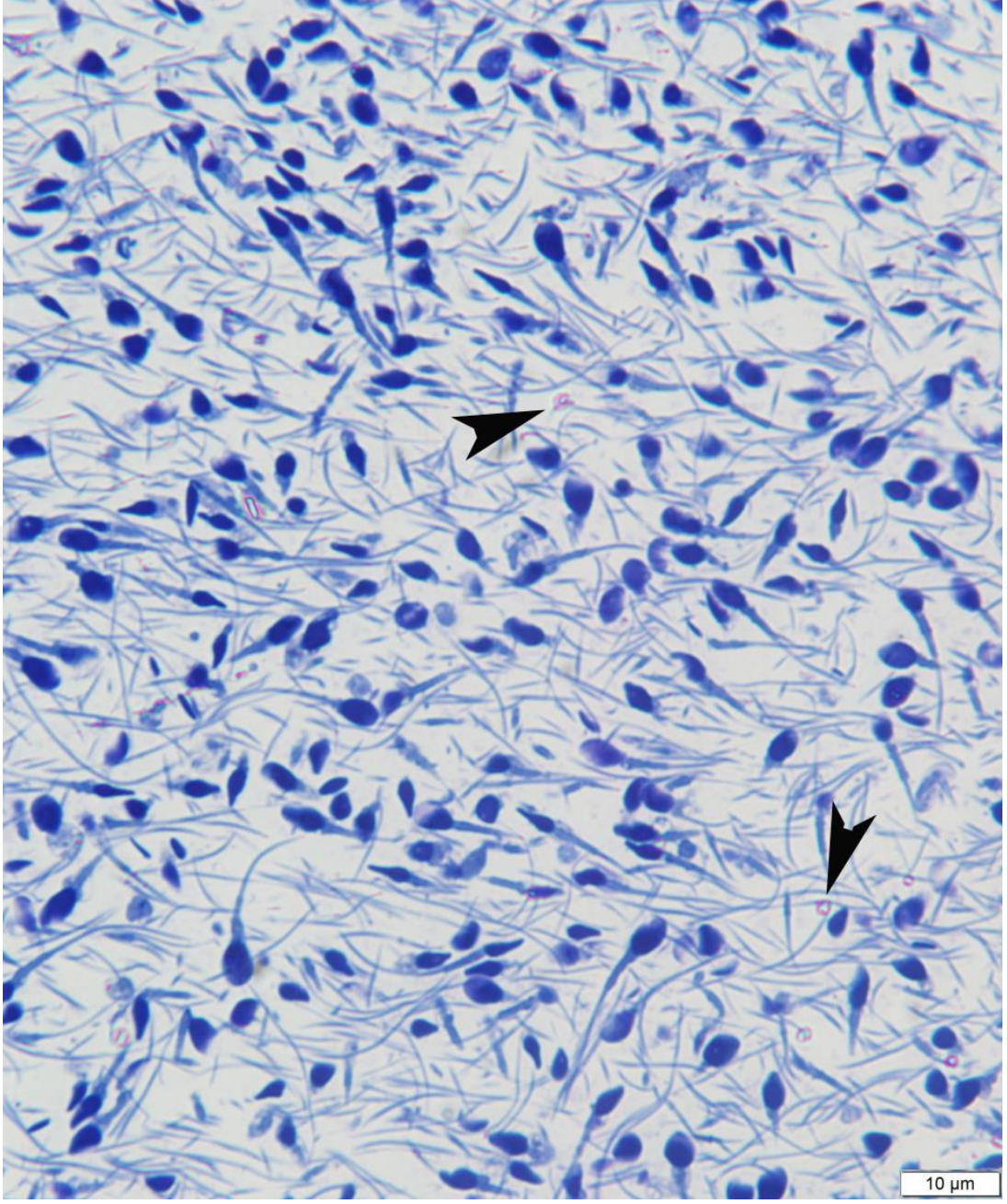
Sperm hazırlama yöntemleri uygulanmış örneklerin elektron mikroskopi takibi sonrası özellikle ince kesit yapılacak bölge ve açı seçimi için yapılan yarı ince kesitlerin kaba değerlendirilmesinde; yoğunluğa yüzdürmede çoklu anomalili spermlerin daha az görüldü ve yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemine göre normale yakın spermler ile normal spermlere daha çok rastlandı (Resim 20-22). Ayrıca metakromazi gösteren silan ile kovalent bağlı silika partiküller doğal olarak sadece yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürülen örneklerde gözlemlendi (Resim 21 ve 22). Kabaca sperm başlarının şekillerinin değerlendirilmesinde yüzdürme yönteminde anormal şekilli başların daha yoğunlukta olduğu dikkati çekti. (Resim 20). İnce kesitlerin incelenmesinde ise baş bölgesinde plazma membranının intakt olup olmadığı, eğer intakt değilse membran düzenini yitirip yitirmediği veya tamamen kaybolması ayrıca plazma membranının altında şişme olup olmadığı, akrozomal içeriğin elektron yoğunluğu, akrozomdaki vezikülasyonlar, vakuolizasyonlar ve akrozomun gözlenmemesi, nükleusta ise kondanzasyon durumu, vakuol var ise sayısı ve boyutları ile kuyruk bölgesinde yapısal anomalili sperm oranları değerlendirildiğinde: Nükleer kondanzasyon ve vakuolizasyon açısından yıkama yöntemleri arasında bir fark gözlenmedi. Yoğunluk gradyan yöntemi ile yıkanmış örneklerde, yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürmeye göre dikkati çeker miktarda plazma membranlarında ondülasyonlar ve plazma membranı ile akrozom arasında bariz genişlemeler gözlemlendi, yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürmeye yöntemleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi. Akrozomda vezikülasyon veya akrozomun tamamen kaybolması her üç yöntemde de nadiren gözlenmesinden dolayı bir kıyaslama yapılamadı. Yoğunluk gradyan yönteminde akrozomal içeriğin elektron yoğunluğunda minimal azalma gözlenirken, yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürmeye yöntemleri arasında farklılık gözlenmedi. Boyun bölgesinin kaba şekli ve mitokondrilerin ince yapısı ve kuyruk ince yapıları gruplar arasında kıyaslandığında dikkati çeker bir farklılığa rastlanılmadı (Resim 23-33).



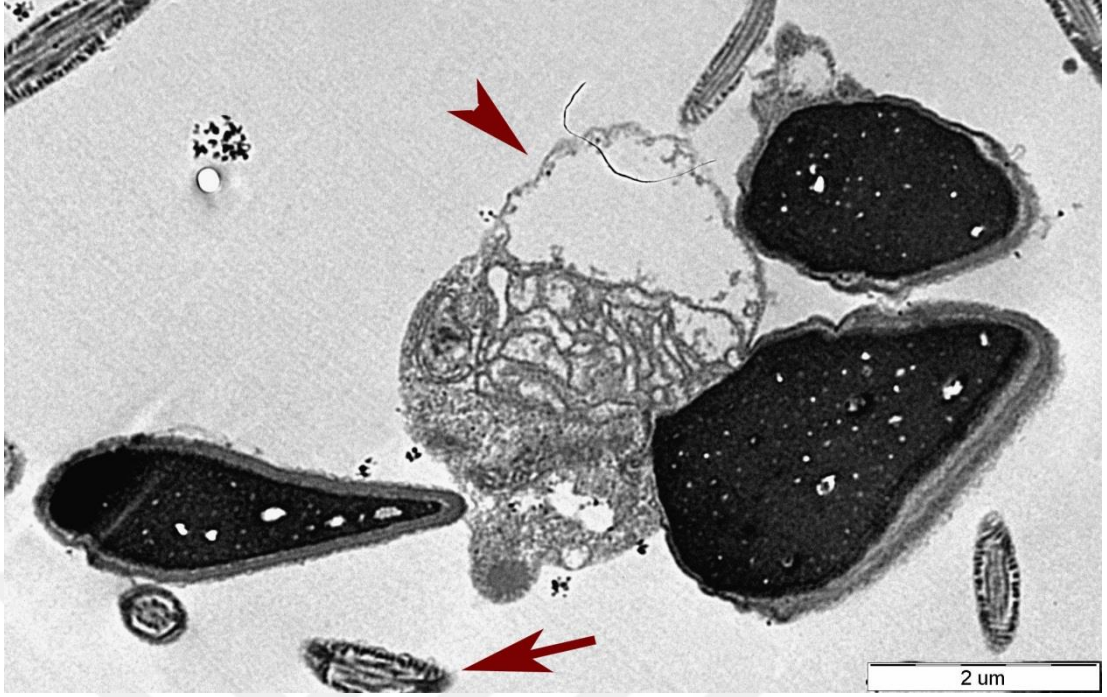
Resim 20: Yüzdürme uygulanmış örneğin yarı ince kesitinin Toluidin mavisi boyalı mikrografı. Ok: Makrofaj



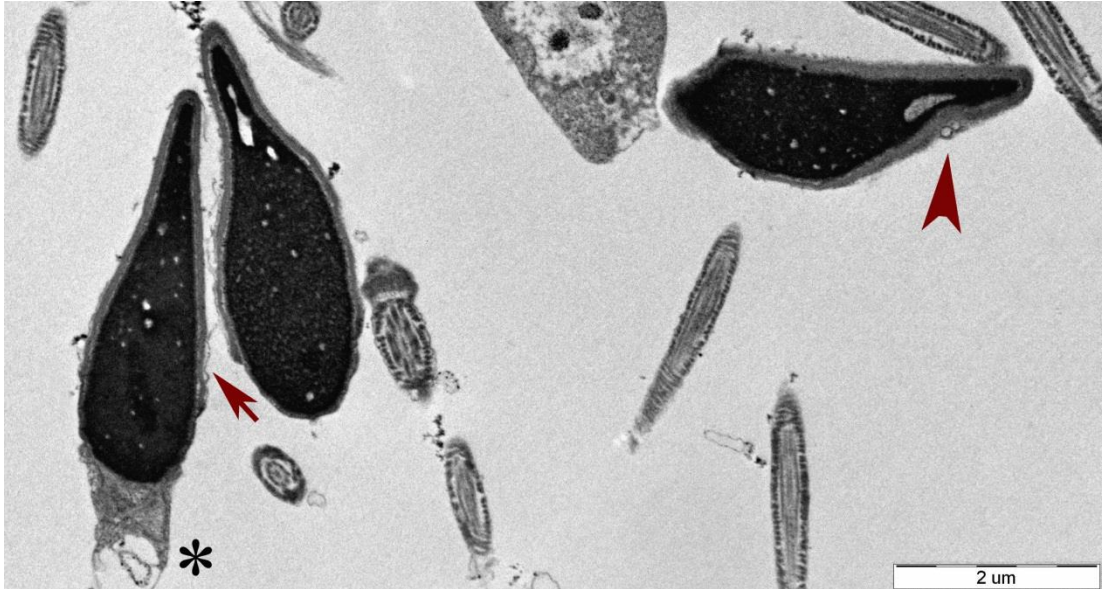
Resim 21: Yoğunluk gradyan uygulanmış örneğin yarı ince kesitinin Toluidin mavisi boyalı mikrografı. Okbaşı: metakromazi gösteren silan ile kovalent bağlı silika partiküller



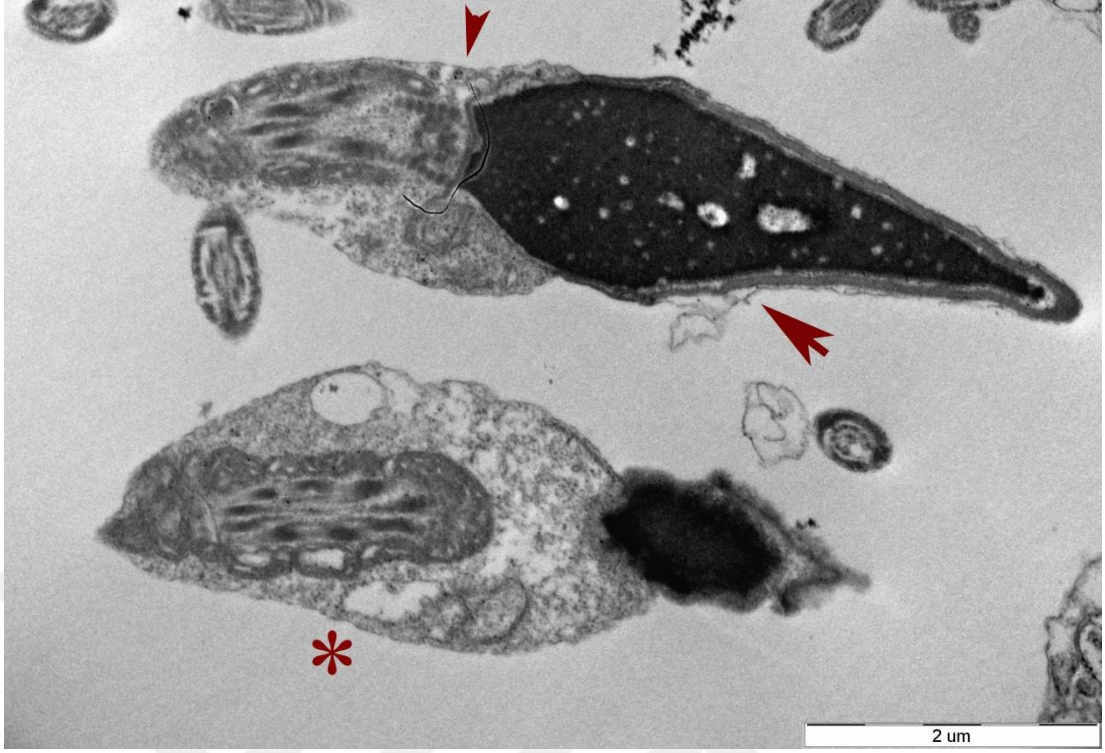
Resim 22: Yoğunluğa yüzdürme uygulanmış örneğin yarı ince kesitinin Toluidin mavisi boyalı mikrografı. Okbaşı: metakromazi gösteren silan ile kovalent bağlı silika partiküller



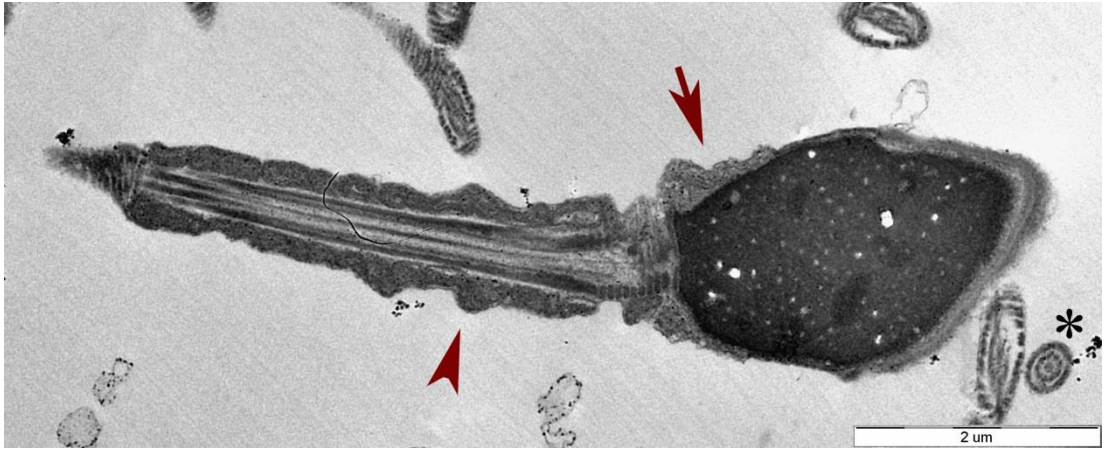
Resim 23: Elektron mikrograf. Yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Biri boyun kısmını da içeren üç sperme ait baş görülmekte, gözlenen boyun aşırı rezidüel sitoplazma içermekte (kırmızı okbaşı), çift kuyruklu bir sperme ait çift kuyruk kesiti (kırmızı ok) görülmekte.



Resim 24: Elektron mikrograf. Yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Biri boyun kısmını da içeren üç sperme ait baş, değişik açıdan kuyruk kesitleri ve bir sitoplazma parçası görülmekte. Normal şekilli başa sahip olan spermin plazma membranında şişme ve kopmalar (kırmızı ok) ve boyun kısmında ise vakuol (asteriks) görülmekte. Anormal şekilli minimal vakuolizasyon içeren diğer iki sperm başının birinde akrozomal iki vezikül (kırmızı okbaşı) görülmekte.



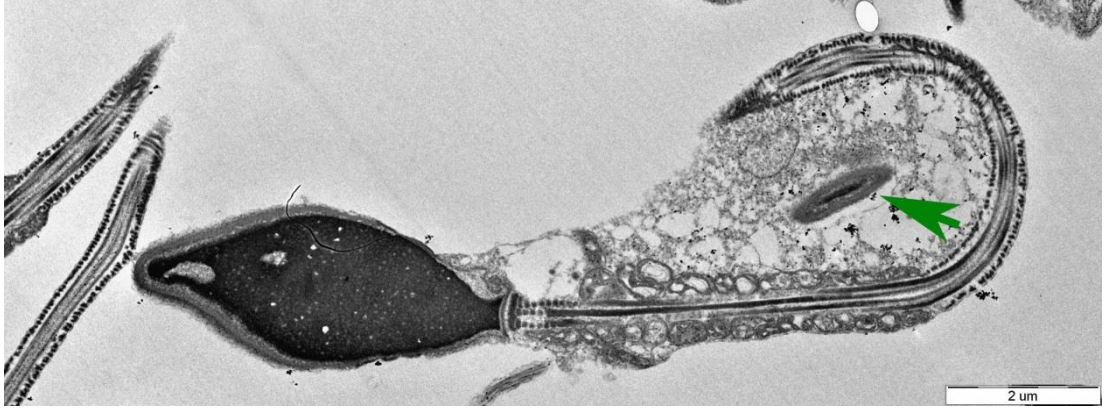
Resim 25: Elektron mikrograf. Yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Baş ve boyun kısmının görüldüğü iki sperm kesiti görülmekte. Üstteki plazma membranında minimal şişme (kırmızı ok) olan morfolojik olarak normal akrozom ve nükleusu olan bazal plate ve sentriolu (kırmızı okbaşı) görülen sitoplazması hafif şişkin sperm ile altta başında membran düzeni, akrozom yapısı ve çekirdek yapısı bozulmuş, boyun bölgesi şiş, içinde mitokondrilerle sarılı dış yoğun lifleri (kırmızı asteriks) olan sperm görülmekte.



Resim 26: Elektron mikrograf. Yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Anormal şekilli (asimetrik baş) bir sperm baş ve boyun bölgesi ile değişik kuyruk kesitleri görülmekte. Kırmızı ok: postakrozomal bölgede düzensiz hücre membranı, kırmızı okbaşı: aksonemi çevreleyen mitokondride düzensizlikler. Asteriks: 9+2 yapısının görüldüğü kuyruk kesiti.



Resim 27: Elektron mikrograf. Yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Normal akrozomlu, plazma membranında şişmeler (yeşil okbaşı) olan boyun kısmında rezidüel sitoplazma (yeşil asteriks) bulunan baş, boyun ve kuyruk kesiti gözlenen sperm ile, immatur sperm (kırmızı ok) ve 2 tane plazma membranında ileri derecede dilatasyon olan sperm başı (yeşil ok) ve kuyruk ince yapısının detaylı bir şekilde görülebildiği 7 sperm kuyruk kesiti görülmekte.



Resim 28: Elektron mikrograf. Yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Boyun kısmında muhtemelen ikinci bir sperm başı ve akrozomunun (yeşil ok) ve mitokondrilerin görüldüğü kangal şeklinde sperm görülmekte.



Resim 29: Elektron mikrograf. Yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Kapasite olmamış (siyah okbaşı) ve akrozomal reaksiyonun olduğu (yeşil ok) sperm başları ile boyun alt kısmı (yeşil asteriks), normal sperm başı (siyah ok) ve kuyruktan enine geçmiş kuyruk kesitleri görülmekte.



Resim 30: Elektron mikrograf. Yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış örnek. Birinin başında nukleus içinde artık kalmış sitoplazma (kırmızı ok) bulunan ciddi boyun anomalili 3 sperm görülmekte.



Resim 31: Elektron mikrograf. Yoğunluk gradyan yöntemi uygulanmış örnek. Akrozomlu ancak küçük yuvarlak başlı sperm (kırmızı okbaşı) ile asimetrik yapıya sahip, şişkin boynu ve normal akrozomlu (kırmızı ok) bir sperm, normale çok yakın yapıya sahip bir sperm başı (yeşil okbaşı) ve kalın boynulu asimetrik başlı bir sperm (yeşil ok) görülmektedir.



Resim 32: Elektron mikrograf. Yoğunluğa yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Kısmen yuvarlak başlı akrozomu tam oluşamamış anormal boyunlu bir sperm (kırmızı okbaşı) ile asimetrik yapıları baş ve normal akrozomlu (kırmızı ok) bir sperm ve baş boyun bağlantısında minimal düzensizlik (asteriks) olan sperm görülmekte.



Resim 33: Elektron mikrograf. Yoğunluğa yüzdürme yöntemi uygulanmış örnek. Minimal kalın boyunlu, asimetrik başlı spermın bazal plak (kırmızı ok) ve mitokondrileri (kırmızı okbaşı) ile bazal plak anormal yerleşimli bol sitoplazmalı boyunlu plazma membranında düzensizlikleri olan sperm (yeşil ok) görülmekte.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

ÜYTE yöntemlerinin uygulanmasında erkek açısından ilk ve en önemli etap sperm hazırlanmasıdır. Sperm hazırlama yöntemlerinin amacı; olgun, normal morfolojik ve genetik yapıda canlı spermi seminal plazmadan ve diğer hücrelerden ayırmaktır. Yardımcı üreme tekniklerinde bu amaçla sıklıkla kullanılan yöntemler; basit yıkama ile birlikte yoğunluk gradyan yöntemleridir.

Prensip olarak yüzdürme, hareketli olan spermleri hareket etmeleri özelliğinden faydalanarak ayırma; yoğunluk gradyan yöntemi ise hücreleri yoğunluğuna göre tabakalandırma mantığı ile çalışmaktadır.

Son 40 yılda her iki yöntemle ilgili, bunları farklı yönlerden karşılaştıran birçok çalışma yapılmış; sonuç olarak aralarında fark olmadığı sonucuna varan çalışmalar olsa da yöntemin hastanın sperm parametrelerine ve sperm hazırlama yönteminden sonra seçilecek YÜT'teki sperm ihtiyacına göre seçilmesi gerektiğini belirten araştırmacılar çoğunluktadır.

Ayrıca bunların kombinasyonu yahut modifikasyonlarını içeren denemeler de yapılmıştır. Matsuura ve ark., yoğunluk gradyan yöntemi sonrası uygulanan yüzdürmenin sadece yoğunluk gradyan yöntemi uygulanan sperme göre; DNA kırıklarını veya iyi kondanse olamamış kromatini gösteren (akridin oranj boyaması ardından flow sitometri ile ölçülen) DNA fragmantasyon indeksini düşürdüğünü, hareketliliği artırdığını göstermişlerdir (Matsuura ve ark., 2010). Yamanaka ve ark., yoğunluk gradyan yöntemi sonrası yüzdürme uyguladıkları örnekleri elektron mikroskobu ile değerlendirmiş ve bu iki yöntemin kombinasyonu ile hem baş ve kuyruk anomalilerinin azaldığını hem de hareketliliğin arttığını; ayrıca bu yöntemle sebat eden baş anomalisi yüzdesi ile ICSI sonrası başarı yüzdesi arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmişler, bu sebeple bu yöntemlerin ard arda uygulanması izole uygulanmasından ince yapısal olarak daha iyi bir sonuç verse de, daha iyi bir yöntemin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır (Yamanaka ve ark., 2016).

Literatürde aşağı yüzdürme (swim-down) olarak bahsedilen sperm hazırlama yöntemi; albumin içeren medyum ile farklı konsantrasyonda veya kesintili gradyanlarla ve huni (funnel) ile enjektör kullanılarak sadece rutin testler ile araştırılmıştır (Gonzales ve Pella, 1993; Ing ve ark., 1991; Kaneko ve ark., 1987). Ancak o dönemde genel olarak kullanılan IVF uygulaması için rutin kullanıma

geçmemiştir. Aşağı yüzdürme tekniğinin bu tezde sperm ayırma yöntemlerinde kullanılma nedeni aradan geçen yirmi yıllık sürede ICSI uygulanmaya başlanması, bunun yaygınlaşması ve uygulama için gerekli sperm sayısının birkaç tanelere düşmesi, böylece artık sayıdan daha çok kalitenin önem kazanmasıdır. Tezde bu nedenle aşağı yüzdürmenin modifikasyonu olan yoğunluğa yüzdürme yöntemi huni kullanılmadan, açılı verilmeden ve farklı konsantrasyonda kesintili gradyanlar yerine tekli gradyan kullanılarak uygulandı ve etkinliği rutin testlere ek olarak DNA matürasyonu, PLCZ içermesi ve ince yapısı ile araştırıldı.

Tez kapsamında uygulanan sperm yıkama yöntemleri temel laboratuvar yöntemlerine uygun olarak optimize edildi. Örneğin pH ve ozmolarite normal değerlerden artan ya da azalan uçlara doğru değiştirildiğinde sperm hareketliliğini kaybederler. Ancak hafif alkali ve hiperozmolar ortamın hareketliliği hafif artırdığı bildirilmiştir (Makler ve ark., 1981). Bu sebeple sperm hazırlama yöntemlerinde hipoozmolariteden kaçınılıp pH 7,4 – 7,5 aralığının sağlanması amaçlandı. Spermin medyuma alındığı yöntemlerde uygun tamponlanma yapıldı. Havalandırılmayan inkübatör kullanıldığında HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$) veya MOMPS ile tamponlu medyum kullanılırken, eğer inkübatör %5 CO_2 ayarlanmış ise sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) ile tamponlanmış medyum kullanıldı ve hava alacak şekilde tüp yarım kapatıldı (Gardner, 2006). Bu tez için bu sebeple bikarbonat eklenmiş medyum (G-IVF) ve %5 CO_2 'li inkübatör kullanıldı.

ÜYTE yöntemlerinden IUI ve klasik IVF yöntemlerinde spermin yumurtaya ulaşip içerisine girebilmesi için hareket etmesi vazgeçilmezdir. Yapılan IUI çalışmasında yıkama sonrası hareketlilik >%70 olduğunda gebelik oranları anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir (Branigan ve ark., 1999). Bu nedenle tezde yıkama yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılan ilk parametre hareketli sperm oranı oldu. Ayrıca yüzdürme ve aşağı yüzdürme karşılaştırıldığında, aşağı yüzdürmenin hareketli spermi seçmekte daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Ing ve ark., 1991). Çalışmadaki bulgular değerlendirildiğinde; her üç sperm hazırlama yöntemi bazal ile karşılaştırıldığında hareketlilikte anlamlı artış sağladığı görüldü. Hareketli sperm oranı yüzdürme sonrası %89, yoğunluğa yüzdürme sonrası %92,5 iken gradyan sonrası %72 olup, yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürmenin gradyan yöntemi ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde hareketli sperm

miktarını artırdığı bulundu. Bunun nedeninin ise gradyan yönteminin, aynı yoğunluktaki hareketli spermi, ölü veya hareketsiz olan spermden ayırt edememesi olacağı düşünüldü.

Spermiogramda olduğu gibi ÜYTE için semen hazırlanmasında da kullanılan en önemli diğer bir parametre morfolojidir. Tezde WHO 2010 manuelinde de önerdiği Papanicolaou boyaması ile anomali değerlendirildi ve fiksasyon hatalarını bertaraf etmek için yayma sonrası preparat kurur kurumaz fiksasyon yapılmasına azami özen gösterildi. Değerlendirme için Kruger ve arkadaşlarının 1986'da tarif ettiği kriterlere çok benzeyen WHO 2010 kriterleri kullanıldı. Bu kriterlere göre normal morfolojiye sahip sperm oranının $\geq 4\%$ olduğu vakalarda gebelik oranlarının anlamlı olarak arttığı ve sperm morfolojisinin IVF başarısını değerlendirmede önemli bir parametre olduğu bildirilmiştir (Kruger ve ark., 1988; Kruger ve ark., 1986). Tezde sperm morfolojileri değerlendirildiğinde semen ile yıkama yöntemleri arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Verilerin ortalamalarına bakıldığında semen <yüzdürme> yoğunluk gradyan<yoğunluğa yüzdürme sıralamasında olma eğilimi görüldü. Bu sıralamanın nedeni tekniklerin temel prensipleri ile açıklamak mümkündür. Yıkama yöntemleri kendi arasında kıyaslandığında sadece yüzdürme yöntemi ile yoğunluğa yüzdürme arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Bunun sebebi ise yüzdürmede, spermlerin sadece hareketli olması gerekirken; yoğunluk gradyanda, uygun yoğunlukta; yoğunluğa yüzdürmede ise hem hareketli hem de gradyandan geçebilecek yapıda olması gerekmesidir.

Şüphesiz fertilizasyonu takiben normal bir gebeliğin oluşmasında DNA'nın yapısı çok önemlidir. Sperm yıkama teknikleri sonrası elde edilen spermlerin DNA yapılarına ait çalışmalardan Liu ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada: hareketliliği düşük olan spermlerdeki DNA fragmentasyonunun, hareketliliği yüksek olan spermlere oranla daha fazla olduğunu ve gradyan yöntemi kullanılarak sağlam DNA'ya sahip spermlerin etkin olarak ayrılmakta olduğu gösterilmiştir (Liu ve Liu, 2013).

Xue ve arkadaşları ise gradyan veya yüzdürme yöntemi ile DNA fragmentasyonu olan spermlerin elendiğini göstermekle birlikte, Yamanaka ve ark. yoğunluk gradyan yönteminin fragmente spermleri elimine etmekte yüzdürmeden daha etkin olduğunu göstermiş ve sebep olarak yüzdürme işlemi sürecinde sağlam

DNA'ya sahip spermlerin ROS üreten hücreler ile birlikte yoğunluk gradyan yöntemine kıyasla daha uzun süre inkübe edildikleri için, sperm örneklerindeki sperm DNA hasarının daha yüksek çıkmakta olduğu görüşünü bildirmişlerdir (Xue ve ark., 2014; Yamanaka ve ark., 2016).

Tezde uygulanan parametrelerden DNA matüritesi değerlendirildiğinde, yıkama sonrası gruplar ve semen arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu, bunun yanı sıra semenin yüksek Anilin mavisi boyanmasına sahip olduğu, yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemlerinin hem ortanca hem de ortalamalarının birbirleri ile yakın değerlerde olduğu ve yoğunluğa yüzdürmenin en düşük Anilin mavisi boyanması gösterme eğilimde olduğu da gözlemlendi. Ancak yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. DNA matüritesini değerlendirmek için yapılmış olan Anilin mavisi, yoğunluğa yüzdürmenin normal morfolojili sperm artışını ve elektron mikroskopundaki bulgularını destekler niteliktedir.

Son yıllarda rutin semen analizi ve sperm fonksiyon testlerinin spermin fertilizasyon kapasitesinin tayininde yetersiz kalmaları, fizyolojiyi daha iyi tanıyıp yeni testler üretme ihtiyacı doğurmuştur. İlk defa 2002 yılında aktivitesi açıklanarak tanımlanan PLCZ spermin oositin içine girmesi ile oositte Ca salınımlarını başlatıp fertilizasyonu sağlar (Saunders ve ark., 2002). Genel olarak oosit aktivasyon faktörü olarak kabul edilmektedir. İnfertilite ve PLCZ ilişkisi çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Heytens ve ark., 2009; Yoon ve ark., 2008). Yelumalai ve arkadaşlarının fertil ve infertil hastaların spermlerindeki PLCZ'nin miktarını ve olup olmasını karşılaştırdıkları çalışmada infertil hastalarda PLCZ miktarının fertil hastalardan daha az olduğunu ve PLCZ içeren sperm oranının daha düşük olduğunu rapor ettiler ve ayrıca ICSI uygulamalarında PLCZ boyanan sperm oranı ile fertilizasyon oranı arasında bir ilişki olduğu rapor edildi (Yelumalai ve ark., 2015). Bu sebeple tezde sperm hazırlama yöntemlerinin etkinliği değerlendirilirken PLCZ pozitif sperm yüzdesinin ne kadar değiştirdiği de değerlendirildi. PLCZ boyanan sperm yüzdelere bakıldığında semen<yoğunluk gradyan yöntemi<yüzdürme<yoğunluğa yüzdürme sıralaması görülmektedir. Bu sıralamadaki yıkama grupları arasında sadece yüzdürme ile yoğunluk gradyan ve yoğunluk gradyan ile yoğunluğa yüzdürme arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi. Bu da rutinde sıklıkla

kullanılan yoğunluk gradyan yönteminin fertilizasyonda kilit rol üstlenen PLCZ'ya sahip spermleri seçmekte yüzdürme ve yoğunluğa yüzdürme kadar başarılı olmadığını göstermektedir.

Sperm anomalileri şüphesi anomalinin bulunduğu yere ve tipine bağlı olarak fertilizasyon olmasına engel teşkil edebilmektedir. Anomalili spermlerin IVF uygulamasında ayrılmamış olması, sonuçları kötü etkilemesi beklenen bir gerçektir. Sperm hazırlamada morfolojik olarak hedef, normal sperm sayısını artıracak, anormal sperm başına düşen anomali sayısını düşürecek şekilde bir sperm popülasyonu seçmek olmalıdır. Anomalinin bu kadar önemli olması ve bazı yapısal anomalilerini ışık mikroskopunda tanımak imkansız olmasından dolayı bir çok çalışmada olduğu gibi tezde de yıkama yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesinde geçirimli elektron mikroskopundan faydalanıldı (Yamanaka ve ark., 2016). Daha önceki çalışmalarda yoğunluk gradyan yöntemi veya yüzdürme yöntemlerinin ardından ince yapısal olarak hala örnekte anomalili spermlerin oldukları rapor edilmiştir (Bartoov ve ark., 2002; Monqaut ve ark., 2011; Obara ve ark., 2001).

Tezde uygulanan her üç yıkama sonrası örneklerin elektron mikroskobu değerlendirilmesi sonucunda en çarpıcı bulgu yöntemlerin plazma membranı üzerine etkileri oldu. Yoğunluk gradyan yönteminde daha sık gözlenen plazma membranlarında ondülasyonlar ve plazma membranı ile akrozom arasında bariz genişlemeler akrozomal değişikliklerin muhtemelen uzun süreli santrifuj ile alakalı olacağı düşünüldü. Ancak bu etkinin ICSI uygulaması üzerine etkisinin olumlu mu yoksa olumsuz mu olduğu tartışılmaktadır (Takeuchi ve ark., 2004). Tezde yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme yöntemleri sonucu hala gözlenen silan ile kovalent bağlı silika partiküller, uygulanan iki aşamalı yıkamanın IUI ve GIFT vakaları için yetersiz olduğunu göstermektedir. Yarı ince kesitlerin kabaca değerlendirilmesinde; yoğunluğa yüzdürmede çoklu anomalili spermlerin daha az görülmesi ve normale yakın spermler ile normal spermlere yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemine göre daha çok rastlanması da ışık bulgularını destekler niteliktedir. Diğer elektron mikroskobu bulguları olan yüzdürme yöntemi ve yoğunluk gradyan yöntemi karşılaştırıldığında; kuyruk anomalilerinin yüzdürmede az olması, baş anomalilerinin de yoğunluk gradyan yönteminde az olması dikkati çekti. Ancak yoğunluğa

yüzdürme yönteminde hem kuyruk anomalisi hem de baş anomalisine az rastlandı. Bu bulgu, yoğunluğa yüzdürmede her iki yöntemin avantajları kullanıldığından dolayı gerçekleştiği düşündürdü. Yüzdürme ve gradyan santrifuj yönteminin sonuçları literatürle de uyumlu bulundu (Le Lannou ve Blanchard, 1988; Piomboni ve ark., 2006; Yamanaka ve ark., 2016).

Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar bu tez kapsamında değerlendirilmemiş olsa da semende bulunan ve semendeki hücreler tarafından üretilir veya tüketilir ve sonuçta sperm fertilizasyon kapasitesini direkt olarak etkilerler (Agarwal ve ark., 1994; Agarwal ve ark., 2003; Aitken ve Clarkson, 1988; Shekarriz ve ark., 1995). Sperm üzerine olumsuz etkisi olan serbest oksijen radikalleri başlıca semene karışan kan hücreleri tarafından üretilmekte olup sperm bu ürünlerden bir an önce ayrılması gerekmektedir. Bu süreç doğal olarak da ejakulasyonu takiben vajinada gerçekleşen likefikasyonu takiben birkaç dakikada hareketli sperm servikal mukusa penetre olması ile gerçekleşmektedir. Ayrıca santrifuj vorteksleme işlemlerinin serbest oksijen radikallerini artırdığı daha önce rapor edilmiş olup kaçınılması önerilmektedir (Agarwal ve ark., 1994). Tezde kullanılan sperm yıkama yöntemleri teorik olarak serbest oksijen radikalleri üretimi açısından karşılaştırıldığında: yoğunluk santrifuj ve yoğunluğa yüzdürme yöntemlerinde sperm 30 dakika içerisinde seminal plazmadaki diğer hücrelerden ayrıldığı bu sürecin yüzdürmede 60 dakikaya uzadığı dolayısıyla oksidatif stres açısından dezavantajlı yöntem olduğu varsayılabilir. Ancak santrifuj açısından değerlendirildiğinde en avantajlı yöntemin yüzdürme, en dezavantajlı yöntemin yoğunluk gradyan santrifujlemesi olacağı açıktır.

Rutinde kullanım için başarı kadar önemli bir diğer faktör de maliyettir. Harcanan malzeme açısından çok az farketse de en ucuz yöntem yüzdürme yöntemi olup, yoğunluğa yüzdürme yöntemi ve yoğunluk gradyan santrifujlemesi yönteminin maliyeti eşittir. Ancak maliyete uygulayan kişinin harcadığı zaman eklendiği zaman yüzdürme en pahalı, yoğunluk gradyan ve yoğunluğa yüzdürme ise aynıdır.

Sonuç olarak bu tezde: ÜYTE için yaygın olarak kullanılan sperm yıkama yöntemleri ile etkinliği açısından karşılaştırılan yoğunluğa yüzdürme yönteminin; yoğunluk gradyan yöntemine göre hareketliliği yüksek ve oosit aktivasyon faktörünü içeren sperm oranı yüksek spermi seçmekte daha etkin olduğu, bununla birlikte

morfolojisi daha düzgün ve DNA hasarı düşük olan spermleri seçmede de yüzdürme ve yoğunluk gradyan yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha başarılı olma eğilimde olduğu gözlendi. Ayrıca kimyasal açıdan yenilik içermediği, maliyet açısından uygun, uygulama açısından pratik olması nedeniyle rutin pratiğe geçirilebilecek mit vaad eden bir yöntem olduğu ancak daha yüksek örnek sayılarıyla üzerinde çalışılması gerektiği dnld.



8. KAYNAKLAR

Agarwal, A., Ikemoto, I. and Loughlin, K. Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swim-up and L4 filtration. *Archives of andrology* 1994;32(3):169-174.

Agarwal, A., Makker, K. and Sharma, R. Review article: clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology* 2008;59(1):2-11.

Agarwal, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J. and Alvarez, J.G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and sterility* 2006;86(3):503-512.

Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility* 2003;79(4):829-843.

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C. and du Plessis, S.S. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health* 2014;32(1):1-17.

Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of andrology* 1988;9(6):367-376.

Amdani, S.N., Jones, C. and Coward, K. Phospholipase C zeta (PLCzeta): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Advances in biological regulation* 2013;53(3):292-308.

Bansal, A.K. and Bilaspuri, G. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International* 2010;2011.

Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezes, Y. and Barak, Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *Journal of andrology* 2002;23(1):1-8.

Beydola, T., Sharma, R.K., Lee, W. and Agarwal, A. Sperm preparation and selection techniques. *Male Infertility Practice* 2013:244-251.

Branigan, E.F., Estes, M.A. and Muller, C.H. Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. *Fertility and sterility* 1999;71(3):547-551.

Canale, D., Giorgi, P.M., Gasperini, M., Pucci, E., Barletta, D., Gasperi, M. and Martino, E. Inter and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different

techniques: layering, swimup from pellet and percoll. *Journal of endocrinological investigation* 1994;17(9):729-732.

Chen, S.-j., Allam, J.-P., Duan, Y.-g. and Haidl, G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Archives of gynecology and obstetrics* 2013;288(1):191-199.

Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromboise, M., Jonge, C.J. and Carrell, D.T. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of andrology* 2006;27(1):53-59.

Coetzee, K., Kruger, T.F. and Lombard, C.J. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Human reproduction update* 1998;4(1):73-82.

Dadoune, J., Mayaux, M. and Guihard-Moscato, M. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988;20(3):211-217.

Delilbaşı, L. *In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni uygulamalar ve güncel yaklaşımlar)*. Ankara: Güneş Kitabevleri 2008:61-83.

Devillard, F., Metzler-Guillemain, C., Pelletier, R., DeRobertis, C., Bergues, U., Hennebicq, S., Guichaoua, M., Sele, B. and Rousseaux, S. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Human reproduction* 2002;17(5):1292-1298.

du Plessis, S.S., Makker, K., Desai, N.R. and Agarwal, A. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 2008;3(4):539-554.

Eroschenko, V.P. and Di Fiore, M.S. *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Foresta, C., Zorzi, M., Rossato, M. and Varotto, A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *International journal of andrology* 1992;15(4):330-337.

Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F. and Lenzi, A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human reproduction* 2000;15(4):830-839.

Gardner, D.K. *In vitro fertilization: a practical approach*. CRC Press; 2006.

Gartner, L. and Hiatt, J. *Color textbook of histology*. 2007, Philadelphia: Saunders. In.: Elsevier; 2007.

Gartner, L.P., Hiatt, J.L. and Strum, J.M. Cell biology and histology. Williams & Wilkins; 1998.

Gharagozloo, P. and Aitken, R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. Human reproduction 2011;26(7):1628-1640.

Gonzales, G. and Pella, R. Swim-down: a rapid and easy method to select motile spermatozoa. Archives of andrology 1993;30(1):29-34.

Grasa, P., Coward, K., Young, C. and Parrington, J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C ζ , in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. Human reproduction 2008;23(11):2513-2522.

Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Franco, G., Anniballo, N., Mendoza, C. and Tesarik, J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Human reproduction 2005;20(1):226-230.

Henkel, R.R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. Asian journal of andrology 2011;13(1):43.

Heytens, E., Parrington, J., Coward, K., Young, C., Lambrecht, S., Yoon, S.Y., Fissore, R.A., Hamer, R., Deane, C.M., Ruas, M., Grasa, P., Soleimani, R., Cuvelier, C.A., Gerris, J., Dhont, M., Deforce, D., Leybaert, L. and De Sutter, P. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men. Human reproduction 2009;24(10):2417-2428.

Ing, R.M., Harding, A.M. and Jones, W.R. A comparison of swim-down and swim-up methods for the extraction of high motility sperm. Fertility and sterility 1991;55(4):817-819.

Kaneko, S., Sato, H., Kobayashi, T. and Iizuka, R. Funnel procedure to separate human sperm with good motility. Archives of andrology 1987;19(2):107-113.

Kanwar, K.C., Yanagimachi, R. and Lopata, A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. Fertility and sterility 1979;31(3):321-327.

Kashir, J., Heindryckx, B., Jones, C., De Sutter, P., Parrington, J. and Coward, K. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. Human reproduction update 2010;16(6):690-703.

Kashir, J., Heynen, A., Jones, C., Durrans, C., Craig, J., Gadea, J., Turner, K., Parrington, J. and Coward, K. Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase

C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online* 2011;23(2):263-267.

Kierszenbaum, A. *Histology & Cell Biology: an Introduction to Pathology*, 2007. Mosby Inc 2007.

Koppers, A.J., Mitchell, L.A., Wang, P., Lin, M. and Aitken, R.J. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochemical Journal* 2011;436(3):687-698.

Kotwicka, M., Depa-Martynów, M., Butowska, W., Filipiak, K., Pawelczyk, L. and Jedrzejczak, P. Human spermatozoa ultrastructure assessment in the infertility treatment by assisted reproduction technique. *Archives of andrology* 2007;53(6):297-302.

Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simmons, K.F., Swanson, R.J., Matta, J.F. and Oehninger, S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and sterility* 1988;49(1):112-117.

Kruger, T.F., Menkveld, R., Stander, F.S., Lombard, C.J., Van der Merwe, J.P., van Zyl, J.A. and Smith, K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and sterility* 1986;46(6):1118-1123.

Le Lannou, D. and Blanchard, Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *Journal of reproduction and fertility* 1988;84(2):551-556.

Lee, J., Kamiguchi, Y. and Yanagimachi, R. *Andrology: Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes.* *Human reproduction* 1996;11(9):1942-1946.

Liu, D.-Y. and Liu, M.-L. Clinical value of sperm DNA damage should be assessed in motile sperm fraction rather than whole ejaculated sperm. *Fertility and sterility* 2013;99(2):367-371.

Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R. and Spadafora, C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA and cell biology* 1997;16(9):1087-1097.

Makler, A., David, R., Blumenfeld, Z. and Better, O.S. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertility and sterility* 1981;36(4):507-511.

Marangos, P., FitzHarris, G. and Carroll, J. Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* 2003;130(7):1461-1472.

Martin, R.H., Rademaker, A.W., Greene, C., Ko, E., Hoang, T., Barclay, L. and Chernos, J. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biology of reproduction* 2003;69(2):535-539.

Matsuura, R., Takeuchi, T. and Yoshida, A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian journal of andrology* 2010;12(5):753.

Menkveld, R., Wong, W.Y., Lombard, C.J., Wetzels, A.M., Thomas, C.M., Merkus, H.M. and Steegers-Theunissen, R.P. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human reproduction* 2001;16(6):1165-1171.

Monqaut, A.L., Zavaleta, C., López, G., Lafuente, R. and Brassesco, M. Use of high-magnification microscopy for the assessment of sperm recovered after two different sperm processing methods. *Fertility and sterility* 2011;95(1):277-280.

Mortimer, D. Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review* 1994;3(02):97-111.

Mortimer, D. *Practical laboratory andrology*. Oxford University Press on Demand; 1994.

Mortimer, D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reproduction, fertility and development* 1994;6(1):25-31.

Obara, H., Shibahara, H., Tsunoda, H., Taneichi, A., Fujiwara, H., Takamizawa, S., Idei, S. and Sato, I. Prediction of unexpectedly poor fertilization and pregnancy outcome using the strict criteria for sperm morphology before and after sperm separation in IVF-ET. *International journal of andrology* 2001;24(2):102-108.

Overstreet, J.W., Gould, J.E., Katz, D.F. and Hanson, F.W. In vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fertility and sterility* 1980;34(6):604-606.

Owen, D.H. and Katz, D.F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of andrology* 2005;26(4):459-469.

Perry, A.C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y. and Yanagimachi, R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999;284(5417):1180-1183.

Piomboni, P., Bruni, E., Capitani, S., Gambera, L., Moretti, E., La Marca, A., De Leo, V. and Baccetti, B. Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Archives of andrology* 2006;52(1):51-59.

Rengan, A.K., Agarwal, A., van der Linde, M. and du Plessis, S.S. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012;10(1):92.

Rogers, B.J., Perreault, S.D., Bentwood, B.J., McCarville, C., Hale, R.W. and Soderdahl, D.W. Variability in the human-hamster in vitro assay for fertility evaluation. *Fertility and sterility* 1983;39(2):204-211.

Ross, M.H. and Pawlina, W. *Histology*. 11th ed. Usa: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health;; 2006: 784 - 828.

Sadler, T.W. *Langman's medical embryology*. 11th ed. Usa: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health; 2011: 27-30.

Sahmay, S., Atasu, T. and Karacan, I. The effect of intrauterine insemination on uterine activity. *International journal of fertility* 1989;35(5):310-314.

Saleh, R.A. and Agarwal, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of andrology* 2002;23(6):737-752.

Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K. and Lai, F.A. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002;129(15):3533-3544.

Shamsi, M.B., Imam, S.N. and Dada, R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2011;28(11):1073-1085.

Shekarriz, M., DeWire, D., Thomas Jr, A.J. and Agarwal, A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *European urology* 1995;28:31-31.

Sikka, S.C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current medicinal chemistry* 2001;8(7):851-862.

Standring, S. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. Elsevier Health Sciences; 2015.

Steele, E.K., McClure, N., Maxwell, R.J. and Lewis, S.E. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Molecular human reproduction* 1999;5(9):831-835.

Swann, K., Saunders, C.M., Rogers, N.T. and Lai, F.A. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Seminars in cell & developmental biology* 2006;17(2):264-273.

Takeuchi, T., Colombero, L.T., Neri, Q.V., Rosenwaks, Z. and Palermo, G.D. Does ICSI require acrosomal disruption? An ultrastructural study. *Human reproduction* 2004;19(1):114-117.

Terquem, A. and Dadoune, J. Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In, *The sperm cell*. Springer; 1983. p. 249-252.

Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D.S. and Aitken, R.J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human reproduction* 1998;13(6):1429-1436.

Twigg, J., Irvine, D. and Aitken, R. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* 1998;13(7):1864-1871.

Van Zyl, J., Kotze, T. and Menkveld, R. Predictive value of spermatozoa morphology in natural fertilization. *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*, AA Acosta, RJ Swanson, SB Ackerman, TF Kruger, JA Van Zyl, R Menkveld (eds), Baltimore, Williams and Wilkins 1990:319-324.

Visco, V., Raffa, S., Elia, J., Delfino, M., Imbrogno, N., Torrisi, M.R. and Mazzilli, F. Morphological sperm defects analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy and their correlation with sperm motility. *International journal of urology* 2010;17(3):259-266.

WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge university press; 1999.

WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. World Health Organization Press; Geneva; 2010:10-166.

Xue, X., Wang, W.-S., Shi, J.-Z., Zhang, S.-L., Zhao, W.-Q., Shi, W.-H., Guo, B.-Z. and Qin, Z. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2014;31(9):1161-1166.

Yamanaka, M., Tomita, K., Hashimoto, S., Matsumoto, H., Satoh, M., Hiromi, K., Hosoi, Y., Inoue, M., Nakaoka, Y. and Morimoto, Y. Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms. *Journal of Reproduction and Development* 2016;62(6):599-606.

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD, editors. Eds. In.: New York: Raven Press; 1994.

Yelumalai, S., Yeste, M., Jones, C., Amdani, S.N., Kashir, J., Mounce, G., Da Silva, S.J., Barratt, C.L., McVeigh, E. and Coward, K. Total levels, localization patterns, and proportions of sperm exhibiting phospholipase C zeta are significantly correlated with fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility* 2015;104(3):561-568 e564.

Yoon, S.Y., Jellerette, T., Salicioni, A.M., Lee, H.C., Yoo, M.S., Coward, K., Parrington, J., Grow, D., Cibelli, J.B., Visconti, P.E., Mager, J. and Fissore, R.A. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *The Journal of clinical investigation* 2008;118(11):3671-3681.

Young, C., Grasa, P., Coward, K., Davis, L.C. and Parrington, J. Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertility and sterility* 2009;91(5 Suppl):2230-2242.

Zini, A., Finelli, A., Phang, D. and Jarvi, K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* 2000;56(6):1081-1084.

9. ETİK KURUL ONAYI



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

<i>BAŞVURU BİLGİLERİ</i>	PROTOKOL KODU	09.2016.185	70737436-050.06.04-
	PROJE ADI	Sperm hazırlama yöntemlerinin etkinliğinin Fosfolipaz C Zeta ,Anilin Mavisi ve ultrastrüktürel olarak karşılaştırmalı incelenmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof. Dr. Şule ÇETİNEL	

<i>KARAR BİLGİLERİ</i>	Tarih : 04 /03/ 2016 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
------------------------	--

ÜYELER					
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Prof.Dr. Atilla KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> EVET - HAYIR	
Prof.Dr. Semra SARDAS	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Doç.Dr. Eriş KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Doç.Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Doç.Dr. Tolga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	
Av. Ümit ERDEM	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var - Yok	<input type="checkbox"/> Evet - Hayır	

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Elif	Soyadı	Kervancıoğlu Demirci
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	1985
Uyruğu	T.C.	Tel	02164212222#1595
E-mail	drelifkervancioglu@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	2017
Lisans	Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (İngilizce)	2010
Lise	Sankt Georg Avusturya Lisesi (Almanca, İngilizce)	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Pratisyen Tabip, Sorumlu Hekim	Başakşehir Toplum Sağlığı Merkezi	2011-2013
Araştırma Görevlisi	İstanbul Medeniyet Üniversitesi	2015-2017
Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi	2013-2017

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Almanca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Fransızca	İyi	Orta	Orta
İtalyanca	İyi	Orta	Zayıf

Yabancı Dil Sınav Notu

YÖKDİL - İngilizce	KPDS - İngilizce	YÖKDİL - Almanca
90	85	87,5

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	76,05	76,57	68,68

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Word, Graphpad Prism, MS Powerpoint, Endnote, Adobe Photoshop, MS Excell, IBM SPSS, Image J	Çok iyi İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

Diğer iş deneyimleri

- Cell Culture Lab, Immunohistochemistry and Histochemistry Lab, Electron Microscopy Unit, Cell Biology Lab (RT-PCR);
Institute of Cell Biology, Histology and Embryology, Medical University of Graz
Graz – Avusturya
Misafir Araştırmacı, Eyl-Ara 2014
- Reproductive Medicine Unit of Elizabeth Garrett Anderson and Obstetric Hospital, The University College London Hospitals (UCLH)
Londra – İngiltere
Staj, Haz-Tem 2008
- Hücre Kültürü Ünitesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD – İstanbul
Staj, Tem-Ağu 2007
- IVF Merkezi, Özel Sani Konukoğlu Hastanesi - Gaziantep
Staj, Tem-Ağu 2005

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCIE)

- **Kervancıoğlu Demirci E.**, Salamonsen L.A., Gauster M. (2016) "The Role Of CX3CL1 In Fetal-Maternal Interaction During Human Gestation" Cell Adhesion And Migration, Volume 5, Issue 1
(Impact Factor: 4) Alıntılanma Sayısı: 2
- Karaca N., Solakoglu S., Ekten G., **Kervancıoğlu E.**, Yılmaz R., Kervancıoğlu M.E. (2014). The First Successful Pregnancy In A Globozoospermic Patient Having Homozygous Mutation In SPATA16, Fertility And Sterility; 102(1)103
(Impact Factor: 4.5) Alıntılanma Sayısı: 13
- Koyuncuoğlu Türkan, Uren Dogan, Yildirim Cagan, Atal Sefa Semih, Vizdiklar Caner, Yılmaz Hakan, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Akakin Dilek, Yüksel Meral, Yegen Berrak. (2017) "Obestatin improves oxidative brain damage and memory dysfunction in rats induced with an epileptic seizure" Peptides 90, 37-47., Doi: 10.1016/j.peptides.2017.02.005
(Impact Factor: 2.5)
- Şen Ali, Özkan Sevil, Recebova Kafiye, Çevik Özge, Ercan Feriha, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Bitlis Leyla, Şener Göksel (2016). Effects Of Myrtus Communis Extract Treatment In Bile Duct Ligated Rats. Journal Of Surgical Research, 205(2), 359-367., Doi: 10.1016/J.Jss.2016.06.094
(Impact Factor: 2.1)
- Şekerci Çağrı Akin, Tanidir Yilören, Sener Tarik Emre, Şener Göksel, Çevik Özge, Yarat Aysen, Tüzüner Alev, Çetinel Şule, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Sahan A, Akbal Cem (2017). Effects Of Platelet-Rich Plasma Against Experimental Ischemia/Reperfusion Injury In Rat Testis. Journal Of Pediatric Urology, Doi: 10.1016/J.Jpurol.2016.12.016
(Impact Factor: 2)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Gauster Martin, Salamonsen Lois A. (2017). The Role Of CX3CL1 In Fetal-Maternal Interaction During Human Gestation. 15th International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry (Sözlü Sunum); *Antalya; Türkiye*
- Sekerci Cagri Akin, Tanidir Yilören, Sener Tarik Emre, Sahan Ahmet, Çevik Özge, Yarat Aysen, Tüzüner Burçin Alev, Çetinel Şule, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Şener Göksel, Akbal Cem (2016). Protective Effect Of Platelet Rich Plasma On Experimental Ischemia Reperfusion Injury In Torsion Of Rat Testis. 27th Congress Of The Espu (Sözlü Sunum); *Harrogate; İngiltere*
The Journal Of Urology, 195(4), 584-585., Doi: 10.1016/J.Juro.2016.02.224
(Impact factor: 5.1)
- Koyuncuoğlu Türkan, Uren Dogan, Yildirim Cagan, Atal Sefa Semih, Vizdiklar Caner, Yilmaz Hakan, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Akakin Dilek, Yüksel Meral, Yegen Berrak (2015). The Protective Effects Of Obestatin On Oxidative Brain Damage Of Rats With Pentylentetrazol Ptz Induced Epileptic Seizures. Joint Meeting Of The Feps And The Baltic Physiological Societies. (Sözlü Sunum); *Kaunas; Litvanya*
Acta Physiologica, 215-137., Doi: 10.1111/Apha.12626
(Impact factor: 4.8)
- Şekerci Çağrı Akin, Tanidir Yilören, Şener Tarik Emre, Sahan Ahmet, Çevik Özge, Yarat Aysen, Tüzüner Burçin Alev, Çetinel Şule, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Şener Göksel, Akbal Cem (2016). Protective Effect Of Platelet Rich Plasma On Experimental Ischemia Reperfusion Injury In Torsion Of Rat Testis. American Urological Association Aua2016 (Poster Sunum); *San Diego; Amerika Birleşik Devletleri*
- Kervancıoğlu Gülnaz, Çetinel Şule, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Kervancıoğlu Mehmet Ertan (2015). The Optimization Of Vitrification Technique For Freezing Of Prepubertal Testicular Tissue The 4th World Congress Of International Society For Fertility Preservation. The 4th World Congress Of International Society For Fertility Preservation (Poster Sunum); *Şangay; Çin*
- Yilmaz R., Ozgon G., Ekter Kanten G., Selman S., Ozgal M., Karaca N., **Kervancıoğlu E.**:(2013) Is There Any Relationship Between Peripheral Sex Chromosome Mosaicism and Cumulus Cell Sex Chromosome Structure? A Case Report
Ovarian Club III: The Inverse Pyramid:Regulating Follicle Number and Oocyte Quality; (Poster Sunum)
Paris; Fransa

Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

- Akakin D. ve **Kervancıoğlu Demirci E.**: Chapter 12: Lymphoid Tissue, BRS Cell Biology and Histology (Board Review Series) Gartner L.P., Hiatt J.L., Hürdağ C., Editor. 2015 (7th Edition) İstanbul Tıp Kitapevi, p. 199-220. ISBN:9781451189513, (İngilizce-Türkçe Tıbbi Çeviri)
- **Kervancıoğlu E.**: Chapter 11: The Circulatory System, Junqueira's Basic Histology, Solakoğlu S., Editor. 2015 (13th Edition) Nobel Tıp Kitapevi, p. 212-233. ISBN: 9786053351429 (İngilizce-Türkçe Tıbbi Çeviri)
- **Kervancıoğlu E.**: Chapter 20: The Endocrine System, Junqueira's Basic Histology, Solakoğlu S., Editor. 2015 (13th Edition) Nobel Tıp Kitapevi, p. 404-428. ISBN: 9786053351429 (İngilizce-Türkçe Tıbbi Çeviri)
- Kervancıoğlu M.E. ve **Kervancıoğlu E.**: Chapter 11: Analysis of Fertilisation, In Vitro Fertilisation: A Practical Approach, Gardner D, Editor. 2008, Informa Healthcare. p. 183 - 198. ISBN: 978-9944-181-04-0 (İngilizce-Türkçe Tıbbi Çeviri)
- **Kervancıoğlu E.** ve Solakoglu S.: Chapter 22: Special Subjects, The Merck Manual, Solakoglu Z, Editor. 2008 (18th edition), Yüce Yayın, p. 2698 – 2772. ISBN: 9754113167 (İngilizce-Türkçe Tıbbi Çeviri)

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Kervancıoğlu Mehmet Ertan, Bekiroğlu Gülnaz Nural, Çetinel Şule.(2017) The Effect Of Prolonged Incubation And Temperature On Oocyte Activator Phospholipase C-Zeta Activity Of Sperm. Marmara Medical Journal; (Dergiye Kabul Edildi, Yayın Aşamasında)
- Kervancıoğlu G., Çetinel Ş., **Kervancıoğlu Demirci E.**, Ekter Kanten G., Kervancıoğlu M.E.(2015), Prepubertal Testis Hücre Süspansiyonunun Dondurulmasında Seeding Etkisi, Marmara Medical Journal; 28: 13-20, Doi: 10.5472/MMJ.2015.03894.2

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan sözlü bildiriler

- Şekerci Çağrı Akin, Tanidir Yilören, Şener Tarik Emre, Çevik Özge, Yarat Aysen, Tüzüner B, Çetinel Şule, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Şahan A,Akbal Cem (2016). Sıçan Testisinde Deneysel Olarak Oluşturulmuş İskemi Reperfüzyon Hasarında Trombositten Zengin Plazmanın Koruyucu Etkisi. 3. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi
- Koçak Emre, Sancar Murat, Tarhan Giray, Karaaslan Seda, Budancamanak Zeynep, Bahadır Emre, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Yüksel Meral, Ercan Feriha (2016). Sıçanda Yamğa Bağlı Uzak Doku Hasarında Minosiklin In Anti İnflamatuvar Ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi 16. Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi
- Koyuncuoğlu Türkan, Uren Dogan, Yildirim Cagan, Atal Sefa Semih, Vizdiklar Caner, Yılmaz Hakan,Akakin Dilek, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Yüksel Meral, Yegen Berrak (2015). Ptz İle Epilepsi Oluşturulmuş Sıçanlarda Obestatinin Antiepileptik Ve Antioksidan Etkileri İle Bellek Performansındaki Etkileri. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi 15. Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi
- Binnetoglu Adem, Demir Berat, Akakin Dilek, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Bağlam Tekin, Sari Murat, Batman Çağlar (2015). Periferik Fasiyal Sinir Yaralanmasında Bakteriyel Sellüloz Kullanımı Deneysel Sıçan Fasiyal Sinir Onarım Modeli. 37. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz Ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan poster bildiriler

- Sancar Murat, Tarhan Giray, Koçak Emre, Budancamanak Zeynep, Karaaslan Seda, Bahadır Emre, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Yüksel Meral, Ercan Feriha, Alican Yaşar İnci (2016). Effect Of Tetracycline Antibiotic Minocycline On Oxidant Antioxidant Parameters On Burn Induced Remote Organ Damage In The Rat. Turkish Society Of Physiological Sciences 42nd Physiology Congress *Acta Physiologica*, 218(709), 37-38. WOS:000383578300098 (*Impact factor: 4.8*)
- Recebova Kafiye, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Ercan Feriha, Şener Göksel (2015). Safra Kanalı Bağlama Yöntemi İle Karaciğer Fibrozisi Oluşturulmuş Sıçanlarda Myrtus Communis Ekstresinin Olası Koruyucu Etkileri Morfolojik Ve Biyokimyasal Değerlendirme. 22. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi
- Ak Esin, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Ustundag Unsal Veli, Alturfan Ebru Işık, Ak Koray, Çetinel Şule (2015). Deneysel Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyonuna Bağlı Gelişen Akciğer Hasarında Milrinon Un Etkinliğinin Araştırılması. 22. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi
- Koyuncuoğlu Türkan, Üren Doğan, Yildirim Cagan, Atal Sefa Semih, Vizdiklar Caner, Yılmaz Hakan, **Kervancıoğlu Demirci Elif**, Akakin Dilek, Yüksel Meral, Yegen Berrak (2015). Sıçanlarda Pentilentetrazol

Ile İndüklenen Epileptik Nöbetin Oluşturduğu Oksidatif Beyin Hasarında Obestatinin Koruyucu Etkileri.
Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi
Acta Physiologica, 215, 32-109., Doi: 10.1111/Apha.12591
(Impact factor: 4.8)

Diğer Sözlü Sunumlar

- “Fractalkine and Human Reproduction”, **Elif Kervancıoğlu Demirci**, Graz Tıp Fakültesi, Hücre Biyolojisi, Histoloji ve Embriyoloji Enstitüsü – Graz Avusturya. 09.12.2014
- “Kanser Hastalarında Fertilitenin Korunması”, **Elif Kervancıoğlu**, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İkinci Ulusal Öğrenci Kongresi - İstanbul 08 – 10.06.2007

Hakemlik Görevleri

Yıl	Dergi Adı
2016	Cell Adhesion&Migration (impact factor: 4) SCIE
2015	Cell Adhesion&Migration (impact factor: 4) SCIE
2015	Cell Adhesion&Migration (impact factor: 4) SCIE

Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

- Türk Elektron Mikroskopi Derneği
- Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği

Ödüller

- The Protective Effects Of Obestatin On Oxidative Brain Damage Of Rats With Pentylentetrazol PTZ Induced Epileptic Seizures, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Hizmetleri Geliştirme Ve Yardım Derneği “*Bilimsel Araştırma Üçüncülük Ödülü*”, 2017
- The Role Of CX3CL1 In Fetal-Maternal Interaction During Human Gestation, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Hizmetleri Geliştirme Ve Yardım Derneği Bilimsel Araştırma “*Mansiyon Birincilik Ödülü*”, 2016
- Kongre “*En İyi Sözlü Sunum İkincilik Ödülü*”, Joint Meeting Of The Feps And The Baltic Physiological Societies, Litvanya, 2015
- Masco “*Kongre En İyi Sözlü Sunum Üçüncülük Ödülü*”, Marmara Üniversitesi, 2015
- Dr. Nejat F. Eczacıbaşı 2015 *Tıp Öğrenci Ödülü*, Dr. Nejat F. Eczacıbaşı 2015 Tıp Öğrenci Ödülü, 2015
- Başakşehir Kaymakamlığı *Başarı Belgesi*, İçişleri Bakanlığı, 2012

Projeler

- Sperm Hazırlama Yöntemlerinin Etkinliğinin Fosfolipaz C Zeta, Anilin Mavisi Ve Ultrastrüktürel Olarak Karşılaştırmalı İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 25/04/2016 (Devam Ediyor)
- Prepubertal Testis Dokusunun Yavaş Veya Vitrifikasyon İle Dondurulup Çözülmesini Takiben Puberte Sonrası Transferi İle Verimliliğinin İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 01/09/2014 (Devam Ediyor)

Sertifika ve Kurslar

- Turnitin İntihal Önleme Programı Eğitimi, Marmara Üniversitesi, Kurs, 08.12.2015 -08.12.2015
- Laboistatistik: Temel Laboratuvar Bilimleri İçin Biyoistatistik Kursu, Laboistatistik: Temel Laboratuvar Bilimleri İçin Biyoistatistik Kursu, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Kurs, 23.05.2015 -24.05.2015
- EndNote Kaynakça Programı Eğitimi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Kurs, 29.01.2015
- Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitim Etkinliği: THED-İstanbul Medipol-2014, Tübitak ARDEB Proje Hazırlama Eğitimi, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kurs, 19.12.2014 - 21.12.2014
- Araştırmacılar İçin Deney Hayvanları Kullanımına Ait Eğitim, Deney Hayvanları İle Çalışma Sertifika Eğitimi, Marmara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, Sertifika, 23.12.2013 -06.01.2014
- ÇSGB İşyeri Hekimliği Belgesi, İstanbul, Sertifika, 07.06.2012 -07.06.2012
- Sağlık Bakanlığı Aile Hekimliği 1. Aşama Uyum Eğitimi Sertifikası, İstanbul, Sertifika, 30.06.2011 - 06.07.2011

Kongre ve Çalıştay Katılımları

- 15th International congress of Histochemistry and Cytochemistry „From Molecules to Diseases“ ICHC 2016; Antalya; 18.05.2016-21.05.2016
- 16. Ulusal Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenci Kongresi ; İstanbul; 26.05.2016 – 28.05.2016
- Newton-Katip Çelebi Fon Programı Bilgilendirme Toplantısı; 11 . 05. 2016
- XIII.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi; Çeşme – İzmir; 30.04.2016 - 03.05.2016
- 22. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi EMK 2015, Sabancı Üniversitesi – İstanbul; 02.09.2015- 04.09.2015
- 21. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Elektron Mikroskopi Kongresi, Mersin; 28.05.2013-31.05.2013
- 18.04.2009-20.04.2009, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilim Kulübü III. Ulusal Öğrenci Kongresi, Manisa; "Tandıran Tedaviye Acil Yaklaşımlar"



Manuscript Information

Title: THE EFFECT OF PROLONGED INCUBATION AND TEMPERATURE ON OOCYTE ACTIVATOR PHOSPHOLIPASE C ZETA ACTIVITY OF SPERM

Authors: Elif Kervancıoğlu Demirci¹, Mehmet Ertan Kervancıoğlu², Gülnaz Nural Bekiroğlu³, Şule Çetinet¹

¹Marmara University, School of Medicine, Histology and Embryology, İstanbul, Turkey

Institutions: ²İstanbul University, Cerrahpaşa School of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, IVF Center, İstanbul, Turkey

³Marmara University, School of Medicine, Department of Biostatistics, İstanbul, Turkey

Keywords: Temperature, Phospholipase C zeta, fertilization capacity, sperm, oocyte activator, prolonged incubation

Manuscript Type: Original Research

Processing Status: Accepted

THE EFFECT OF PROLONGED INCUBATION AND TEMPERATURE ON OOCYTE ACTIVATOR PHOSPHOLIPASE C-ZETA ACTIVITY OF SPERM

Abstract

Objective: Fertilization capacity of capacitated sperm decreases exponentially over time, but the reason is still under investigation. The aim of the study is to analyze the effect of prolonged incubation and temperature on sperm fertilization capacity with motility and staining parameters of phospholipase C zeta (PLCZ), which is considered to be the oocyte activation factor.

Materials and Methods: Density gradient washing was applied to semen of 11 infertile patients without severe oligoasthenospermia out of 16 patients. The samples were divided and cultured either at room temperature or at 37°C for 3 days. The spermatozoons were evaluated for motility, PLCZ staining and intensity daily.

Results: All parameters decreased both at room and body temperature with increased incubation time. There was a strong correlation between the change in motility and in the percentage of PLCZ stained sperms, but this correlation decreased with incubation time.

Conclusion: Prolonged incubation results show the correlation between PLCZ staining parameters and motility. Routine use of PLCZ-staining together with semen analysis, will be useful to predict fertilization capacity of sperm especially for unexplained infertility and fertilization failure cases, and also can increase the success of assisted reproductive technologies (ART) cycles.

Keywords: Temperature, Phospholipase C zeta, fertilization capacity, sperm, oocyte activator, prolonged incubation

UZUN SÜRELİ İNKÜBASYONUN VE SICAKLIĞIN OOSİT AKTİVATÖRÜ FOSFOLİPAZ C ZETA AKTİVİTESİNE ETKİSİ

Özet

Amaç: Kapasite olmuş spermin fertilizasyon kapasitesinin zamanla üstsel olarak düştüğü bilinmesine rağmen bunun nedeni hala araştırılmaktadır. Çalışmada amaç; uzamış inkübasyonun ve sıcaklığın sperm fertilizasyon kapasitesi üzerinde etkisini hareketlilik ve oosit aktivasyon faktörü olarak kabul edilen fosfolipaz C zeta (PLCZ) ile değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: 16 infertil erkek hastadan, ciddi oligoasthenospermisi olmayan 11'inin semenlerine dansite gradyan yıkaması uygulandı. Ardından örnekler bölünerek 3 gün oda sıcaklığında veya 37°C'de kültüre edildi. Örnekler hareketlilik, PLCZ boyanma yüzdesi ve yoğunluğu açısından günlük olarak değerlendirildi.

Bulgular: Hem oda sıcaklığı hem de vücut sıcaklığında her üç parametrede de zamanla azalma gözlemlendi. Özellikle günler arası hareketlilikteki değişim ile PLCZ boyanan sperm yüzdesindeki değişim arasında güçlü bir korelasyon bulundu, ancak bu korelasyon zamanla azalmakta idi.

Sonuç: İnkübasyon süresinin uzamasıyla, PLCZ boyanma parametreleri ve hareketlilik arasında korelasyon görülmektedir. PLCZ boyanmasının semen analizi ile rutinde kullanımı, özellikle açıklanamayan infertilite ve fertilizasyon başarısızlığı vakalarının spermelinin fertilizasyon kapasitesinin belirlenmesinde yarar sağlayabilecek ve yardımcı üreme teknikleri (YÜT) sikluslarındaki başarıyı artırabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Sıcaklık, Fosfolipaz C Zeta, fertilizasyon kapasitesi, sperm, oosit aktivasyonu, uzun süreli inkübasyon