

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SWİM-UP TEKNİĞİ İLE HAZIRLANACAK SEMEN
ÖRNEKLERİNDE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

SAİME ŞİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Selçuk DUMAN

KONYA 2019

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SWİM-UP TEKNİĞİ İLE HAZIRLANACAK SEMEN
ÖRNEKLERİNDE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

SAİME ŞİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Selçuk DUMAN

KONYA 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Saime ŞIK**' ın “**Swim Up Tekniği ile Hazırlanacak Semen Örneklerinde Trombositten Zengin Plazma Etkisinin Değerlendirilmesi**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, Türkiye/ 18/06/2019

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

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



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



Yukarıdaki tez Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03.07.2019 tarih ve 13./23. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Enstitü Müdürü

İmzası



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**Evaluation of The Effect of Platelet Rich Plasma on The Samples To Be Prepared By Swim-Up Technique**” by “*Saime ŞIK*” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “**Histology and Embryology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan
Konya, Turkey / 18/06/2019

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

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

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

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

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

Date and Signature



BEYANAT

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

17.06.2019

SAİME ŞİK



[Skip to Main Content](#)[Assignments](#)[Students](#)[Grade Book](#)[Libraries](#)[Calendar](#)[Discussion](#)[Preferences](#)[About this page](#)

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

SWİM-UP TEKNİĞİ İLE HAZIRLANACAK SEMEN ÖRNEKLERİND...

Inbox | Now Viewing: new papers ▼

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

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

<input type="checkbox"/>	Author	Title	Similarity	web	publication	student papers	Grade	response	File	Paper ID	Date
<input type="checkbox"/>	Saime Şik	SWİM-UP TEKNİĞİ İLE HAZIRLANACAK SEMEN Ö...	6% 6%	3%	2%	5%	--	--	download paper	1149165113	04-Jul-2019

Prof. Dr. Selçuk DUMAN

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Approval</i>	<i>iii</i>
<i>Beyanat</i>	<i>iv</i>
<i>Orijinallik Raporu</i>	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	<i>viii</i>
<i>Resimler Listesi</i>	<i>x</i>
<i>Tablolar Listesi</i>	<i>xi</i>
<i>Grafikler Listesi</i>	<i>xii</i>
<i>Özet</i>	<i>xiii</i>
<i>Abstract</i>	<i>xiv</i>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
<i>2.1. Trombositten Zengin Plazma (TZP)</i>	<i>3</i>
<i>2.1.1. Trombositten Zengin Plazmadaki Büyüme Faktörleri</i>	<i>4</i>
<i>2.1.1.1. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)</i>	<i>4</i>
<i>2.1.1.2. Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (TGF- β)</i>	<i>5</i>
<i>2.1.1.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)</i>	<i>5</i>
<i>2.1.1.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)</i>	<i>6</i>
<i>2.1.1.5. Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (B-FGF)</i>	<i>7</i>
<i>2.1.1.6. Bağ Doku Büyüme Faktörü (CTGF)</i>	<i>7</i>
<i>2.1.1.7. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)</i>	<i>7</i>
<i>2.1.1.8. Platelet Faktörü-4 (PF-4)</i>	<i>8</i>
<i>2.1.2. Trombositten Zengin Plazma 'nın Hazırlanması</i>	<i>9</i>
<i>2.1.3. Trombositten Zengin Plazma Aktivasyonu</i>	<i>11</i>
<i>2.1.4. Trombositten Zengin Plazma 'nın Avantaj ve Dezavantajları</i>	<i>11</i>
<i>2.2. Erkek üreme sistemi</i>	<i>12</i>
<i>2.2.1. Testisin Yapısı</i>	<i>13</i>
<i>2.2.1.1. Sertoli Hücreleri</i>	<i>13</i>
<i>2.2.1.2. Spermatojenik Hücreler</i>	<i>14</i>
<i>2.2.1.3. Leydig Hücreleri</i>	<i>15</i>

2.3. . Spermatogenez Ve Olgun (Matür) Spermin Yapısı	16
2.3.1. Olgun (Matür) Spermin Yapısı	17
2.4. Semen Analizi	19
2.4.1. Makroskobik Analiz	20
2.4.1.1. Renk ve Koku	20
2.4.1.2. Likefaksiyon	20
2.4.1.3. Viskozite	21
2.4.1.4. Semen Hacmi	21
2.4.1.5. Semen pH'sı	21
2.4.2. Mikroskobik Analiz	22
2.4.2.1. Sperm Konsantrasyonu ve Total Sperm Sayısı	22
2.4.2.2. Sperm Motilitesi	24
2.4.2.3. Sperm Morfolojisi	25
2.4.2.4. Sperm Canlılığı (Viabilite)	26
2.5. Sperm Hazırlama Yöntemleri	26
2.5.1. Basit Yıkama (Simple Washing)	27
2.5.2. Dansite Gradient Santrifügasyon	27
2.5.3. Sperm Yüzdürme (Swim-up)	27
2.5.4. Sperm Yüzdürme (Swim-Down)	28
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1. Semen Örneklerinin Toplanması	30
3.2. Kan Örneklerinin Toplanması	30
3.3. Trombositten Zengin Plazmanın hazırlanması	30
3.4. Semen Örneklerinin Swim-Up Tekniği İle Yüzdürülmesi	39
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
7. KAYNAKLAR	55
8. ÖZGEÇMİŞ	59
9. EKLER	60

KISALTMALAR VE SİMGELER

°C: Santigrat derece

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µm³: Mikrometre küp

a ER: Agranüler endoplazmik retikulum

ACD-A: Asit sitrat dekstroz-A

A-TZP: Aktive trombosit zengin plazma

B-FGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

CaCl₂: Kalsiyum klorür

CO₂: Karbondioksit

CTGF: Bağ doku büyüme faktörü

dk: Dakika

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DSÖ: Dünya sağlık örgütü

EGF: Epidermal büyüme faktörü

gER: Granüler endoplazmik retikulum

H₂O₂: Hidrojen peroksit

ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

IUI: İntrauterin inseminasyon

IVF: İn vitro fertilizasyon

k DA: Kilo dalton

m RNA: Mesajcı ribonükleik asit

ml: Mililitre

mm: Milimetre

ng: Nanogram

nm: Nanometre

PAS: Periyodik asit- schiff

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PDGF: Platelet kaynaklı büyüme faktörü

PF-4: Platelet faktörü-4

SGF: Sarkoma büyüme faktörü (Sarcoma growth factor)

sn: Saniye

TGF- β 1: Transforme edici büyüme faktörü- β 1

TZP: Trombositten zengin plazma

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

YÜT: Yardımcı üreme teknikleri



RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Bir trombositin yapısı	3
Resim 2: İlk santrifüj sonrası elde edilen Trombositten Zengin Plazma	10
Resim 3: Erkek üreme sisteminin genel görünümü	12
Resim 4: Spermatogonyumların şematik görünümü	15
Resim 5: Olgun sperm yapısı	18
Resim 6: Akrozom reaksiyonu.....	18
Resim 7: Makler sayım kamarası	23
Resim 8: Sperm analizinin yapıldığı ışık mikroskobu	24
Resim 9: Spermilerin Maklerdeki görüntüsü	25
Resim 10: Normal ve anormal morfolojiye sahip sperm görüntüsü	26
Resim 11: Sperm hazırlama teknikleri	29
Resim 12: Antikoagülanlı tam kan.....	31
Resim 13: Kanın konik tüpe aktarılması.....	32
Resim 14: Santrifüj işlemi.....	32
Resim 15: Santrifüj sonrası oluşan plazma.....	33
Resim 16: Plazmanın dikkatli bir şekilde alınması.....	34
Resim 17: Aktivasyon için Trombositten Zengin Plazma'ya %10'luk $CaCl_2$ eklenmesi	35
Resim 18: $CaCl_2$ eklenen plazmanın hafifçe çalkalanması.....	36
Resim 19: Aktive TZP'nin jel formu.....	36
Resim 20: Trombositlerin aktive edilmesi sonrası trombosit membranlarının altta pellet oluşturması ve üstte oluşan büyüme faktörü bulunduran plazma.....	37
Resim 21: Pelleti yerinden oynatmadan A-TZP'nin alınması	38
Resim 22: A-TZP'nin 1,5 ml'lik eppendorf tüplere dondurulmak üzere aktarılmış hali.....	39
Resim 23: Trombositten zengin plazmanın üstte katman oluşturmak amaçlı 45° lik açı ile tüpün kenarından sızdırılması	40
Resim 24: Sızdırma işlemi sonrası kendiliğinden alta inen trombositten zengin plazma katmanı	41
Resim 25: Pubmed üzerinden yapılan "Trombositten Zengin Plazma ve Sperm" başlıklı kaynak taraması	53

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: TZP kaynaklı bazı büyüme faktörlerinin fonksiyonları ve salgılandıkları yerler.....	8
Tablo 2: Spermiyogramdaki sperm değişkenleri terminolojisi	22
Tablo 3: Semen in Ham ve TZP ile muamele edilen halinin konsantrasyonlarının birbiriyle karşılaştırılması.....	42
Tablo 4: Ham ve TZP grubunun +4 motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması.....	43
Tablo 5: Ham ve TZP grubunun +3 motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması.....	44
Tablo 6: Ham ve TZP grubunun +2 motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması.....	45
Tablo 7: Ham ve TZP grubunun +1 motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması.....	46
Tablo 8: Ham ve TZP grubunun +3 ve +4 toplam motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması.....	47

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1: Konsantrasyonun semenin Ham ve TZP ile muamele edilen halinde zamana bağlı değişimi.....	42
Grafik 2: +4 motilite değerinin semenin Ham ve TZP ile muamele halinde zamana bağlı değişimi.....	43
Grafik 3: +3 motilite değerinin Ham ve TZP grubu olarak zamana bağlı değişimi.....	44
Grafik 4: +2 motilite değerinin Ham ve TZP grubu olarak zamana bağlı değişimi.....	45
Grafik 5: +1 motilite değerinin Ham ve TZP grubu olarak zamana bağlı değişimi.....	46
Grafik 6: +3 ve +4 toplam motilite değerinin Ham ve TZP grubu olarak zamana bağlı değişimi.....	47

ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SWİM-UP TEKNİĞİ İLE HAZIRLANACAK SEMEN ÖRNEKLERİNDE TROMBOSİTTEN
ZENGİN PLAZMA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Saime ŞIK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ- KONYA 2019

Sperm motilitesi, erkek infertilitesinde değerlendirilen ilk parametrelerden biri olduğundan in vitro fertilizasyon tedavilerinde motil sperm elde etmek önem arz etmektedir. Bu nedenle farklı yüzdürme metotları birçok çalışmanın konusu olmuş, en ideal yöntemin swim-up olduğu düşünülmüştür. Trombositten Zengin Plazma (TZP), içerdiği büyüme faktörleri nedeniyle ortopedi, plastik cerrahi, kadın doğum gibi farklı alanlarda kullanım bulmuş, fakat üreme ve sperm motilitesi üzerine bugüne kadar yapılmış yalnızca bir çalışma bulunmaktadır.

Çalışmamıza semen için 29, kan için 10 gönüllü katılmıştır. Alınan intravenöz kanlardan TZP elde edilmiş, deney protokolünde kullanmak için dondurularak saklanmıştır. 29 gönüllünün rutin semen analizleri yapıldıktan sonra her örnek iki eşit hacimde ayrılmıştır. Eşit hacimde ayrılan bu örnekler raw (ham) hali ve TZP ile muamele edilecek grup olarak iki ayrı şekilde sınıflandırılmıştır. TZP ile muamele edilen semen örneklerinin ve ham grubunun her 15-30 ve 45 dakikada konsantrasyon ve motilite analizleri yapılmıştır.

Bulgularımızda elde edilen +4 ve +3 sperm konsantrasyonu ham grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < .0001$). Bu anlamlılığın özellikle ilk 15 dk için kritik olduğu görülmüştür.

Sonuçlarımıza göre, TZP'nin sperm motilitesi üzerine anlamlı oranda etkisi bulunmaktadır. TZP, sperm motilitesi düşük IUI ve ICSI için sperm hazırlamada alternatif bir yıkama materyali olabilir.

Anahtar Kelimeler: Sperm; Swim-up; Trombositten Zengin Plazma (TZP)

ABSTRACT

REPUBLIC of TURKEY

NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

THE EVALUATION OF THE EFFECT OF PLATELET RICH PLASMA ON THE SAMPLES TO
BE PREPARED BY SWIM-UP TECHNIQUE

Saime ŞIK

DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY

MASTER THESIS- KONYA 2019

Because sperm motility is the first parameter evaluated in male infertility, obtaining motile sperm for the in vitro fertilization treatment is considered important. Therefore, different methods of collection have been the subject of many studies and it has been thought that the most ideal method is swim-up. Platelet Rich Plasma has been used in different fields such as orthopaedics, plastic surgery, and gynaecology due to the growth factors it contains, but there is only one study till now on reproductive and sperm motility.

For semen 29 volunteers and for blood 10 volunteers participated in our study. Platelet Rich Plasma (PRP) was obtained from the intravenous blood taken and it was frozen for use in the experimental protocol. After routine semen analyses of 29 volunteers were performed, every sample was divided into two equal volumes. These equally divided samples are classified as different groups. One of them is raw form and the other one is the group which will be treated with PRP. Concentration and motility analysis of PRP-treated semen samples and the raw group were performed at each 15th-30th and 45th minutes.

Our results showed that the +4 and +3 sperm concentration were significantly higher than the raw group ($p < .0001$). This significance was found to be critical especially for the first 15 minutes.

According to our results, PRP has a significant effect on sperm motility. PRP may be an alternative washing material for sperm preparation to be used in IUI and ICSI which need low sperm motility.

Keywords: Platelet Rich Plasma (PRP); Sperm; Swim-up

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite bireyi ve birçok zaman aileleri de doğrudan etkileyen sosyolojik yönleri de olan bir sağlık problemidir. Günümüzde infertil çiftlerin yaklaşık %40'ında sorunun erkek faktörlü infertilite olduğu görülmüştür. Erkek faktörlü infertilitede sperm parametreleri önem arz eder ve en önemli parametrelerden biri de motilitedir. İn vitro fertilizasyon (IVF) tedavilerinde motil spermlere ulaşmak için farklı sperm hazırlama metodları halen kullanılmaktadır. Bu metodlar arasında en ideal yöntemlerden biri ise swim-up tekniği olmuştur. Swim-up tekniği, motil spermlerin tüpün üst kısmında oluşturulan medium katmanına yüzmesine dayanmaktadır. Böylece immotil spermlerden ayrılmış motil spermler elde edilmiş olur (Delilbaşı 2008).

Trombositten Zengin Plazma (TZP), tam kanın santrifüj edilmesi ile normale oranla daha konsantre trombosit elde edilmesini sağlamaktadır. TZP hazırlama teknikleri de kendi arasında farklı bölümlere ayrılabilir. TZP hazırlama ve hazırladıktan sonra trombositlerin aktive edilmesi ise trombositlerden salınan büyüme faktörlerinin daha fazla oranda açığa çıkmasını sağlamaktadır. TZP, birçok büyüme faktörünü konsantre halde içinde bulundurur ve bu büyüme faktörleri nedeni ile ortopedi, plastik cerrahi, diş ve kadın doğum gibi farklı alanlarda kullanım bulmuştur. Günümüzde tıbbın birçok alanında kullanım bulan ve yenilikçi bir tedavi aracı olan TZP, bugüne kadar farklı çalışmalarda kullanım bulmuş olsa da sperm parametrelerine etkisinin incelendiği yalnızca bir kaynak bulunmaktadır (Marx 2001).

Bizim bu çalışmadaki amacımız, TZP'nin erkek infertilitesinde sperm parametrelerine etkisini araştırmak ve yardımcı üreme tedavilerinde bir avantaj sağlayıp sağlayamayacağını değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

Trombositler, diğer adıyla kan pulcukları (plateletler) kemik iliğinin en büyük hücreleri olan megakaryositlerden meydana gelmiş olup, 2-5 µm çapında ve 5 µm³ hacindedirler. Trombositler pek çok kaynakta “kemik iliğinin devleri, periferik kanın cüceleri” şeklinde de tanımlanmıştır. Trombositler, ultrastrüktürel bakımdan 4 morfolojik yapıya ayrılırlar (Resim 1); Periferal zon, yapısal zon, organel zonu ve membran zonu (Davi ve Patrono 2007).

Periferal Zon: Bu yapı glikokaliks örtüsüyle kaplı hücre membranından oluşmakta olup, glikokaliks, glikoprotein, glizkozaminoglukan ve plazmadan adsorbe edilmiş birkaç pıhtılaşma faktörünü ihtiva eder. İntegral membran glikoproteinleri ise trombosit fonksiyonunda reseptörler olarak işlev görürler (Rendu ve Bohn 2001).

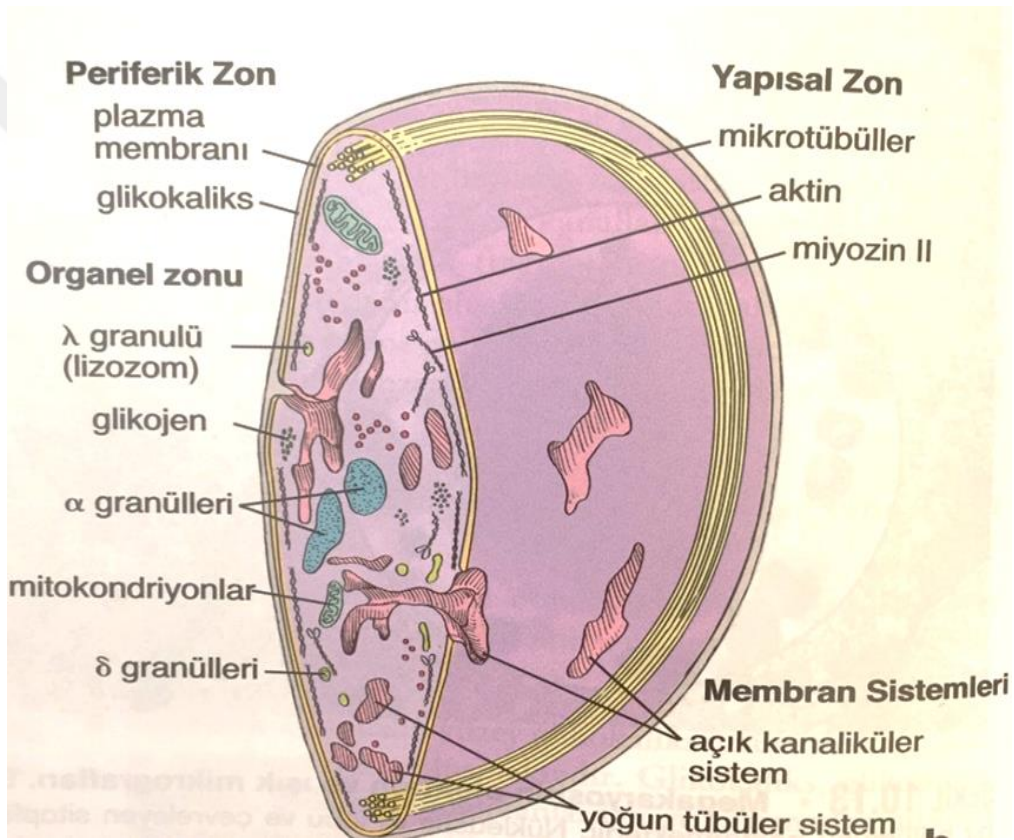
Yapısal Zon: Trombosit plazma membranını destekleyen bir ağ oluşturan mikrotübüller, aktin filamentleri, miyozin ve aktin-bağlayan proteinler bu yapıda bulunurlar. Aktin filament ağının hemen altında demet halinde 8-24 mikrotübül bulunduğu bilinmektedir. Bunların dairesel olarak yerleşmiş olup ve trombositin disk şeklinin sürdürülmesinden sorumlu olduğunu bilmekteyiz.

Organel Zonu: Trombositin merkezini kaplar ve mitokondriyonlardan, peroksizomlardan, glikojen partiküllerinden ve sitoplâzmaya dağılmış en az üç tip granülden oluşur. Bu granüller α, δ ve λ granül olarak isimlendirilmiştir (Rendu ve Bohn 2001; Pietrzak ve Eppley 2005).

Alfa Granüller: Yaklaşık 300 nm çapa sahip olup her trombositte yaklaşık 50 adet alfa granül bulunur ve sayıca diğer granüllere göre baskındırlar. Alfa granüller çok sayıda protein ve büyüme faktörü içerirler. İçerdikleri bu büyüme faktörleri nedeniyle de pek çok çalışmada trombositlerin çalışılmasının temelini oluşturmuşlardır. Bu granüllerin yapılarında platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), temel fibroblast büyüme faktörü (B-FGF), bağ doku büyüme faktörü (CTGF), platelet faktör-4 (PF-4) gibi büyüme faktörleri yer almaktadır (Machin ve ark. 1983; Barrientos ve ark. 2008).

δ Granüller: Elektron mikroskopta ışınları yoğun olarak absorbe etmeleri nedeniyle “yoğun cisimler” şeklinde isimlendirilmişlerdir. Ortalama olarak 250-300 nm çapa sahip oldukları ve yapılarında esas olarak hasarlı damar bölgesinde platelet adezyonunu ve vazokonstriksiyonu kolaylaştıran ADP, ATP, serotonin ve histamin içerdikleri bilinmektedir (Kark ve ark. 2006).

λ Granüller: Çapları 175-250 nm arasında değişen bu granüllerin lizozomal enzimleri içerdikleri bilinmektedir. λ granüllerinin içeriği damar onarımının geç evrelerinde pıhtı geri emiliminde fonksiyon görür ve ayrıca bakterisidal aktiviteye yönelik katyonik proteinleri de mevcuttur (Arora ve ark. 2009).



Resim 1: Bir trombositin yapısı (Ross ve Pawlina 2016).

2.1. TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (TZP)

Basitçe tanımlayacak olunursa, tam kanın belli bir devirde santrifüj edilmesinden sonra normale göre daha konsantre trombosit elde edilen plazmaya Trombositten Zengin Plazma (TZP) denmektedir. TZP, tedavi uygulanacak kişinin kendi kanının santrifüj edilmesiyle elde edilir yani otolog bir üründür. Trombositten

Zengin Plazma'da otolog bir kanda olandan çok daha fazla trombosit ve büyüme faktörü bulunur. Sayısal tanımlayacak olursak, normalde kanda bulunan şekilli elemanların dağılımı: %93 eritrosit %6 trombosit %1 lökosit şeklinde iken bu oran TZP'de %94 trombosit, %6 lökosit ve eritrosit şekline dönüşür (Resim 2). Yani normal oranın tersine dönmesi şeklinde de ifade edebiliriz (Carlson ve Roach 2002). Bununla beraber, Trombositten Zengin Plazma'nın kullanım bulması için standartlaştırılmış bir trombosit konsantrasyonu yoktur, bu konsantrasyon hastadan hastaya da değişebilmektedir. Normal şartlarda sağlıklı bir kişide normal trombosit sayısı, mikrolitre kanda 150.000 ila 450.000 arasında bulunur. Bu sayı TZP tekniği ile plazmada normalin üzerine çıkarılmış olur (Resim 3). Elde edilen bu yüksek oranda trombosit TZP'nin içeriğinde hiperfizyolojik büyüme faktörü bulunduğunu gösterir ki TZP'nin kullanımı da bu büyüme faktörlerine dayanır. Standart tedavi yöntemlerinde inflamasyonu baskılamak esassen, TZP'nin kullanım bulduğu tedaviler vücudu uyarmayı, yara bölgesine yardımcı elemanları çağırılmayı hedef alır (Ferrari ve ark. 1987; Marx 2001; Dhillon ve ark. 2012; Yılmaz ve Kesikburun 2013; Alves ve Grimalt 2017).

2.1.1. Trombositten Zengin Plazmadaki Büyüme Faktörleri

2.1.1.1. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF, Platelet derived growth factor)'nın ilk olarak 1970'lerin başında trombosit ekstraktlarında izole edilip, fibroblast ve düz kas hücresi proliferasyonunu uyarabilen bir trombosit kökenli mitojen olduğu düşünülmüştür. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü daha önce de bahsettiğimiz gibi α granüllerde depo edilirler. Doku yaralanmasının ardından ilk ortaya çıkan büyüme faktörlerinden biri olduğu için de yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu gibi pek çok çalışmaya konu olmuştur. Fareler üzerinde yapılan son çalışmalar, PDGF'nin embriyonun erken gelişmesinde önemli rol oynayabildiği ve eksikliğinde ise; akciğer, damar, plasenta, beyin ve iskeletin kusurlu oluşumuna yol açtığını ortaya koymuştur (Ross ve ark. 1974; Nakamura ve ark. 1998; Floege ve ark. 2008).

Platelet kaynaklı büyüme faktörü esasen trombositlerden salınsa da son çalışmalara göre makrofajlar, endotel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositler tarafından da salgılanabildiği kaydedilmiştir. PDGF, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve

endotelial hücreler için kemoatraktan ve mitojen görevi görmektedir. Bunlara ek olarak, fibronektin ve hiyalüronik asit ve proteoglikan üretimi için bir uyarıcı olarak görev yapabilmektedir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin birbirleri ile iletişim halinde olduğu düşünülmektedir ki PDGF'in yara iyileşmesinin başlangıç aşamasında IGF-1'in sentezlenmesini indüklediği bilinmektedir. Özetle PDGF'in tedavi edici uygulamalarda başarılı olduğu ve bu uygulamalara yönelik araştırmaların halen devam ettiği bilinmektedir (Pierce ve ark. 1989; Mustoe ve ark. 1991; Hsu ve ark. 2004).

2.1.1.2. Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (TGF- β)

Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β , Transforming growth factor-beta) sıçan fibroblastlarını transforme etme yetenekleri ile keşfedilmiştir. Önceleri Sarkoma büyüme faktörü (SGF, Sarcoma Growth Factor) şeklinde adlandırılırsa da daha sonra iki ayrı faktörden oluştuğu anlaşılmış ve TGF- α ve TGF- β olarak adlandırılmıştır. TGF- α epidermal büyüme faktörüdür ve çok çeşitli epitel tiplerinde büyümeyi desteklemektedir. TGF- β 'nın geniş yelpazede hücre tipi düzenleme etkisi bulunur. Hücre replikasyonunu ve farklılaşmasını, kemik oluşumunu, anjiyogenez, hematopoezi, hücre döngüsü ilerlemesini düzenlemekte olup doku gelişimi ve yara iyileşmesinde önemli yere sahiptir. TGF- β 'nın ana kaynağı trombositler ve kemik olsa da pek çok doku tarafından sentezlenebildiği bilinmektedir. TGF- β pleotropiktir ve bu yüzden hücre büyümesini stimüle ya da inhibe edebilmektedir. TGF- β 'nın hücre proliferasyonunu, hücrelerin farklılaşma durumunu konsantrasyona, kültüre edilme koşulları vb. faktörlere bağlı olarak artırıp azaltabildiği kaydedilmiştir. TGF- β yara iyileşmesinin geç evresinde etkili olmaktadır (Border ve Ruoslahti 1992; Shah ve ark. 1995; Klein ve ark. 2002; Amable ve ark. 2013).

2.1.1.3. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

1983 yılında damar geçirgenliğini artıran ve klinik olarak asit sıvısının birikimine yol açan tümör hücreleri tarafından salgılanan bir "vasküler geçirgenlik faktörü" şeklinde adlandırıldığı bilinmektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF, Vascular endothelial growth factor)'nün arterlerden, damarlardan ve lenfatiklerden türetilen vasküler endotelial hücrelerin büyümesini teşvik etme yeteneği in-vitro olarak çok iyi bir şekilde gözlemlenmiştir (Bacic ve ark. 1995; Colville-Nash ve Willoughby 1997).

VEGF, üç boyutlu in vitro modellerde anjiyogenezini teşvik etmekte olup, kılcal benzeri yapılar oluşturmada aktif rol oynamaktadır. VEGF, farklı in-vivo modellerde de anjiyogenik tepki gösterebilmiştir. VEGF tümör anjiogenezinde rol oynar ancak sadece tümör hücreleri tarafından üretilmemektedir. Örneğin diğer trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinden olan PDGF ve TGF- β gibi büyüme faktörleriyle ilişkili doku hipoksisine ve düşük glukoz seviyelerine yanıt olarak nötrofiller, trombositler, keratinositler, tenositler ve astrositler gibi hücrelerden de salınabilmektedir. VEGF'in yara iyileşmesinde, iyileşme sürecindeki dokuda anjiogenezini başlatma gibi önemli bir görevi bulunmaktadır. İnsanlarda, yara ve kırık iyileşmesi sırasında ilgili hücrelerden VEGF salınımı olur ve hasar almış bölgede, VEGF ve VEGF mRNA hızla artmaktadır. Yaralanan bölgede vasküler hasar kaynaklı oksijen miktarı azalır ancak meydana gelen hipoksi durumu sanılanın aksine olumsuz bir süreç olmayıp, VEGF mRNA'sını güçlü şekilde stimüle eder ve hasarlı dokunun yararına bir süreç başlamış olur (Zhang ve ark. 2003; Su ve ark. 2008).

2.1.1.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1, Insulin like growth factor-1) ve IGF-2, ilk kez 1957'de "Salmon ve Daughaday" tarafından sıçan kıkırdağına sülfasyonu uyarıcı bir faktör olarak keşfedildiğinden "sülfarasyon faktörü" olarak tanımlanmıştır. Froesch ve arkadaşlarının yaptıkları farklı çalışmalardan sonra ise "somatomedin" şeklinde tanımlanmıştır (Blum ve ark. 2011; Castillo ve ark. 2011).

1976'da Rinderknecht ve Humbel, aminoasit dizisinin insan proinsülini ile yapısal benzerlik gösterdiğini ileri sürdü ve bu protein, IGF-1 olarak yeniden adlandırılmış oldu. IGF-1, IGF ailesinin diğer üyesi olan IGF-II ile %50 homolog dizilime sahip olduğu kaydedilmiştir. IGF-1 salgılandıktan sonra dokular üzerinde lokal olarak etki gösterebildiği gibi, sistemik dolaşımda yer alıp endokrin etki de gösterebilir. Dolaşımda yer alan IGF-1 büyüme hormonu tarafından harekete geçirildiği karaciğer dokusunda yer alır. Bununla birlikte, lokal etki gösterdiğini bildiğimiz IGF-1 ise keratinosit, osteoblast ve fibroblast gibi değişik hücreler yolu ile üretilebilmektedir. IGF-1 fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, çizgili kas hücreleri, epitelyal hücreler, tiroid hücreleri ve nöronlar gibi birçok hücre üzerinde mitojenik etkiye sahiptir ve bu durum göz önüne alındığında geniş hücre tipi yelpazesi IGF-1'in yaygın fizyolojik ve patolojik etkilere sahip olmasını beraberinde

getirmektedir. Dolaşımında yer alan IGF-1 periferel hücrelerde glikoz içe alımını ve glikojen sentezini sağlayıp, nöronların canlılığını, miyelin sentezi ve kemik yenilenmesini de artırmaktadır. Önemli fonksiyonlarını sıralayacak olursak, IGF-1 embriyonik gelişim için gereklidir ve doğum sonrası büyümeyi düzenlemede rol oynar. Lokal olarak etki gösteren IGF-1 de yara iyileşmesinde önemli yere sahip olup, yokluğunda iyileşmenin geciktiği kaydedilmiştir (Blum ve ark. 2011; Castillo ve ark. 2011).

2.1.1.5. Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (B-FGF)

İlk olarak 1973 yılında keşfedilmiş olup Temel fibroblast büyüme faktörü (B-FGF, Basic fibroblast growth factor) olarak bilinmektedir. Sığır hipofizinden ekstrakte edilmiş ve fibroblastlar için mitojenik aktivitesi olduğu anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalara göre in-vivo ve in-vitro olarak anjiyogenez, yara iyileşmesi ve embriyonik gelişim gibi hücreler için mitojenik rol aldığı bilinmektedir. FGF, erken embriyoda mezoderm gibi hücreler için mitojeniktir ve yeni organ oluşumlarını kontrol ederek gelişimsel yolların düzenlenmesinde görev alır (Bikfalvi ve ark. 1997; Hughes ve ark. 2004).

2.1.1.6. Bağ Doku Büyüme Faktörü (CTGF)

Bağ doku büyüme faktörü (CTGF, Connective tissue growth factor)'nün deri, kıkırdak ve kemik dahil bağ doku yenilenmesini desteklemekte rol aldığı bilinmektedir. Doku hasarının erken evresinde rol oynar ve granülasyon dokusunun oluşumunu da indükler. Trombositlerden salınan CTGF'nin doku yenilenmesinde pozitif etkileri klinik olarak anlamlı bulunmuştur (Kubota ve ark. 2004).

2.1.1.7. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Epidermal büyüme faktörü (EGF, Epidermal growth factor), yaralı bölgeye uygulandığında epilizasyonu artıran bir büyüme faktörüdür. Başlangıçta sadece fibroblastların çoğalmasını tetiklediği düşünülmüş fakat yapılan deneysel çalışmalar sonucu kollejen oluşumunun gözlemlendiği kaydedilmiştir. Trombosit, makrofaj ve monositlerde bulunan EGF, yara iyileşmesinin erken döneminde etkin olur ve epitel hücre göçünü indükler (Brown ve ark. 1988; Yuan ve ark. 2008).

2.1.1.8. Platelet Faktörü-4 (PF-4)

Trombosit aktivasyonuna bağı olarak salınır. Fibroblastlar için kemoatraktan olduğu bilinmektedir. 7.8 kDa molekül ağırlığına sahip katyonik bir protein olan Platelet faktörü-4 (PF-4, Platelet factor-4) trombositlerin α granüllerinde depolanmaktadır (Gerotziapas ve ark. 2001).

Tablo 1: TZP kaynaklı bazı büyüme faktörlerinin fonksiyonları ve salgılandıkları yerler (Dhurat ve Sukesh 2014).

Büyüme Faktörü	Kaynak	Fonksiyon
Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (TGF- β)	Trombositler, ekstraselüler kemik matriksi, kıkırdak matriksi, natural killer hücreler	Farklılaşmamış mezenkimal kök hücre proliferasyonunu uyarır, endotel, fibroblastik ve osteoplastik mitogenezi düzenler, kollajen sentezi ve kollajenaz salgısını düzenler.
Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (B-FGF)	Trombositler, makrofajlar, mezenkimal hücreler, kondrositler ve osteoplastlar	Kondrositlerin ve osteoplastların büyüme ve farklılaşmasını destekler, mezenkimal hücreler, kondrositler ve osteoplastlar için mitojeniktir.
Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	Trombositler, makrofajlar, monositler, düz kas hücreleri, osteoplastlar ve endotelial hücreler	Fibroblast, glial ve düz kas hücrelerinde kemotaksi ve mitogenezi uyarır, kollajen sentezi ve kollajenaz sekresyonunu düzenler, mezenkimal hücreler ve osteoplastlar için mitojeniktir.

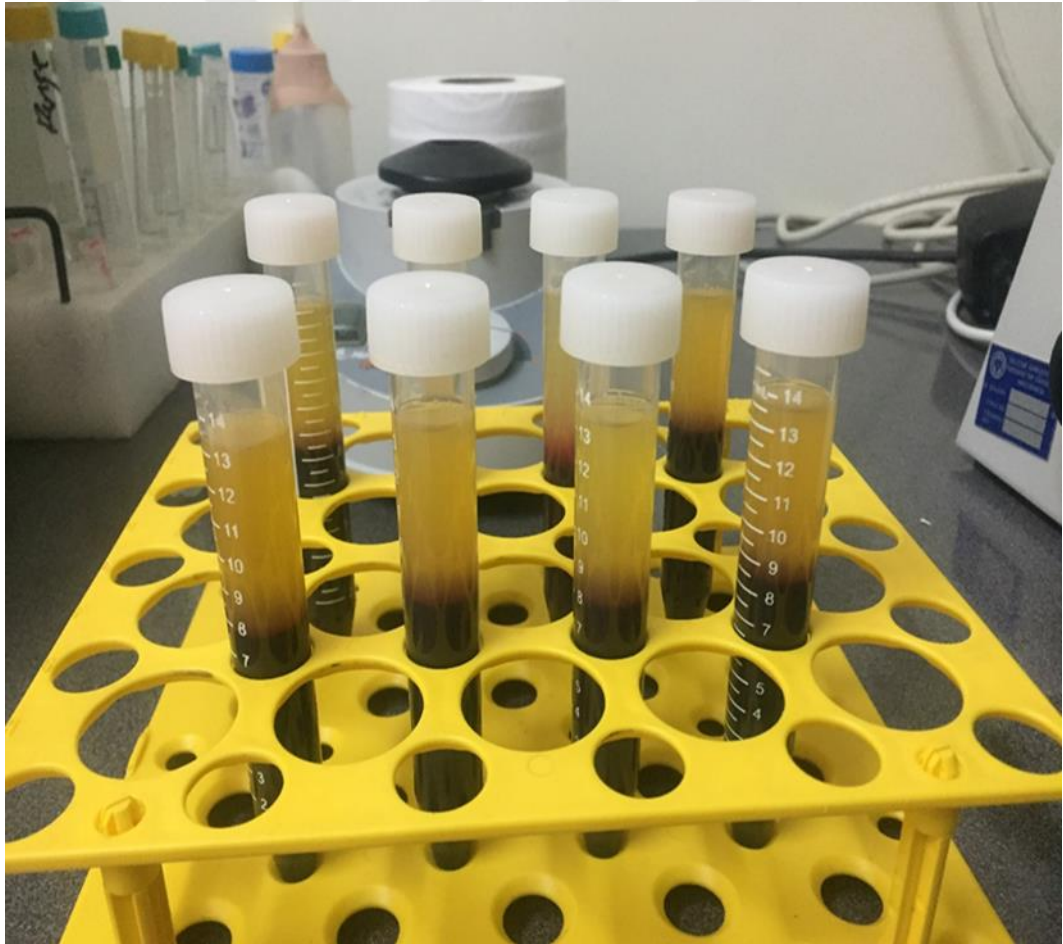
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Trombositler, makrofajlar, monositler	Endotelial kemotaksi ve anjiyogenezi uyarır, epitelyal ve mezenkimal mitogenezi uyarır, kollajen sekresyonunu düzenler.
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	Trombositler, endotelial hücreler	Anjiyogenezi ve damar geçirgenliğini artırır, endotel hücreleri için mitogenezi uyarır.
Bağ Doku Büyüme Faktörü (CTGF)	Kemik iliği hücre dışı ortamından endositoz yoluyla gelen trombositler	Anjiyogenez, kırıkta rejenerasyonu, trombosit adhezyonu.
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)	Plazma, epitelyal hücreler, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, fibroblastlar, osteoblastlar, kemik matriksi	Osteoblastların çoğalması ve farklılaşması ile kemik oluşumunu artırır.

2.1.2. Trombositten Zengin Plazma'nın Hazırlanması

Trombositten Zengin Plazma hazırlanırken temel amaç trombositleri, kanın diğer şekilli elemanlarından belirli bir dönme hızını kullanarak ayırmaktır. TZP hazırlanması için diferansiyel santrifüjleme yöntemi kullanılmaktadır. Literatürde TZP hazırlığı ile ilgili birçok yayın bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda farklı TZP hazırlama yöntemleri kullanılmış olup standart bir hazırlama metodu belirlenmemiştir. Kullanılacak amaca yönelik TZP'de trombosit konsantrasyonu 2 ile 8 katına kadar artırılabilir (Dhurat ve Sukesh 2014).

TZP hazırlanması için öncelikle tam kan, antikoagülanlı tüplere alınır. Trombositlerin stabilizasyonu için TZP hazırlığında antikoagülan olarak asit sitrat-dekstroz-A (ACD-A) veya sitrat-fosfat-dekstroz (CPD) kullanılmaktadır.

Kullanılacak amaca bağlı olarak TZP hazırlığı tek santrifüj veya çift santrifüj şeklinde yapılabilir. Antikoagülanlı tüplere alınan tam kan uygun devir ve dakikada döndürüldükten sonra üst kısımda trombositten zengin plazma oluşur. İlk santrifüj sonrası elde edilen TZP aktive edilerek ya da aktive edilmeden kullanılabilir (Dhurat ve ark. 2014; Zhou ve ark. 2015). Eğer trombosit konsantrasyonu artırılmak isteniyorsa ikinci bir santrifüj seçimi yapılabilir. İkinci santrifüj işlemi ise ilk santrifüj sonrası oluşan TZP'nin ayrı bir tüpe alınarak uygun devir ve dakikada santrifüj edilmesine dayanır. Bu santrifüj sonucu trombositler tüpün altında pellet oluşturur. İsteğe ve amaca bağlı olarak üstte bulunan trombositten zayıf plazma atılabilir veya istenen hacimde trombositten zayıf plazmanın bir kısmı pellet ile homojenize edilerek kullanılabilir (Aghajanova ve ark. 2018; Dhurat ve Suresh 2014; Zhou ve ark. 2015).



Resim 2: İlk santrifüj sonrası elde edilen Trombositten Zengin Plazma

2.1.3. Trombositten Zengin Plazma Aktivasyonu

TZP içinde bulunan trombositlerin aktivasyonu için kullanılan farklı yöntemler mevcuttur. Kullanılan bütün yöntemlerin temel amacı ise trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin konsantrasyonunu artırarak olabilecek en fazla yararı sağlayabilmektir. TZP aktivasyonu için bilinen yöntemler arasında CaCl₂, donma-çözme şoku, trombin ilavesi ve in vivo kollajen aktivasyonu yer almaktadır (Aghajanova ve ark. 2018).

CaCl₂ ile aktivasyon: Sık kullanılan yöntemlerden biri olup en iyi aktivasyon için ne kadar CaCl₂ eklenmesi gerektiği ile ilgili bir standart bulunmamaktadır. CaCl₂ ilavesi ile aktivasyon işleminin başarılı olup olmadığı TZP'nin jel forma geçip geçmemesi ile anlaşılabilir. Aktive olan TZP solüsyonu fibrinojenin fibrine dönüşümü ile jel forma geçecektir. Oluşan jel form ile plazmanın katı hale geçişi ve fibrin pıhtı/zarı oluşumu gözlenebilir (Aghajanova ve ark. 2018; Dhurat ve Sukesh 2014).

İn vivo kollajen aktivasyonu: Kollajen, TZP'nin doğal ve kuvvetli bir aktivatörüdür. TZP eğer yumuşak dokuda kullanılacaksa dış etken ile aktive edilmesi gerekmeyecektir (Dhurat ve Sukesh 2014).

Donma-çözme şoku: Burada amaç trombositler üzerinde fiziksel hasar meydana getirip degranülasyonu sağlamaktır. Yöntem olarak TZP'nin -80°C'de dondurulup 37°C'de tekrar çözülmesine dayanır. Bu aktivasyon yöntemi için de bilinen bir standart oluşturulmamış olup, işlemin tekrarlanma döngüsüne bağlı olarak büyüme faktörü konsantrasyonu arttığı bilinmektedir (Dhurat ve Sukesh 2014; Salamanna ve ark. 2015).

2.1.4. Trombositten Zengin Plazma'nın Avantaj ve Dezavantajları

Avantajları:

- Toksik değildir.
- Hastanın kendinden alınan kan steril şartlarda yine aynı hastaya uygulandığından otojeniktir ve alerji-reaksiyon riski taşımaz.
- Jel formda ya da sıvı formda amaca yönelik kullanımı mevcuttur.
- Ekonomik açıdan uygun bir tedavi aracıdır.

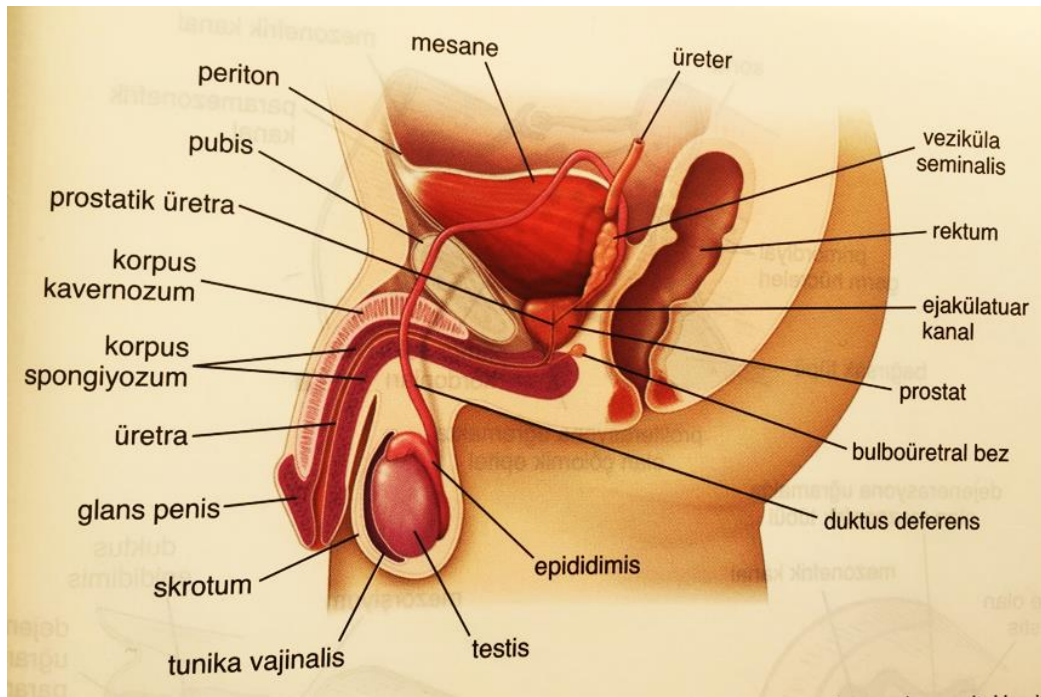
- İçerdiği büyüme faktörleri sayesinde vücutta meydana gelen yaralanma durumlarında yine vücudun kendi iyileşme mekanizması taklit edilerek tedavi edilmiş olunur (Reddy ve ark. 2018).

Dezavantajları:

- Oda şartlarında uzun süreli saklama koşulu yoktur.
- İntravenöz kan alınarak hazırlandığından kan alınırken damarın hasar görme ihtimali olabilir.
- Zamana bağlı olarak hazırlandıktan sonra geçen süre içinde büyüme faktörlerinin etkisi azalabilmektedir (Reddy ve ark. 2018).

2.2. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi testis, genital kanallar, aksesuar bezler (veziküla seminalis, prostat bezi ve bulboüretral bezler) ve penis olmak üzere 4 temel bölümden oluşmaktadır (Resim 4). Erkek üreme sisteminde yer alan bu yapılar bir dizayn içerisindedir ve haploid erkek gamet hücrelerinin devamlı olarak üretilmesi, dışı üreme kanalına bu hücrelerin taşınması, erkek üreme hücrelerini besleyecek sıvıların üretilmesi, geçici olarak depolanması, erkek seks hormonlarının sentezi ve sekresyonundan sorumludurlar (Kierszenbaum 2006).



Resim 3: Erkek üreme sisteminin genel görünümü (Ross ve Pawlina 2016).

2.2.1. Testisin Yapısı

Testisler, sıkı bir bağ dokusu yapısında olan ve tunika albuginea adı verilen kapsül ile çevrelenmiştir. Testisin posteriyor yüzeyi boyunca kalınlaşan tunika albuginea iç kısma doğru mediastinum testis yapısını oluşturur. Her iki testiste, bu bağ dokusu yapısındaki septalar ile yaklaşık 250-300 lobüle ayrılır. Buradaki bağ dokusu uzantıları 250-300 lopçuğu birbirinden tam olarak ayırmaz ve bu lopçuklar birbiri ile bağlantı halinde olabilirler. Her lopçuk yoğun kıvrımlı halde olan birkaç seminifer tübülünden oluşmaktadır. Seminifer tübüller lobüller içerisinde halka halinde kendi üzerlerine katlanırlar. Bu halka yapısının uç kısımları mediastinuma yakın bulunur. Seminifer tübülün bu uç kısımda oluşturduğu yapı tubulus rektus adını almaktadır. Seminifer epitelde henüz farklılaşmamış spermatogenik hücreler yer alırlar. Farklılaşmamış bu spermatogenik hücreler aslında kök hücre görevi görmektedirler. Bu hücrelerin farklılaşması ile seminifer epitelin bir siklusu başlar. Bahsedilen bu farklılaşma süreci yapılan çalışmalara göre yaklaşık 16 güne tekabül eder. İnsanda bir kök hücrenin spermatogenezini tamamlaması ise yaklaşık 4-5 siklusa denk düşmektedir. Bu nedenle insanda yeni spermlerin üretimi için yaklaşık 64-70 günün geçmesi gerekecektir (Speroff ve Fritz 2011).

2.2.1.1. Sertoli Hücreleri

Seminifer epitelin esas epitelini ise destek hücreleri olarak da bilinen Sertoli hücreleri oluştururlar. Sertoli hücreleri puberteden sonra replike olmayan, uzun ve prizmatik yapıda hücrelerdir. Işık mikroskopunda belirgin sınırları gözlenmemektedir. Sertoli hücrelerinin elektron mikroskopu görüntülerinde ise yaygın aER ve gelişmiş gER'e sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte çok sayıda mitokondri, lizozom ve golgi içerirler. Sertoli hücreleri birbirleri ile özgün bir bağlantı kompleksine sahiptir. Bu bağlantı kompleksi Sertoli hücresi, Sertoli hücresi ise bağlantı kompleksi adını alır. Oluşan bağlantı kompleksi, iki farklı epitelyal bölüm oluştururlar. Bu bölümler bazal epitelyal kompartman ve luminal kompartman adını alır. Spermatogonyumlar ve primer spermatositler bazal bölümde yer alırken, olgun haldeki spermatositler ve spermatidler luminal bölgede bulunurlar. Spermatogenezin farklı evrelerinin farklı kompartmanlarda gelişiyor olması hem hücrelerin kimyasal ve iyonik alış-verişinin sağlanmasını hem de kan-testis bariyerinin oluşmasını sağlamış olmaktadır.

Sertoli hücrelerinin en önemli fonksiyonları;

- *Farklılaşma evresini tamamlayamamış spermatogenik hücrelerin ve spermiyogenezin son evresinde oluşan artık cisimciklerin fagosite edilmesi,*
- *Seminifer epitelin pH'sının kontrolü,*
- *Spermatogenez süreci boyunca spermatozoonların beslenmesi, korunması ve desteklenmesi,*
- *Androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılanması,*
- *Henüz gelişen spermin olgunlaşması için testosteronun kontrolü,*
- *Anti-Müllerian Hormon üretiminin sağlanması şeklinde özetlenebilir (Junqueira ve ark 1998).*

2.2.1.2. Spermatogenik Hücreler

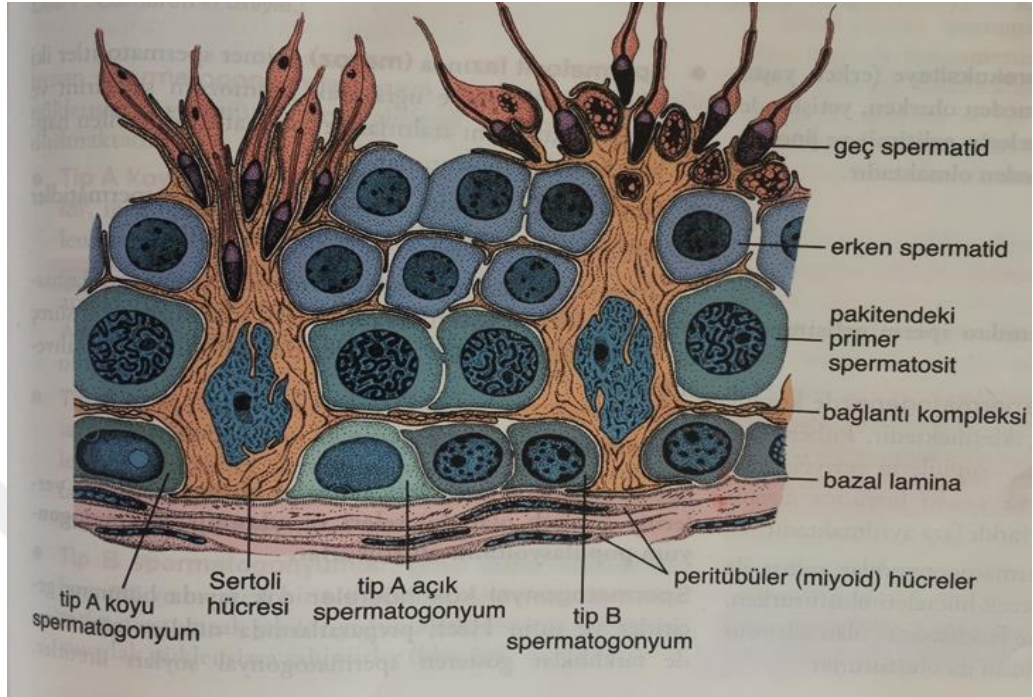
Esasen farklılaşmamış seri hücrelerdir. Belirli sikluslarla çoğalır ve matür sperme farklılaşırlar. Farklılaşma süreci puberteden az bir süre öncesinde başlar. Değişim süreci bazalden lümeneye doğrudur.

Spermatogonium: Olgunlaşmamış hücre grubudur ve bazal laminada yer alırlar. Birçok bölünme geçiren bu hücreler rutin histolojik preparatlarda nükleus görünümüne göre 3 farklı sınıfa ayrılırlar:

- Tip A koyu spermatogoniumlar düzensiz aralıklarla bölünürler. Seminifer epitelin öncü hücreleridir.
- Tip A açık spermatogoniumlar tekrarlayan mitoz bölünmeler ile farklılaşma evresine yönelmişlerdir.
- Tip B spermatogoniumlar spermatogonal aşamadaki son olayı temsil etmektedirler (Sharma ve ark 2001).

Spermatositler: Primer spermatositler Tip B spermatogoniumların mitotik bölünmesi ile oluşurlar. Mayoz bölünme gerçekleşmeden hemen önce DNA'larını duplike ederler. Birinci mayotik bölünmenin sonucunda oluşan hücrelere sekonder spermatosit adı verilmektedir (Aras 2009).

Spermatidler: Sekonder spermatozoidlerin de mayoz bölünmesi sonucu DNA içeriği haploid olan spermatidler meydana gelirler.



Resim 4: Spermatozoidlerin şematik görünümü (Ross ve Pawlina 2016).

Lamina (tunika) propriya, peritübüler doku olarak da isimlendirilmektedir. Bu doku insanda seminifer tübülün bazal laminasının dış bölümünde miyoid hücreler içerir. Miyoid hücreler düz kas hücreleri ile benzerlik gösterirler. Bu hücreler ritmik kasılmaların gerçekleşmesini sağlamaktadır. Böylece testiküler sıvı ve spermatozoanın seminifer tübüllerden boşaltım kanalına akışı sağlanmış olur. Tunika propriya bağ dokusu yapısında olmakla beraber tipik fibroblastlardan yoksundur (Ross ve Pawlina 2016).

2.2.1.3. Leydig Hücreleri

Steroid salgılayan hücreler olmaları nedeniyle bol miktarda aER'e sahiptirler. Yoğun miktarda aER bulunması Leydig hücrelerinin eozinofilik olmasını sağlar. Farklılaşma süreçleri erken fetal yaşamda başlar. Erken fetal yaşamdan itibaren testosteron salgılayıp, embriyonun cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonunda önemli yer tutarlar. Leydig hücreleri testosteron salgılamaya pubertede de devam ederler ve bu sayede sperm üretiminin başlatılması sağlanmış olur (Smith ve Turek 2011). Testosteron salgılamasının devam etmesi ile yetişkinlerde spermatogenez, sekonder

seks karakterleri, aksesuar cinsiyet bezleri ve genital boşaltım kanallarının devamlılığı sağlanmış olmaktadır (Costabile 2013; White ve Porterfield 2013; Öztaş 2016).

2.3. SPERMATOGENEZ VE OLGUN (MATÜR) SPERMİN YAPISI

Spermatogenez süreci pubertede spermlerin progenitör hücrelerinin çoğalması ile başlar. Progenitör hücreler spermatogonyumlardır. Spermatogenez, anlaşılması açısından 3 farklı evreye ayırabiliriz:

- 1) **Spermatogonyal Faz:** Bu evrede spermatogonyal kök hücreler hem farklılaşacak gruba oluşturmak hem de kaynak kök hücrenin devamını sağlamak için mitoz bölünme geçirirler. Meydana gelen bölünmeler sonucunda nükleer görünümüne göre Tip A koyu, Tip A açık ve Tip B olarak 3 farklı spermatogonyum oluşmuş olur.
- 2) **Spermatosit Fazı (Mayoz):** Bu aşamada primer spermatositler meydana gelir ve bunlar Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmesi sonucu oluşurlar. Oluşan primer spermatositler mayoz bölünmeden önce DNA'larını duplike ederler. Bunun sonucunda her primer spermatosit $2n$ kromozom ve $4d$ DNA içerir. Mayoz I'den sonra kromozom sayısı $2n$ 'den $1n$ 'e, DNA miktarı da $2d$ 'ye gelir. Bu aşamada haploid kromozoma ve $2d$ DNA'ya sahip sekonder spermatositler oluşmuş olur. Sekonder spermatositler mayoz II'den önce DNA replikasyonu yapmazlar. Sonuç olarak oluşan her bir spermatid haploid sayıda kromozoma sahiptir.
- 3) **Spermatid Fazı (Spermiyogenez):** İkinci mayoz bölünmeden sonra tekrar bir bölünme gerçekleşmez ve haploid spermatidler olgun sperm oluşturmak için bir farklılaşma sürecine ilerlerler. Bu sürece spermiyogenez denir ve spermiyogenez evresi 4 ana aşamadan oluşmaktadır:
 - **Golgi Fazı:** Periyodik asit- Schiff (PAS) pozitif granüllerin görülmesi ile karakterizedir. Bunun nedeni PAS'ın spermatidin çok sayıdaki golgi kompleksine kümelenmiş olmasıdır. Bu granüller akrozomal vezikülü oluşturmak için bir araya gelmişlerdir. Akrozomal vezikülün konumu gelişme evresindeki spermin ön kutbunu belirlemektedir.

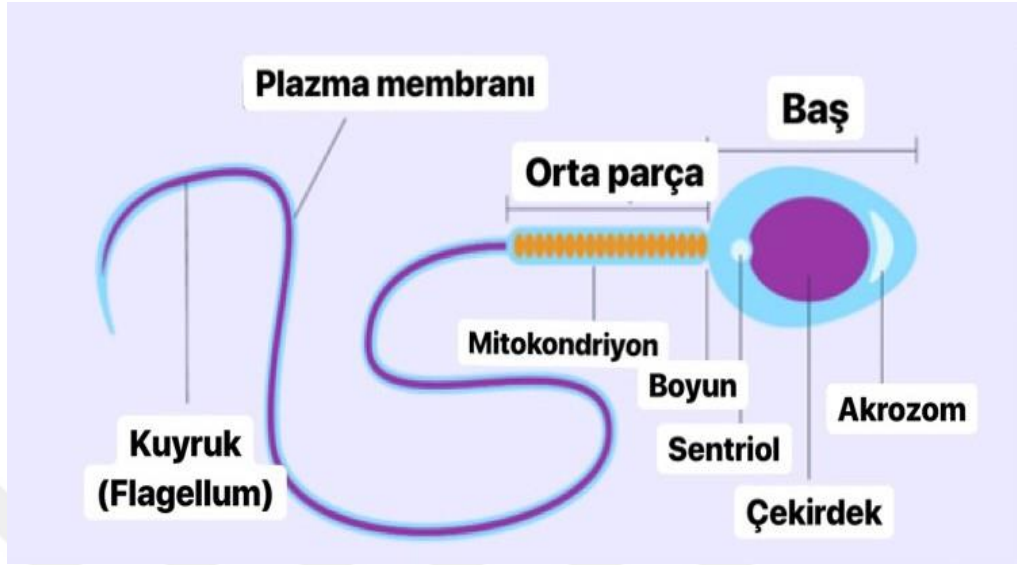
- **Kep Fazı:** Akrozomal kep yapısının oluşması ile karakterizedir. Akrozomal vezikül nükleusun ön yarısı üzerinde yayılmış bir yer alır.
- **Akrozom Fazı:** Spermatidin kendini tekrardan hizaladığı fazdır. Spermatidin başı sertoli hücrelerinin içine gömülüdür ve bazal laminaya yönelim vardır.
- **Olgunlaşma (Maturasyon) Fazı:** Spermatid yeniden şekillenir. Flagellumun etrafında bulunan artık sitoplazma yavaş yavaş azalır. Rezidüel cisimcik adı da verilen bu sitoplazma artıkları sertoli hücreleri tarafından fagosite edilecektir. Tüm bu aşamaların sonucunda olgun sperm oluşmuş olur (Ross ve Pawlina 2016).

2.3.1. Olgun (Matür) Spermin Yapısı

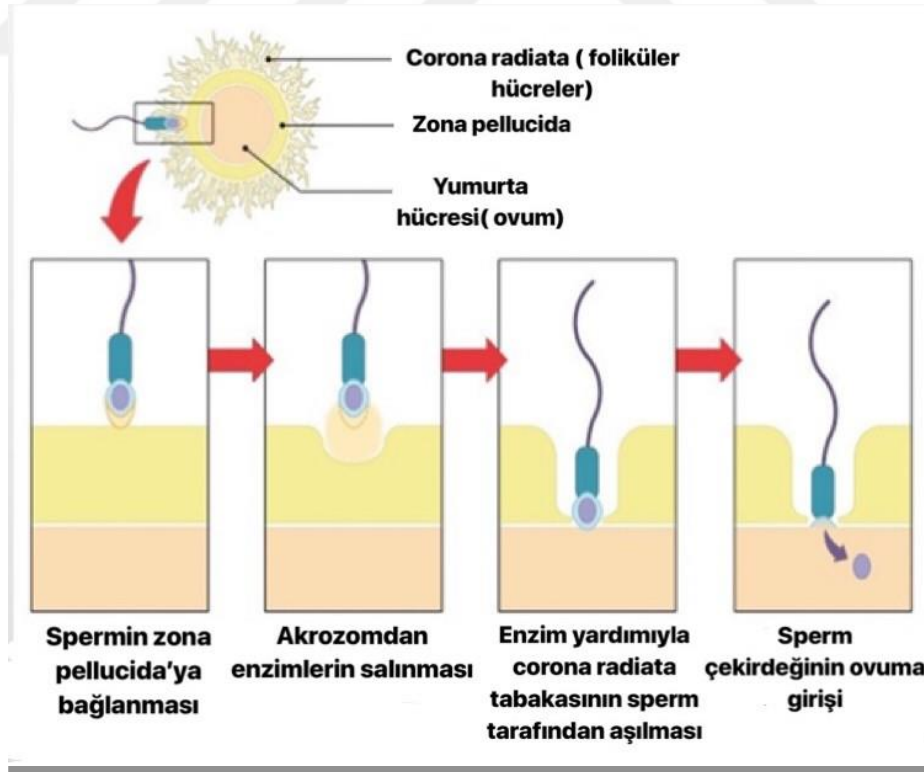
Spermatozoa' yı morfolojik olarak baş ve kuyruk olarak iki ana bölümde inceleyebiliriz. Baş bölgesi kendi içinde akrozomal ve postakrozomal olarak yine iki ayrı bölüm oluşturur. Spermatozoa'nın kuyruk kısmı boyun, orta kısım, esas ve son kısım olarak dört bölümden meydana gelmiştir. Bir spermin toplam uzunluğu 60 µm olup, baş kısmının uzunluğu 4-5 µm, eni ise 3 µm' dir. Spermin kuyruk ve baş bölümleri bir plazma membranı ile sarılıdır (Junqueira ve Carneiro 1998; Arslan 2008).

- **Baş:** Spermin baş kısmı sivri ve yassı görünüme sahiptir. Nükleusun ön 2/3'lik bölümünü akrozomal kep oluşturur. Akrozomal kep, salgı kesesi fonksiyonu görmektedir. İçeriğinde tripsin benzeri proteaz, akrozin, asit fosfataz, nöroaminidaz ve hyalurinidaz gibi hidrolitik karakterdeki enzimler bulunur. Bu enzimler, sperm ovuma ulaştığında ovumun zona pellucida'sının delinmesinde fonksiyon görürler. Sperm ovum ile temas edince akrozomal keseden salınan enzimler, spermin penetrasyonunu kolaylaştırma ve farklı spermlerin ovuma girmesini engelleme gibi fertilizasyon için çok önemli görevleri yerine getirirler. Meydana gelen bu olaylar akrozom reaksiyonu adını alır (Kuyucu 2006).
- **Kuyruk:** Spermin kuyruğu; boyun, orta parça, esas parça ve son parça olarak dört bölümde incelenmekte olup kuyruk bölümü esasen hareket eden bir kamçıdır. Boyun bölümünde kaba fibriller ve sentriollerin başlangıcı yer alır. Orta parçada mitokondriyonlar bulunmakta olup burada yer alan mitokondriyonlar kuyruğun hareketi için ihtiyaç duyulan enerjiyi sağlarlar.

Esas parça hemen hemen 40 µm uzunluğundadır. Son parça ise kuyruk bölümünün son 5 µm'lik kısmıdır (Ok 2005).



Resim 5: Olgun sperm yapısı (<http://anatomysciences.com/sperm-diagram-by-human-body/sperm-diagram-by-human-body-whats-the-function-of-a-sperm-cell-definition-structure/> 15.05.2019).



Resim 6: Akrozom reaksiyonu (<https://ib.bioninja.com.au/higher-level/topic-11-animal-physiology/114-sexual-reproduction/human-fertilization.html> 15.05.2019).

2.4. SEMEN ANALİZİ

Semen analizi veya diğerk adı ile spermiyogram, erkek infertilitesi açısından değerli bilgiler sunan bir laboratuvar testidir. Dünya genelinde yapılmış çok merkezli bir çalışmada, infertil çiftlerinin %30-40'ında yalnızca erkek faktörü infertilite nedeni olarak görülmüş, bu bilgiler ışığında erkek infertilitesinin anlaşılabilmesi için semen analizi daha da önemli bir boyut kazanmıştır. Spermiogram testi yalnızca infertilite tanısında değil, testisi etkileyen varikosel, inmemiş testis, kemoterapi veya radyoterapi gibi testiste sperm üretimini etkileyen durumlar için de önem arz eder. İnfertilite veya erkek üreme sağlığı nedeniyle başvuran her hastanın öyküsü dikkatli alınmalı, daha önce geçirilmiş enfeksiyonlar, sigara-alkol kullanımı, cinsel yaşam öyküsü ve çocukluk ağı hastalıkları gibi faktörler sorgulanmalıdır (Erdemir ve ark. 2011).

İlerleyen zaman ile birlikte infertilitenin tanı ve tedavisi için spermiogram testinde yer alan kriterlerde farklı güncellemeler olmuş, bu güncellemeler ışığında semen analizinin dünya çapında standardizasyonu sağlanmaya çalışılmıştır.

WHO, son güncellemesini 2010 yılında yapmıştır. Elde edilen tüm yeni verilere, yapılan son güncellemelere rağmen erkek infertilitesinin anlaşılmasında yapılan tek bir sperm testi yeterli olmamaktır. Semen parametreleri anormal olan hastaların dışında, kişinin semen parametreleri normal de olsa değişik zamanlarda yapılan sperm testleri arasında da farklılık görülmüştür. Bu nedenle hastanın tanısı konmadan önce farklı zamanlarda yapılmış en az iki spermiogram sonucu incelenmiş olmalıdır (Delilbaşı 2008; Sánchez ve ark. 2013).

Semen analizi için laboratuvara başvuran hasta yetkili kişi tarafından bilgilendirilmelidir. Bu bilgiler arasında;

- Cinsel perhiz süresinin 3-5 gün arasında olması gerektiği,
- Mastürbasyon sırasında sabun ve kayganlaştırıcı maddeler kullanılmaması,
- Ejekülatın tamamının sperm verme kabına alınması gerektiği,
- Laboratuvar ortamında verilemeyen örneklerin yine laboratuvara yakın bir yerde verilmesi ve vücut sıcaklığında laboratuvara ulaştırılması gerektiği yer almalıdır.

Hasta numuneyi vermeden önce yetkili kişi numune kabına hastanın ad- soyad ve protokol numarası gibi bilgileri etiketlemiş olmalıdır. Numune, verildikten yaklaşık 1 saat sonra gerekli incelemeler yapılır. Bu bir saat süresince;

- Numune verildikten hemen sonra likefiye olması için 37°C inkübatöre bırakılır.
- 30-60 dk. aralığında likefiye olmuş örneklerin önce makroskobik, sonrasında mikroskobik incelemeleri yapılır.

Tüm incelemeleri tamamlanan numune eğer gerekiyorsa biyokimya/ mikrobiyoloji laboratuvarına analiz için gönderilebilir.

Semen analizi, makroskobik ve mikroskobik inceleme olarak iki ayrı aşamada yapılır (Delilbaşı 2008; Franken, D. R. & Oehninger 2012).

2.4.1. Makroskobik Analiz

2.4.1.1. Renk ve Koku

Semenin kokusu cinsel perhiz süresi/ hastanın geçirdiği enfeksiyona bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Semen kokusunun kestane çiçeği kokusunda olduğu ve bu kokunun prostat sıvılarından kaynaklı sperm oksidasyonu nedeniyle oluştuğu düşünülmüştür.

Çözülmüş normal semen gri-beyaz renktedir. Semende değişik nedenlere göre renk farklı olabilmektedir. Normal renginin dışında semen, kırmızı-kahverengi olduğunda semende eritrosit varlığı, sarı olduğunda ise enfeksiyon, kullanılan vitamin ilaçları veya uzamış cinsel perhiz süresi düşünülebilir (McLachlan ve ark. 2003).

2.4.1.2. Likefaksiyon

Semen, prostat salgısının ihtiva ettiği proteolitik enzimler ile likefiye olur. Likefaksiyondan önce, numune kabındaki semen koagüle bir yapıdadır. Laboratuvar şartlarında semenin likefiye olması için 37°C'ye ayarlı bir inkübatöre bırakılması gerekir. Normal bir semen yaklaşık 30-60 dk arasında likefiye olmaktadır. Likefaksiyon esnasında numunenin homojenizasyonu likefaksiyona yardımcı olabilir.

Eğer likefaksiyon süresi 60 dk'yı aşarsa bu durum patolojik bir tabloyu işaret edebilir. Likefaksiyon süresinin fazla olduğu örneklerde akla prostat bezinin fonksiyon bozukluğu veya yetersizliği gelmektedir. Likefiye olmayan semen numuneleri bir mekanik veya enzim yöntemi ile likefiye edilmelidir. Aksi takdirde semenin mikroskopik analizi doğru sonuçlar vermeyecektir (Carlsen ve ark. 2004).

2.4.1.3. Viskozite

Likefiye olmuş semen örneği düşük viskoziteli ve akışkan bir yapıya sahiptir. Şayet semen ejakülasyon sonrasında likefiye süresini de doldurdu ise ve halen visköz özelliğini koruyorsa bu durumda hipervisköz olarak kabul edilmektedir. DSÖ, viskozitenin teşhisi için iplik uzunluğuna göre ölçüm yöntemini önermektedir. Viskoziteyi ölçerken numune 1.5 mm çapındaki bir pipet ile aspire edilir ve yerçekimi ile düşmesi beklenir. Likefiye olmuş, normal bir numune örneği damla damla olacak şekilde pipetten ayrılır. Eğer viskozite yüksek ise bu sefer pipetten 2 cm veya daha fazla uzunlukta bir iplik oluşturup terk edecektir. Viskozitenin 2 cm ve daha fazla olması anormal viskoziteyi göstermektedir (Kayıkçı ve ark. 2002).

2.4.1.4. Semen Hacmi

Toplam semen hacminin ölçümünde en önemli faktör örneğin tamamının toplanmış olmasıdır. Bu nedenle hasta henüz semen örneğini vermeden önce bu konuda bilgilendirilmelidir. Semen hacmi, dereceli pipetler ile ölçülebileceği gibi, en ideal yöntemin kabın tartılması olduğu düşünülmüştür. DSÖ'nün 2010 verilerine göre semen hacmi için en düşük referans değeri 1,5 ml'dir (Cooper ve ark. 2010).

2.4.1.5. Semen pH'sı

Semen pH'sı analiz öncesinde iyice homojenize edilmeli ve daha sonra pH ölçümü yapılmalıdır. pH ölçümü yapılırken homojenize semenden 1 damla alınır ve pH çubuğunun üzerine damlatılır. 30 sn içinde gerçekleşen renk değişimi kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılmalıdır. En düşük pH değerinin 7,2 olması gerekmektedir (Özdener 1993).

Tablo 2: Spermiyogramdaki sperm değişkenleri terminolojisi (WHO 2010).

NORMOSPERMİ	Sayı, motilite, morfoloji ve diğer sperm parametrelerinin DSÖ referans değerlerine uygun olmasıdır.
AZOSPERMİ	Ejakülat içerisinde hiç sperm bulunmamasıdır.
POLİSPERMİ	ml'deki sperm konsantrasyonunun 15×10^6 'dan fazla olmasıdır.
OLİGOSPERMİ	Sperm konsantrasyon değerinin ml'de 15×10^6 'dan daha düşük olmasıdır.
HİPOSPERMİ	Ejakülat volümünün 1 ml'den az miktarda olmasıdır.
HİPERSPERMİ	Ejakülat volümünün 6 ml'den fazla miktarda olmasıdır.
ASTENOSPERMİ	Motil sperm sayısının %30'dan düşük olmasıdır.
TERATOSPERMİ	Ejakülatın morfolojik olarak referans değerin altında olmasıdır.
OLİGOASTENOTERATOSPERMİ	Konsantrasyon, morfoloji ve motilite bozukluklarının bir arada görülmesi durumudur.
ASPERMİ	Seminal plazma üretiminin hiç olmamasıdır.
KRİPTOSPERMİ	Ejakülatta hiç sperm görülmezken santrifüj sonrasında sperm görülmesidir.
NEKROSPERMİ	Ejakülattaki tüm spermlerin ölü olmasıdır.
LÖKOSPERMİ	Lökosit sayısının ml'de 1×10^6 'dan fazla olmasıdır.

2.4.2. Mikroskopik Analiz

2.4.2.1. Sperm Konsantrasyonu ve Total Sperm Sayısı

Sperm sayısının mililitre başına sayısı sperm konsantrasyonunu vermektedir. Total sperm sayısı ise sperm konsantrasyonunun total hacim ile çarpılmasından elde edilmektedir. Sperm konsantrasyonu hesaplanırken Makler sayım kamarası, hemositometre gibi sayım kamaraları kullanılabilir. Fakat Makler sayım kamarası, spermin seyreltilmesine gerek duyulmayışı, sayım yapılacak karelerin daha az oluşu ve yine doğru sonuçlara ulaşılabilirliği bakımından daha çok tercih edilmektedir. Sperm sayımı yaparken örneğin likefiye olmuş olması spermlerin belli bölgelerde yığılıp kalmamaları açısından önem arz eder. Yine numunenin homojenize edilmesi önemlidir, çünkü 10 µl'deki değere göre total konsantrasyon hesaplanmış olacaktır. Aynı zamanda sayım yaparken bekleme süresi fazla olmamalıdır, aksi takdirde ışığa maruziyet ve mikroskobun aşırı ısınması sonuçları etkileyebilecektir. Total sperm sayısı alt referans değeri $39 \times 10^6/\text{ml}$ 'dir (WHO 2010).



Resim 7: Makler sayım kamarası



Resim 8: Sperm analizinin yapıldığı ışık mikroskobu

2.4.2.2. Sperm Motilitesi

Semen likefiye olduktan sonraki ilk 30 dk'da oda ısısında ve 37°C'de faz kontrast mikroskobu ile motilitesi ölçülmelidir. Motilite ölçümü de Makler sayım kamarasında gerçekleştirilebilir. Analize başlamadan önce homojenize semenden 1 damla alınır ve Makler sayım kamarasına damlatılır. 20X büyütme ile bir sütun ve bir satırda yer alan her bir karede motil ve immotil spermeler değerlendirilir.

Sperm motilitesi erkeğin yaşı, testislerin maruz kaldığı dış etkenler, cinsel perhiz süresi, semenin verildiği kap, analiz öncesi bekleme süresi gibi pek çok faktörden etkilenebilir.

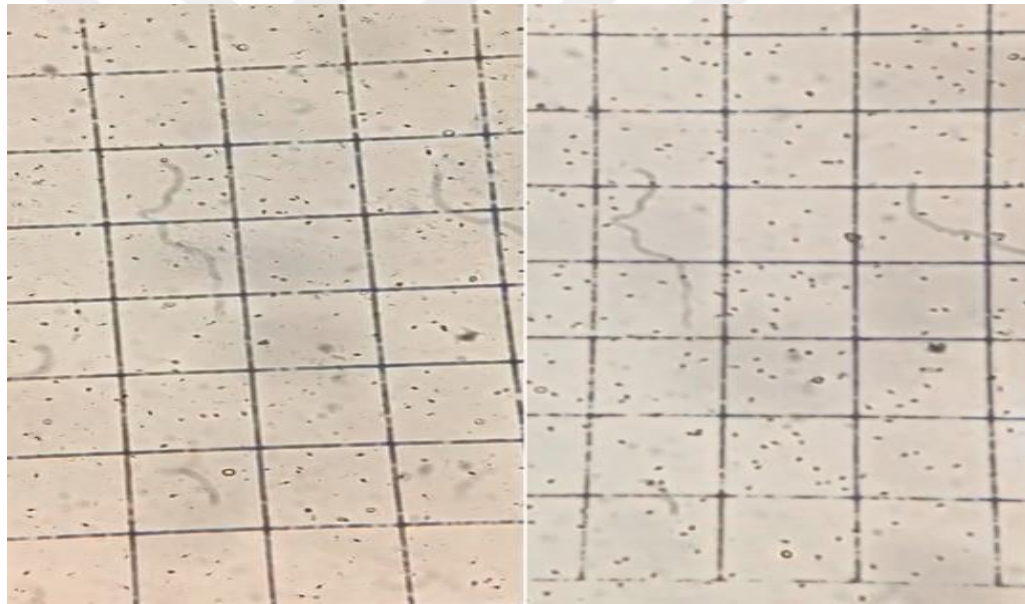
Sperm motilitesi analizinde hareketin 4 farklı gruplandırması bulunmaktadır;

- +4 Motilite: Hızlı ve doğrusal hareket gösteren spermelerdir.

- +3 Motilite: Doğrusal bir hareket gösterip, +4 motilite hızında olmayan ya da +4 hızında olsa bile doğrusal hareket göstermeyen spermelerdir.
- +2 Motilite: Tek bir kare içinde hareketlilik gösteren veya bir kareyi aşamayan spermelerdir.
- +1 Motilite: İmmotil yani hareketsiz spermelerdir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 verilerine göre sperm motilitesinin alt referans değeri %40'tır. İleri hareketlilik alt sınır değeri ise %32 olup, ileri hareketlilik A+B yani +4 ve +3 motiliteye sahip spermelerin toplanmasıyla elde edilir.

Toplam sperm motilitesi ise A+B+C yani +4, +3 ve +2 motiliteye sahip spermelerin toplam değerini ifade etmektedir (WHO 2010).

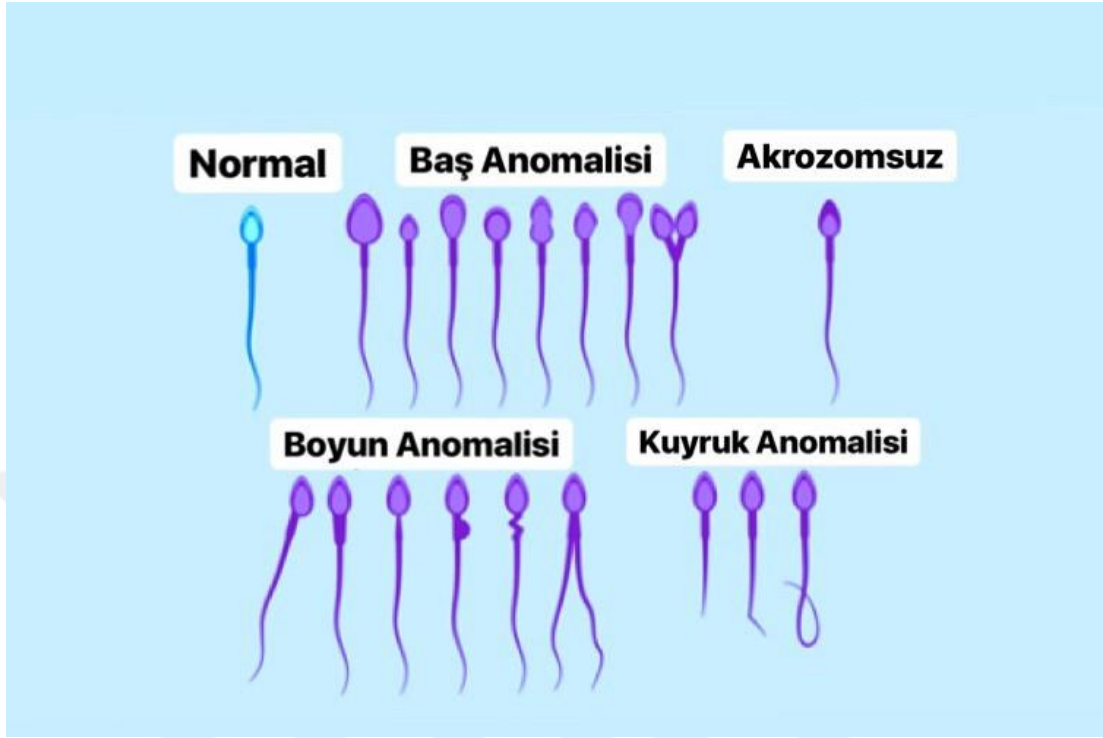


Resim 9: Spermelerin Maklerdeki görüntüsü

2.4.2.3. Sperm Morfolojisi

Normal sperm morfolojisi zona pellucida yüzeyinden elde edilen spermeler baz alınarak oluşturulmuştur. Çünkü semende sperm morfolojileri değişkenlik göstermektedir. Fakat zona'ya ulaşan spermelere bakıldığında ise ortak benzerlikler görülmüştür. Normal bir spermın sperm başı 4-5 µm uzunluğundadır ve 3-4 µm genişliğinde oval olup, sperm başının hatları düzgün bir şekilde olmalıdır. Kuyruk ortalama 50 µm uzunluğunda olmalı aynı zamanda spermın boyun, orta parça, esas

parça, son parça kısımlarının herhangi bir defekt içermemesi gerekmektedir (Özdener 1993; Satar ve Gençdal 2013).



Resim 10: Normal ve anormal morfolojiye sahip sperm görüntüsü (<https://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-morfologia-de-los-espermatozoides/> 15.05.2019).

2.4.2.4. Sperm Canlılığı (Viabilite)

Viabilite, sperm hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Progresif hareketin normal standartların altına düştüğü durumlarda sperm viabilite testleri önem kazanır. Eğer sperm membran bütünlüğü bozulmuş ise Eozin-nigrosin veya Eosin-Y testinde boyayı içeri alır ve boyanmış görünürler. Hipoozmotik şişme testi yapılan spermelerde ise membran bütünlüğü korunmuş ise hücre hipoozmolar sıvıyı içine alıp şişer. Sperm canlılık testi hesaplanırken preparatta en az 200 sperm sayılmış olması gerekmektedir. Viabilite için en düşük referans değeri %58 olarak belirlenmiştir (Casper ve ark. 1996).

2.5. SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Tedavi amaçlı kullanılacak sperm örneklerinde ejakülata uzaklaştırılması gerekmektedir. Örneğin, IUI tedavisi uygulanacak bir hasta için sperm hazırlanırken ejakülatta bulunan prostaglandinlerin uterus kasılma yapmaması için ejakülata uzaklaştırılması gerekir. Bu tür tanı ve tedavi yöntemleri için farklı sperm hazırlama

metodları denenmiş ve uygulanmıştır. Seminal sıvının uzaklaştırılması ile seminal plazmada bulunan germ dışı hücreler, ölü sperm ve hücre döküntüleri arınmış olur. Aynı zamanda kullanılan sperm hazırlama yöntemleri, motil sperm kapasitesinin tamamlanması için de önemli bir faktördür. Böylece laboratuvar ortamında vücudumuzda gerçekleşen bir aşamayı daha taklit edebilmiş oluruz.

Sperm hazırlama metodları hastaya göre belirlenmektedir. Çünkü semenin özelliğine göre, en iyi motilite ve konsantrasyon aralığına ulaşmak hedef alınmaktadır. Bu nedenle işlem öncesi yapılan spermiyogram testine göre tedaviye en uygun sperm hazırlama metodu seçilmelidir.

2.5.1. Basit Yıkama (Simple Washing)

Basit yıkamada semen, albümin içeren bir medium ile yıkanır ve konik bit tüpe alınıp 10 dk 300 g'de santrifüj edilir. İlk santrifüjden sonra süpernatant atılır ve elde edilen pelletin üzerine tekrar medium eklenip pipetting yapılır. Daha sonra 5 dk. 300g'de santrifüj edilir. Bu santrifüj işleminden sonra yine süpernatant atılır ve pellet medium ile homojenize edilip kullanılır. Basit yıkama işlemi en yüksek sperm sayısı veren bir sperm hazırlama yöntemi olsa da motil ve immotil spermeleri ayırtmadığından bir dezavantajı da beraberinde getirmektedir. Bu işlem genellikle IUI tedavisinde kullanılmaktadır (WHO 2010).

2.5.2. Dansite Gradient Santrifügasyon

Bu yöntem aşırı derece oligozoospermi, teratozoospermi veya astenozoospermi vakalarında tercih edilmekte olup, fazla sayıda motil sperm elde etmek için kullanılmaktadır. Dansite gradient tekniği, kesintisiz yoğunluk farkı oluşturarak kaliteli spermelerin ölü sperm ve yabancı hücrelerden ayrıştırılmasına dayanır. Bu ayrıştırma sonucu iyi motilite ve morfolojideki sperm tüpün alt kısmına toplanmış olur (Natali 2011).

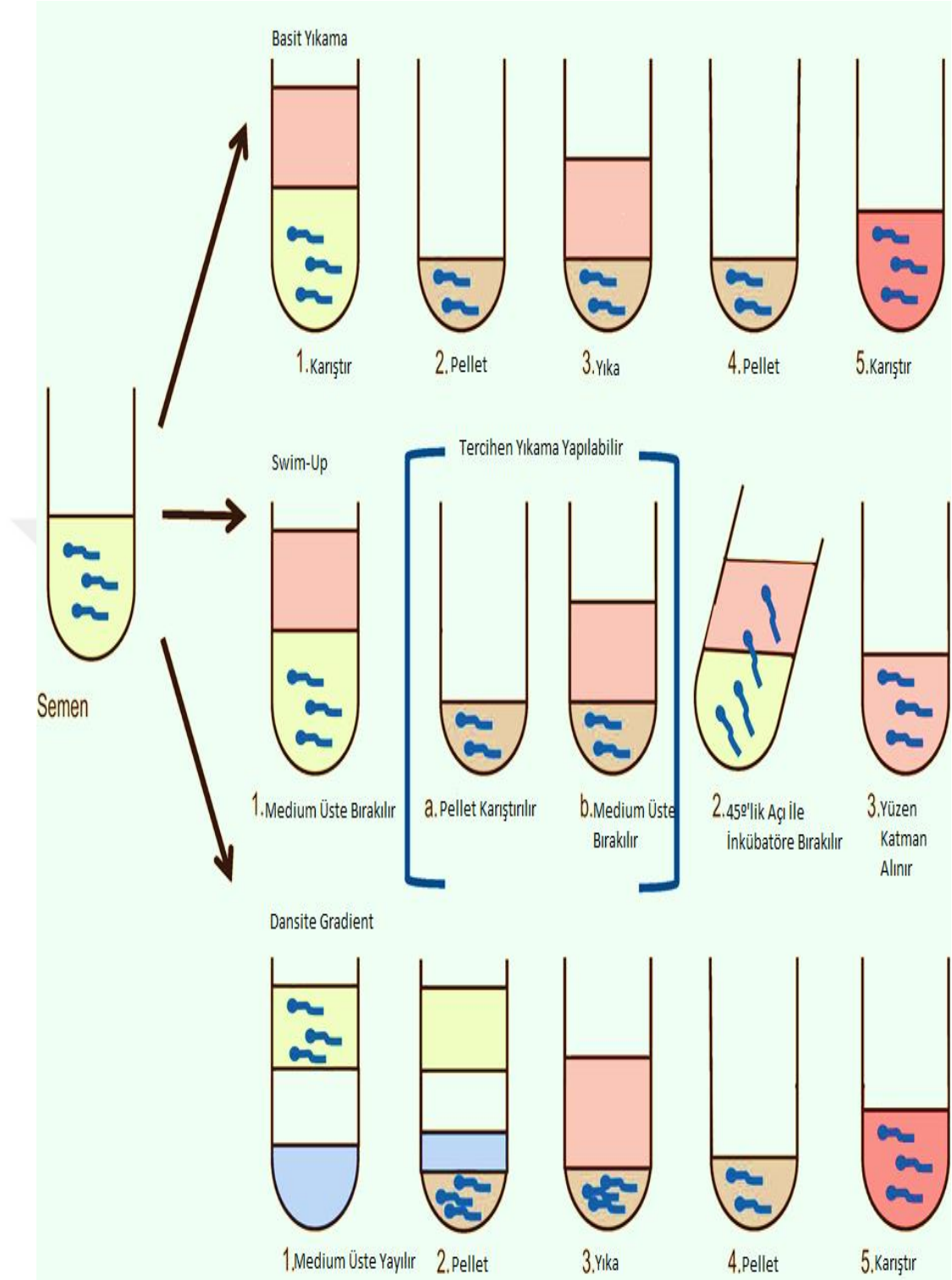
2.5.3. Sperm Yüzdürme (Swim-up)

Bu yöntem sıklıkla IVF tedavisinde tercih edilmektedir. Swim-up yönteminin temel mantığı, spermelerin seminal plazmadan ayrılıp üstte oluşturulan katmana yüzmelerine dayanır. 1:1 oranında kültür mediumu eklenmiş semen örneği homojenize edilir ve santrifüj edilir. Santrifüj sonrası elde edilen pellete bir önceki hacme göre

medium eklenir ve homojenize edilir. Bu işlemden sonra 45lik açı ile tüpün kenarından bir miktar medium sızdırılarak bırakılır ve katman oluşması beklenir. Katman oluşma esnasında mediumun yavaş ve dikkatli bırakılması gerekmektedir. Katman oluşan örnek yine 45lik açı ile 37Clik inkübatöre konur ve 30-60 dk spermilerin üstteki katmana yüzmesi beklenir. Hareketli spermier üstteki katmana yüzer ve katman dikkatlice farklı bir tüpe alınır. Bu işlem basit yıkama'ya göre daha az konsatrasyonda sperm sayısı verse de, elde edilen motil spermier açısından basit yıkamaya göre üstün bulunmaktadır (Kadıoğlu 2011; WHO 2010).

2.5.4. Sperm Yüzdürme (Swim-Down)

Swim-down yöntemi mantık olarak swim-up'a çok yakın bir yöntem bir yöntemdir çünkü bu metotta da hareketli spermierin oluşturulan ayrı katmana yüzmesi beklenir. Bu yöntemte tüpün alt kısmına albuminli medium bırakılır ve üstten yavaş ve sızdırarak yıkanmış spermier veya doğrudan semenin kendisi bırakılır. 37°Cde 1 saat inkübe edilip spermierin alttaki katmana yüzmesi beklenir. Yüzen spermier alt ve üst katman birbirine karıştırılmadan alttaki katmandan dikkatlice alınır (Beydola ve ark. 2013).



Resim 11: Sperm hazırlama teknikleri (<https://www.sunflowerhospital.in/sperm-washing-technic.php> 18.05.2019).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma 08.10.2018/30.11.2018 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesi'ne rutin semen analizi için müracaat eden, semen örnekleri istenilen tahlil yönünden değerlendirilip sonuçları rapor edildikten sonra tıbbi atık olarak ayrılan ve bu çalışmada kullanımına onay veren, yaşları 18-50 arası toplam 29 adet gönüllünün semen örnekleri ve Trombositten Zengin Plazma eldesi için gönüllü olarak kan veren 10 kişinin kan örnekleri ile yapıldı. Çalışmamız Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun 05.10.2018 tarih 2018/1510 nolu izni ile (bkz. EK 1) gerçekleştirildi. Çalışmaya katılan her gönüllümüzden bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ile izinleri alındı (bkz.EK 2, EK 3).

3.1. Semen Örneklerinin Toplanması

Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle Tüp Bebek Merkezi'ne gelen hastalardan, hastanın ad-soyad ve protokol no'sunun yazıldığı kaplara mastürbasyon yöntemi ile alınmış olup rutin spermiyogram testi yapıldıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya azospermi dışındaki hastalar dahil edilmiştir. 30 hastadan gönüllü olur formu alınmış ve 1 hastanın azospermi olması nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır.

3.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızda kan vererek gönüllü olmak isteyen 10 gönüllüden 1:5 oranında olan asit sitrat dekstroz- A (ACD-A)'lı tüplere kan alınarak 10 cc'ye tamamlanmış, aynı gün Trombositten Zengin Plazma eldesi için laboratuvarında çalışılıp dondurulmak üzere saklanmıştır.

3.3. Trombositten Zengin Plazmanın hazırlanması

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımlı Üreme Teknikleri Ünitesi Ar-Ge amaçlı laboratuvarında gönüllülerden elde edilen kan, 1:5 oranındaki asit sitrat dekstroz- A (ACD-A)'lı tüplere alınıp 1100 devirde 22 dakika soğutmalı santrifüj cihazında santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası üstte kalan plazma alınıp 1:10 oranında CaCl₂ ile karıştırılmıştır. CaCl₂ ilavesi 550 µl plazmaya 27,5 µl CaCl₂ olacak şekilde yapılmıştır. Pıhtı/fibrin yapısı oluşana kadar oda ısısında veya

37°C'lik inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu işlem sonrasında elde edilmiş plazma tekrar 2700 devirde 15 dk santrifüj edilip santrifüj sonrası süpernatant kısmı 1,5 ml'lik eppendorf tüplere konup -20°C'de saklanmıştır. Çalışmadan önce oda ısısında çözdürölüp kullanılmıştır.



Resim 12: Antikoagülanlı tam kan.



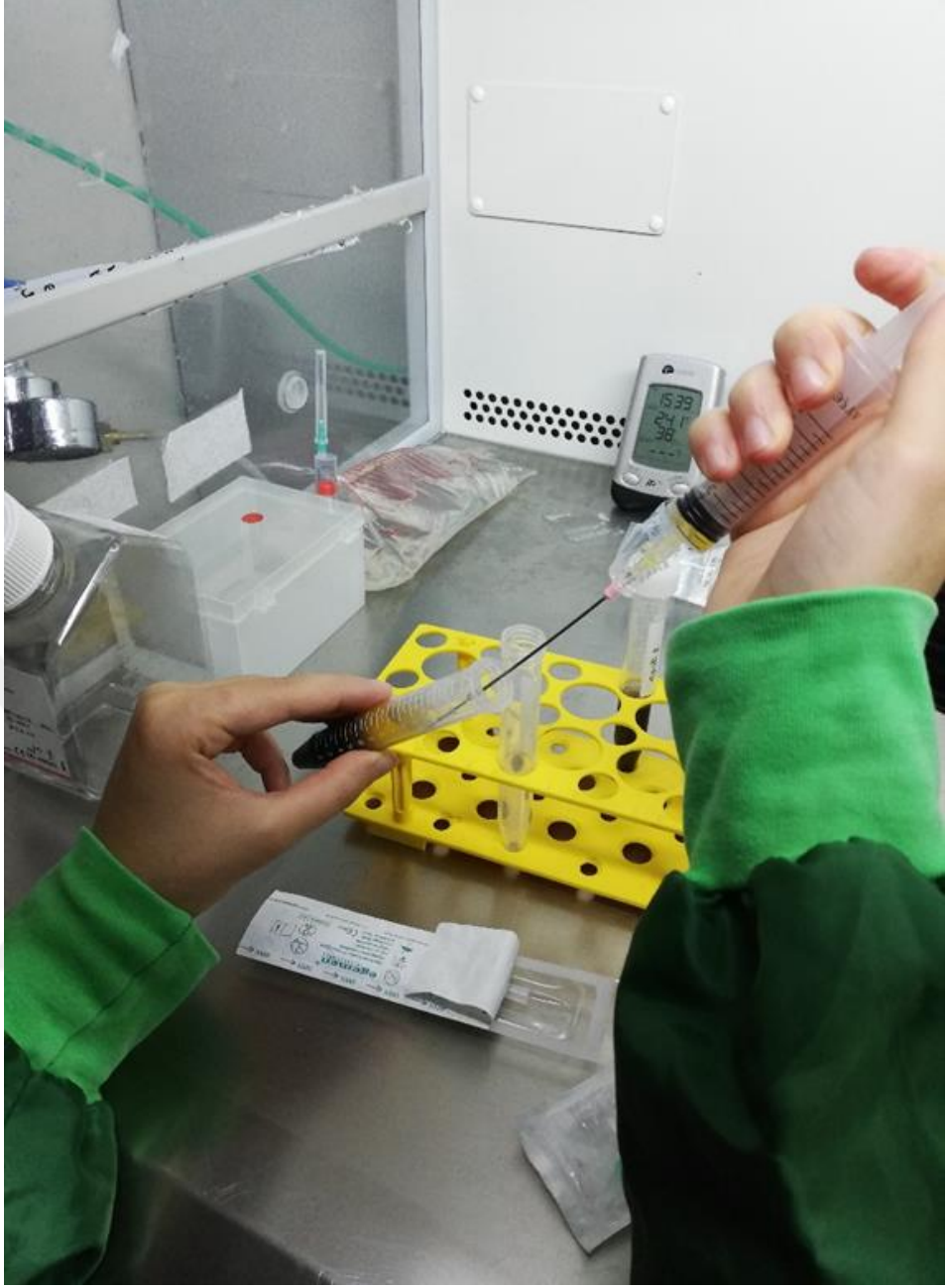
Resim 13: Kanın konik tüpe aktarılması.



Resim 14: Santrifüj işlemi.



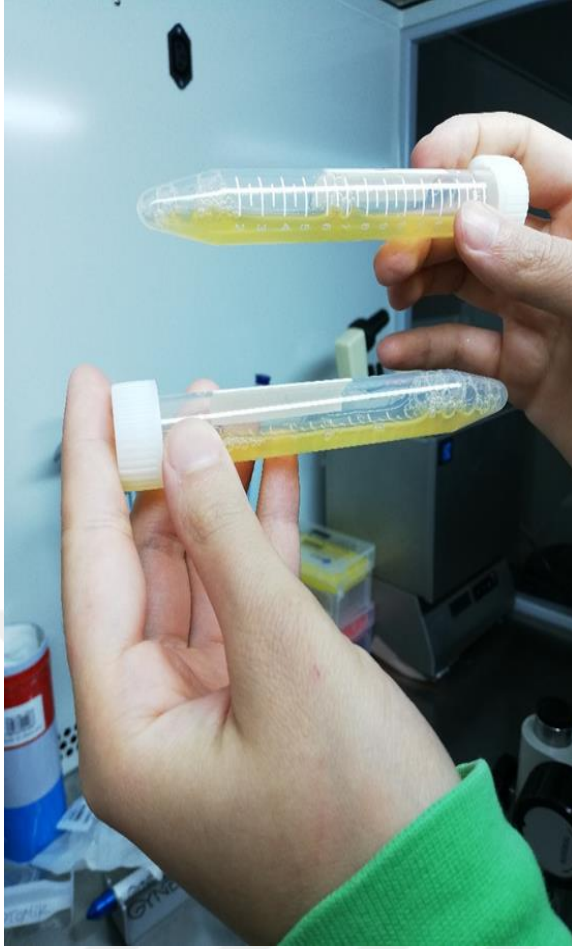
Resim 15: Santrifüj sonrası oluşan plazma.



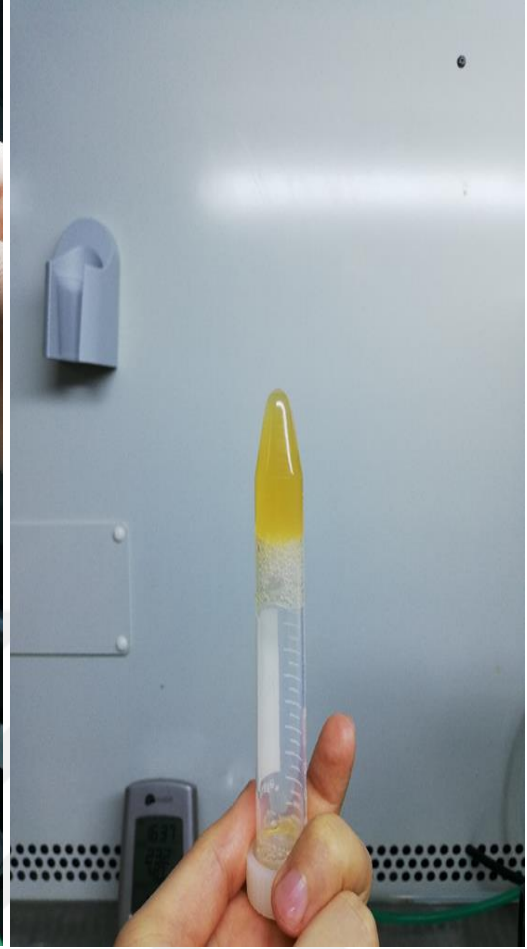
Resim 16: Plazmanın dikkatli bir şekilde alınması.



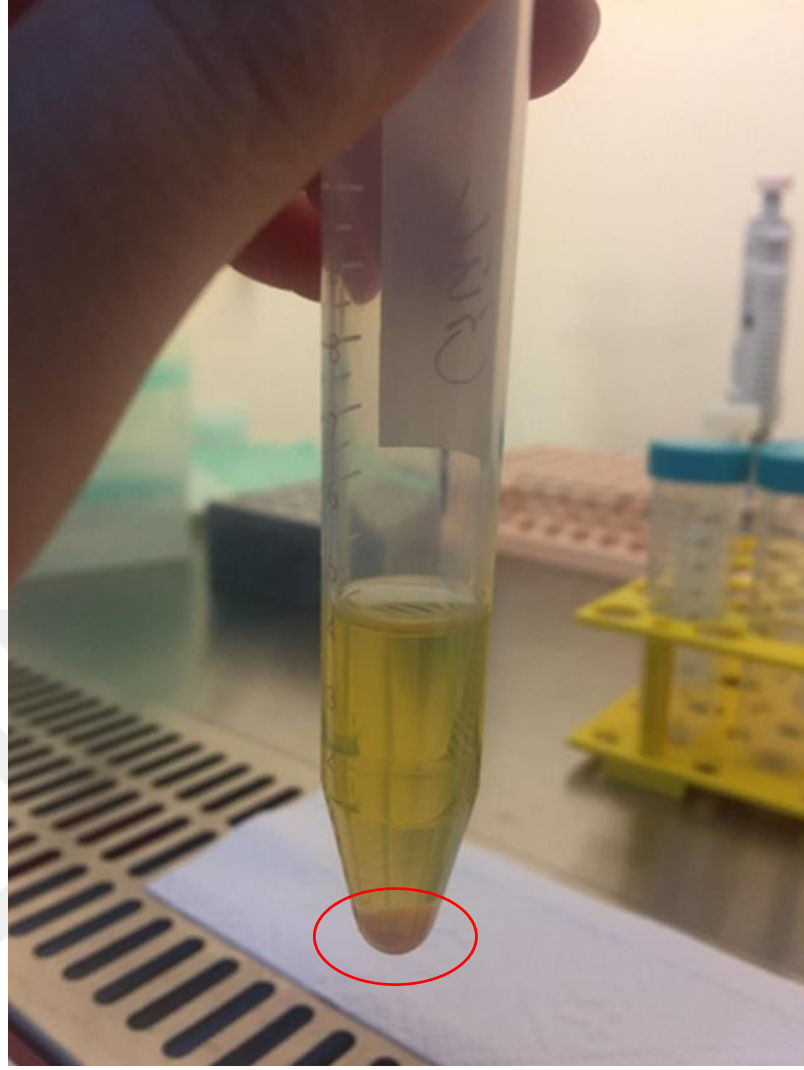
Resim 17: Aktivasyon için Trombositten Zengin Plazma' ya %10'luk CaCl_2 eklenmesi.



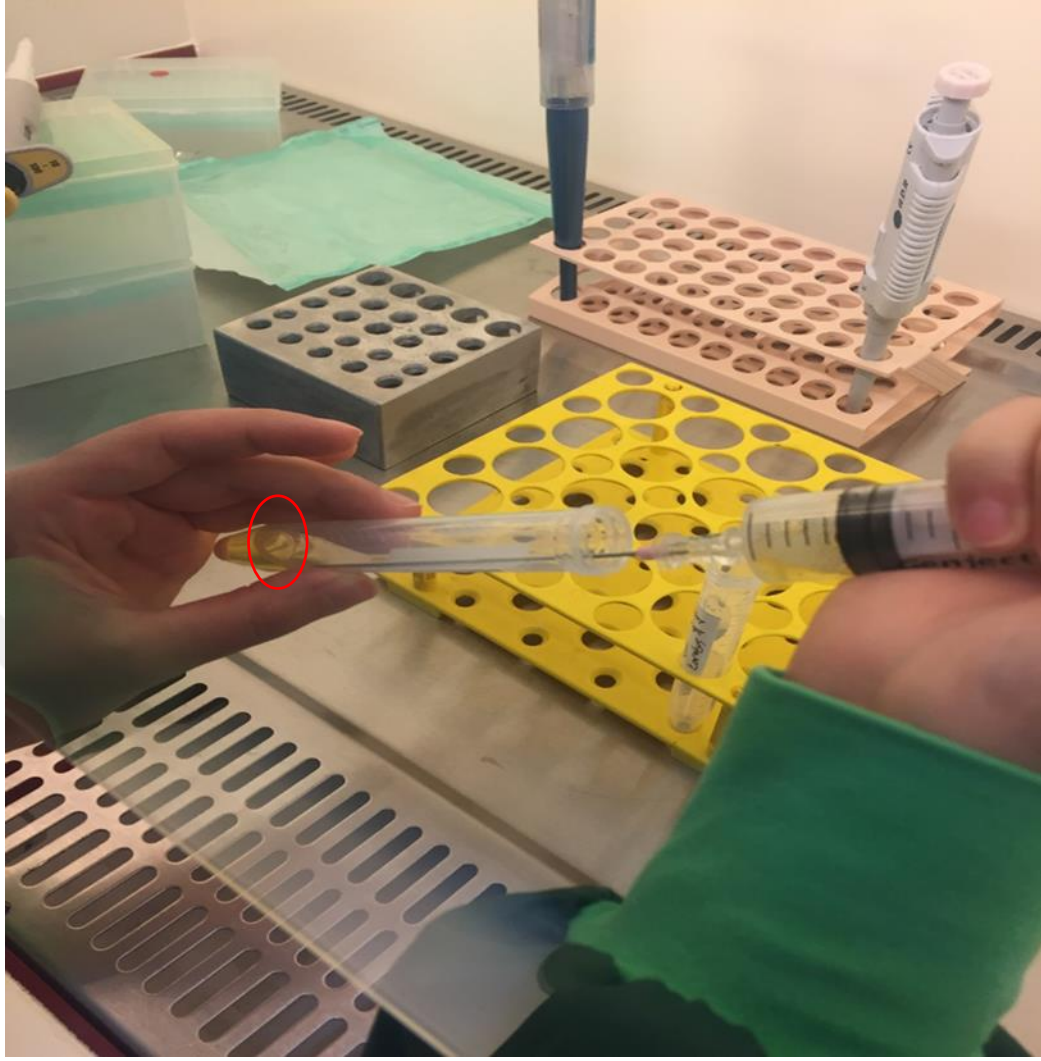
Resim 18: CaCl₂ eklenen plazmanın hafifçe çalkalanması.



Resim 19: Aktive TZP' nin jel formu.



Resim 20: Trombositlerin aktive edilmesi sonrası trombosit membranlarının altta pellet oluşturması ve üstte oluşan büyüme faktörü bulunduran plazma.



Resim 21: Pelleti yerinden oynatmadan A-TZP'nin alınması.



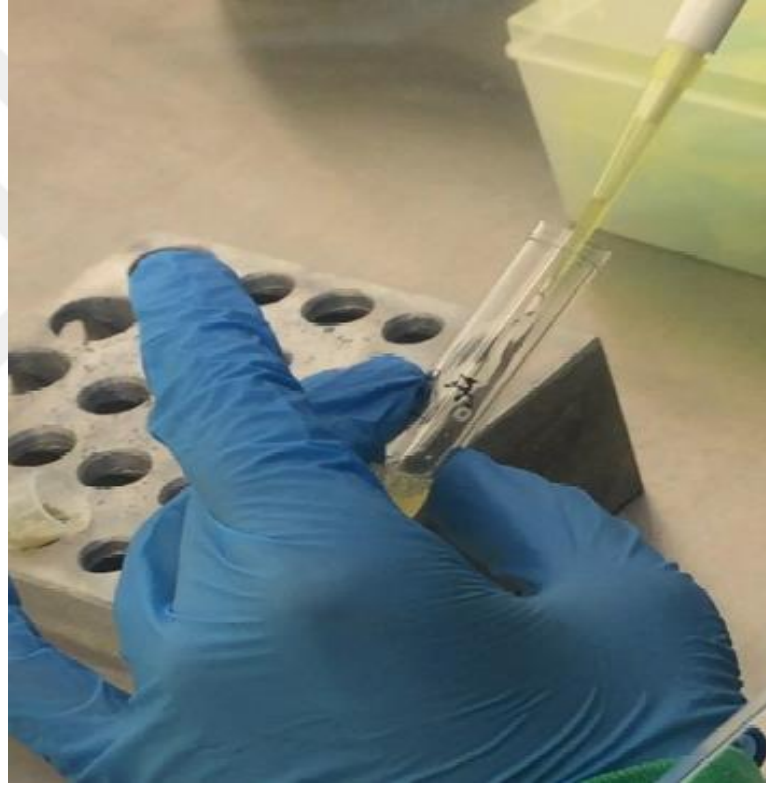
Resim 22: A-TZP'nin 1,5 ml'lik eppendorf tüplere dondurulmak üzere aktarılmış hali.

3.4. Semen Örneklerinin Swim-up tekniği ile yüzdürülmesi

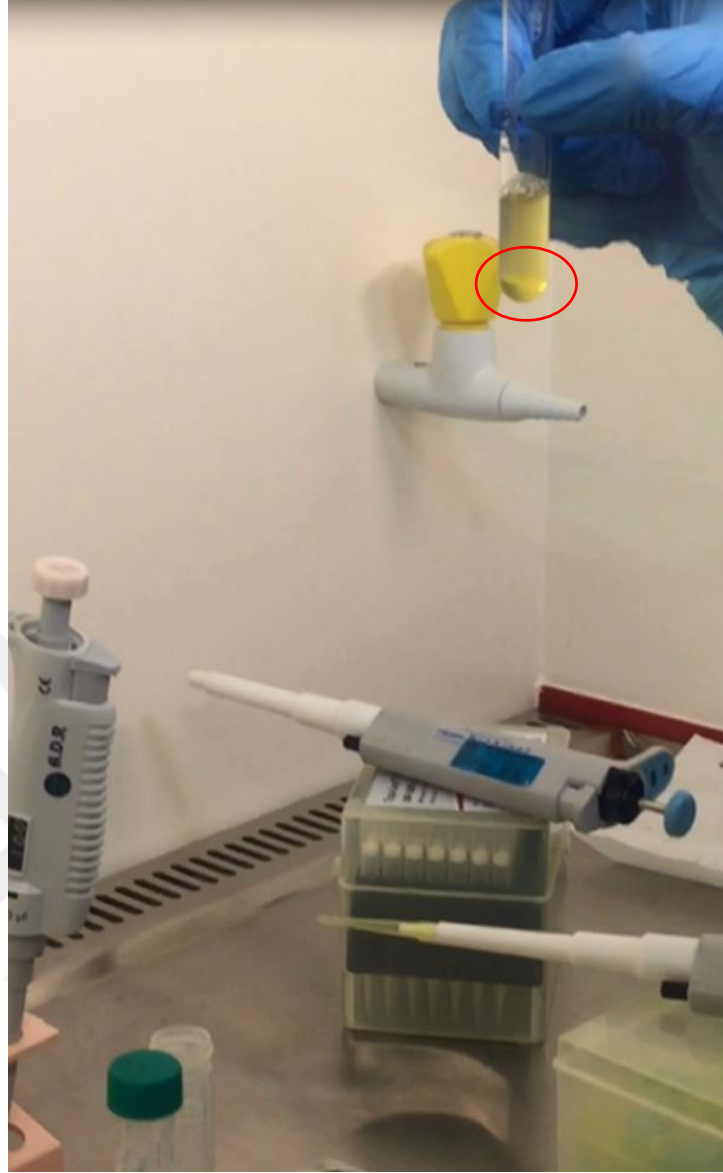
Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımlı Üreme Teknikleri Ünitesine spermogram amacıyla başvurmuş, en az 3 günlük cinsel perhizi olan hastalardan onayı alınan hastalar çalışmaya dahil edilmiş, rutin spermogram testi yapıldıktan sonra örnekler araştırma amaçlı kullanılmıştır. Çalışmada likefiye olmuş semen numuneleri eşit hacimlerde ikiye ayrılmış, Ham (raw) ve TZP ile muamele edilecek iki grup oluşturulmuştur. TZP grubu için 900 µl semen alınıp, örneklere 1:1 oranında PBS eklenip homojenize edilmiştir. Daha sonra semen 1500 devirde 10 dk santrifüj edilip, süpernatant atılmış ve örneğin sperm konsantrasyonuna bağlı olarak pellet üzerine 200-600 µl Trombositten Zengin Plazma (TZP) eklenip homojenize edilmiştir. Homojenize spermlerin üzerine yine konsantrasyona göre 300-500 µl TZP 45°'lik açı ile sızdırılıp katman oluşturacak şekilde bırakılmıştır. İşlem sonrası örnekler 37°C'lik inkübatörde 45°'lik açılı spora 45 dk bırakılmış ve bu süre

içerisinde spermilerin üstteki katmana yüzmesi beklenmiştir. 15-30 ve 45. dk'da üstteki katmandan 10 µl örnek alınarak makler sayım kamerasında sayı ve motilite analizleri yapacaktık fakat tahminlerimizin tersine çalıştığımız her hastada TZP üstte bir katman oluşturmayıp katman alta inmiştir. Bu nedenle “yüzen” spermilere ulaşmak için en altta TZP katmanından dikkatlice ve katmanı sarsmadan spermeleri 10 µl kadar analiz amaçlı aldık. 15-30-45. dk analizlerini alta inen katmanda yüzen spermilerden yaptık.

Tüm verilerin karşılaştırılmasında ve analizlerinin yapılmasında SAS University Edition 9.4 programı kullanıldı.



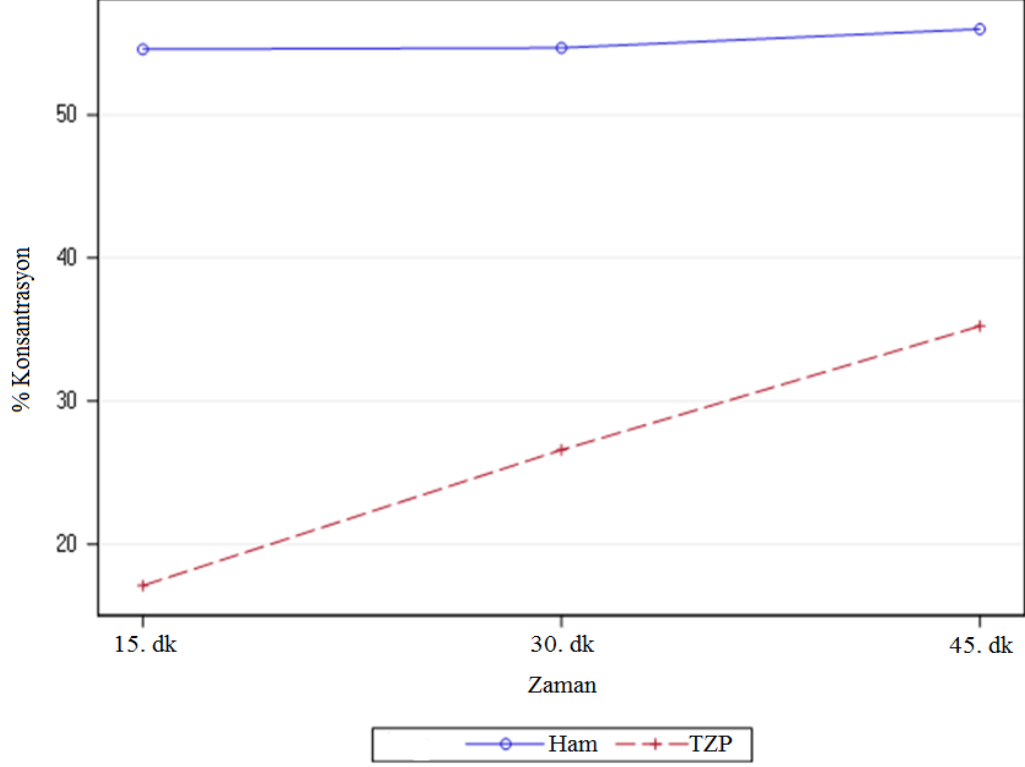
Resim 23: Trombositten zengin plazmanın üstte katman oluşturmak amaçlı 45°'lik açı ile tüpün kenarından sızdırılması.



Resim 24: Sızdırma işlemi sonrası kendiliğinden alta inen trombositten zengin plazma katmanı.

4. BULGULAR

Grafik 1: Konsantrasyonun semenin Ham ve TZP ile muamele edilen halinde zamana bağlı değişimi



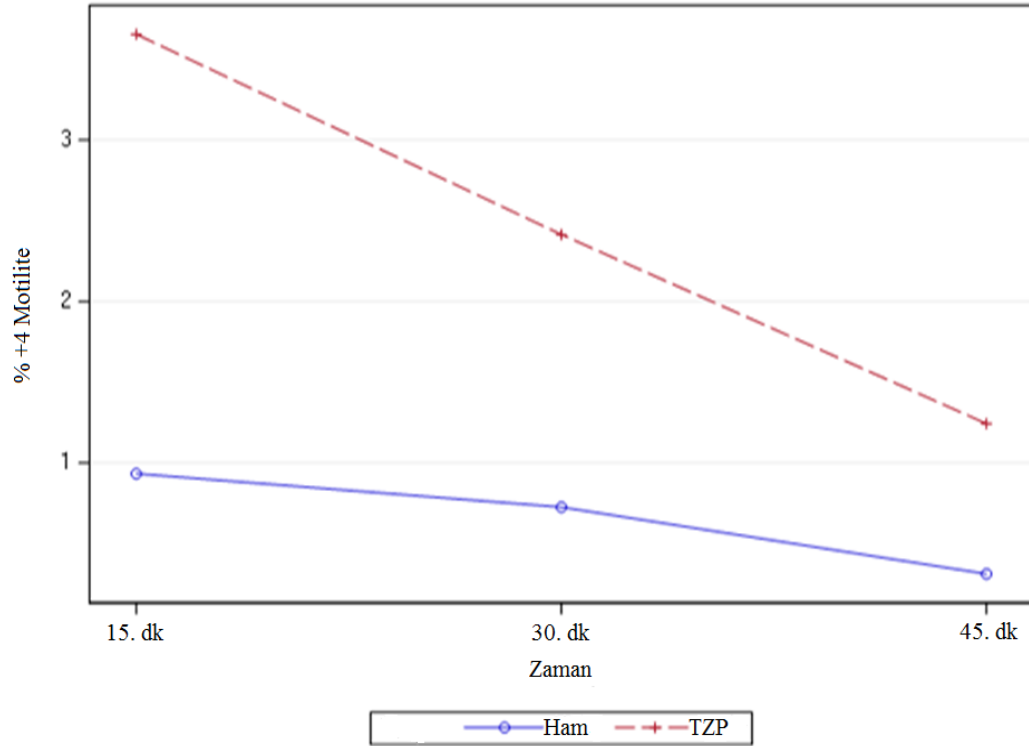
Burada elde edilen bulgumuza göre semenin ham halinin konsantrasyonunda anlamlı bir değişme olmamışken TZP ile muamele edilen örneklerde zamana bağlı olarak konsantrasyon artmıştır.

Tablo 3: Semen'in Ham ve TZP ile muamele edilen halinin konsantrasyonlarının birbiriyle karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
15. dk	HAM	TZP	37.4828	4.5988	112	8.15	<.0001	<.0001
30. dk	HAM	TZP	28.1034	4.5988	112	6.11	<.0001	<.0001
45. dk	HAM	TZP	20.7586	4.5988	112	4.51	<.0001	<.0001

Konsantrasyon analizinde grup, zaman, grup-zaman etkisi <0.001 olduğu yani $p < 0.05$ 'ten küçük olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur.

Grafik 2: +4 motilite değerinin semenin Ham ve TZP ile muamele halinde zamana bağlı değişimi



Grafiğe gore semenin ham hali ile TZP ile muamele edilmiş halinde zamana bağlı olarak +4 motiliteye sahip spermiler azalmış, fakat bu azalmaya rağmen TZP grubu +4 motilite yonunden ham haline gore her uç zamanda da uştn gelmiştir.

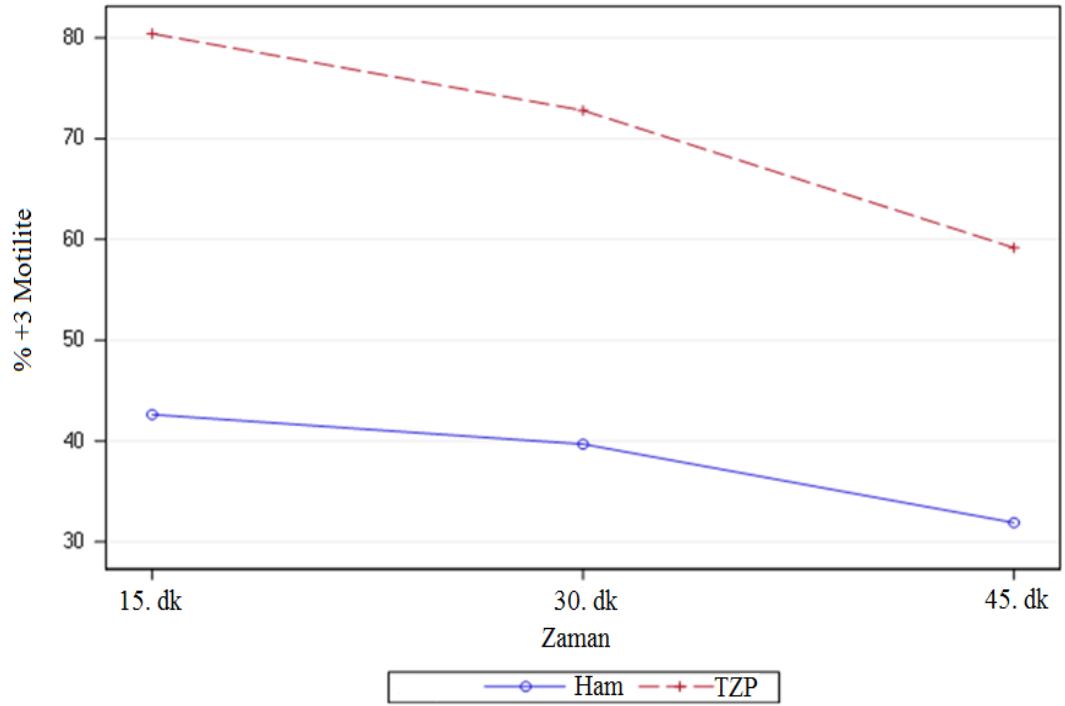
Tablo 4: Ham ve TZP grubunun +4 motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
15. dk	HAM	TZP	-2.7241	0.5434	112	-5.01	<.0001	<.0001
30. dk	HAM	TZP	-1.6897	0.5434	112	-3.11	0.0024	0.0024
45. dk	HAM	TZP	-0.9310	0.5434	112	-1.71	0.0894	0.0894

+4 motilite analizinde grup, zaman, grup-zaman etkisi $p < 0.05$ 'den kuk olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur.

Grafikte ilk 15 dk'da TZP grubu Ham gruba gore +3 motiliye sahip spermilerde neredeyse %50 fark ile daha uştn gelmiştir. Bu uştnlk diğer iki zaman aralığında da devam etmiştir.

Grafik 3: +3 motilite değerinin Ham ve TZP grubu olarak zamana bağlı değişimi

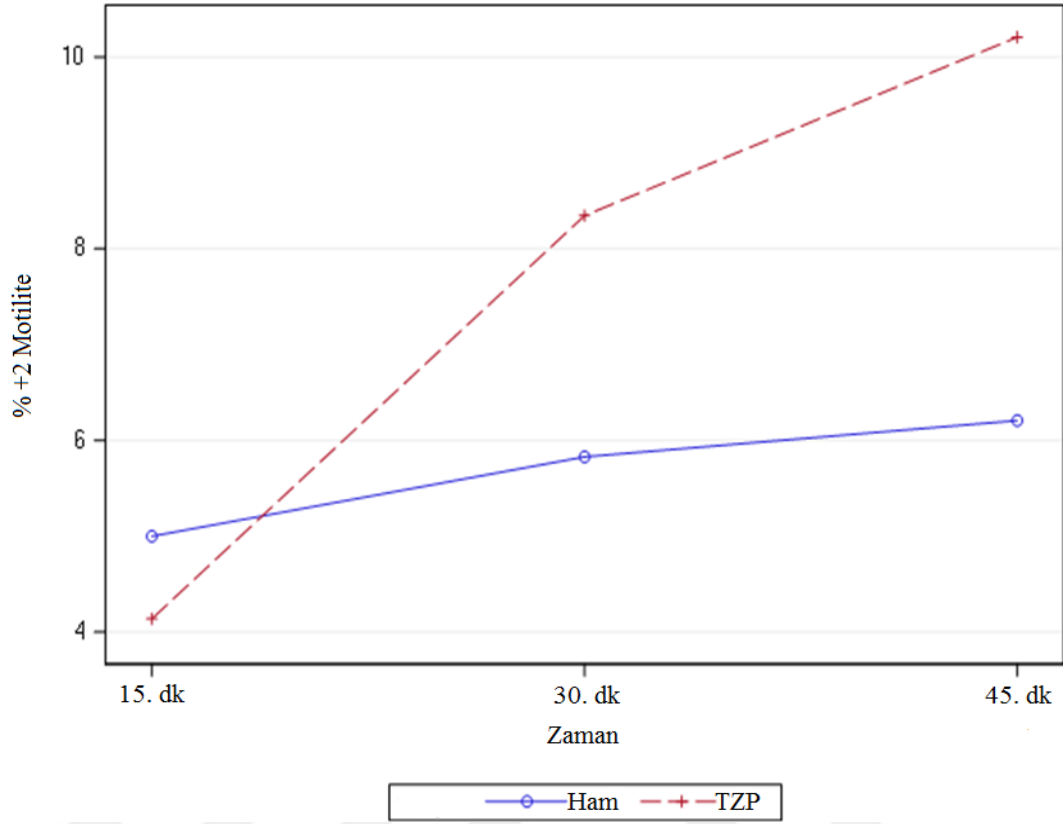


Tablo 5: Ham ve TZP grubunun +3 motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
15. dk	HAM	TZP	-37.7931	3.7418	112	-10.10	<.0001	<.0001
30. dk	HAM	TZP	-33.1034	3.7418	112	-8.85	<.0001	<.0001
45. dk	HAM	TZP	-27.2759	3.7418	112	-7.29	<.0001	<.0001

+3 motilite analizinde grup, zaman, grup-zaman etkisi $p < 0.05$ 'den küçük olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur.

Grafik 4: +2 motilite değerinin Ham ve TZP grubu olarak zamana bağlı değişimi



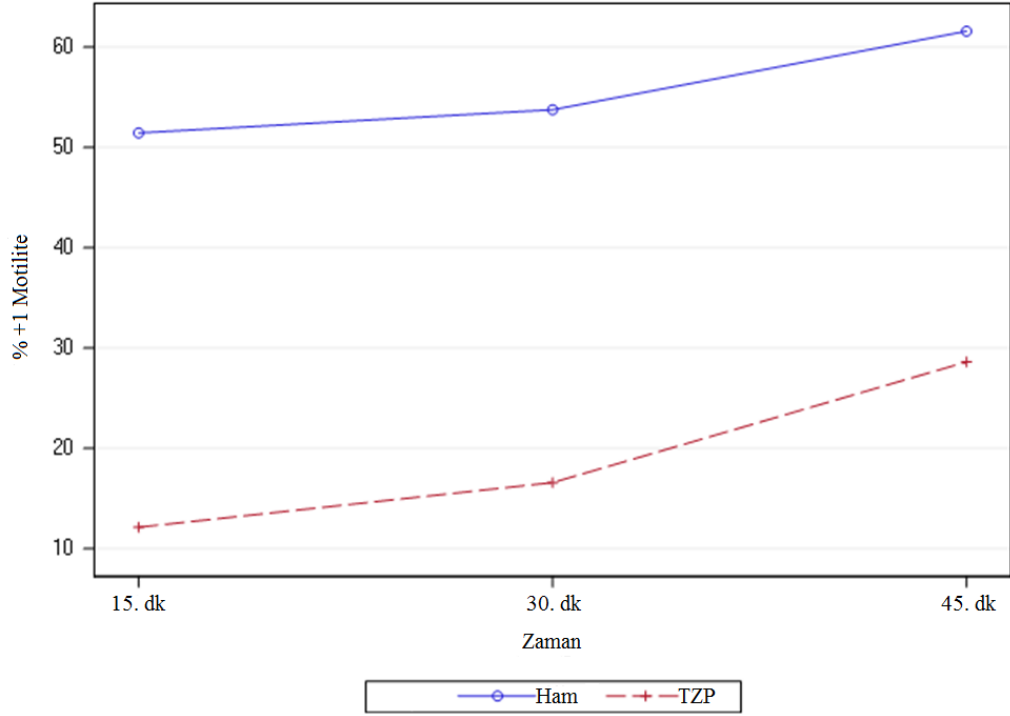
Elde ettiğimiz bu bulguda semenin ham halinde ilk 15 dakikada +2 motiliteye sahip spermeler daha fazla iken zaman arttıkça TZP grubu +2 motiliye sahip spermeler yönünden daha nde bulunmaktadır.

Tablo 6: Ham ve TZP grubunun +2 motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
15. dk	HAM	TZP	0.8621	1.4935	112	0.58	0.5650	0.5650
30. dk	HAM	TZP	-2.5172	1.4935	112	-1.69	0.0947	0.0947
45. dk	HAM	TZP	-4.0000	1.4935	112	-2.68	0.0085	0.0085

+2 motilite analizinde grup etkisi $p=0.12$ yani $p>0.05$ ' den büyük olduğu için anlamlı bulunmamıştır. Zaman, grup-zaman etkisi $p<0.05$ ' den küçük olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur.

Grafik 5: +1 motilite değerinin Ham ve TZP grubu olarak zamana bağlı değişimi



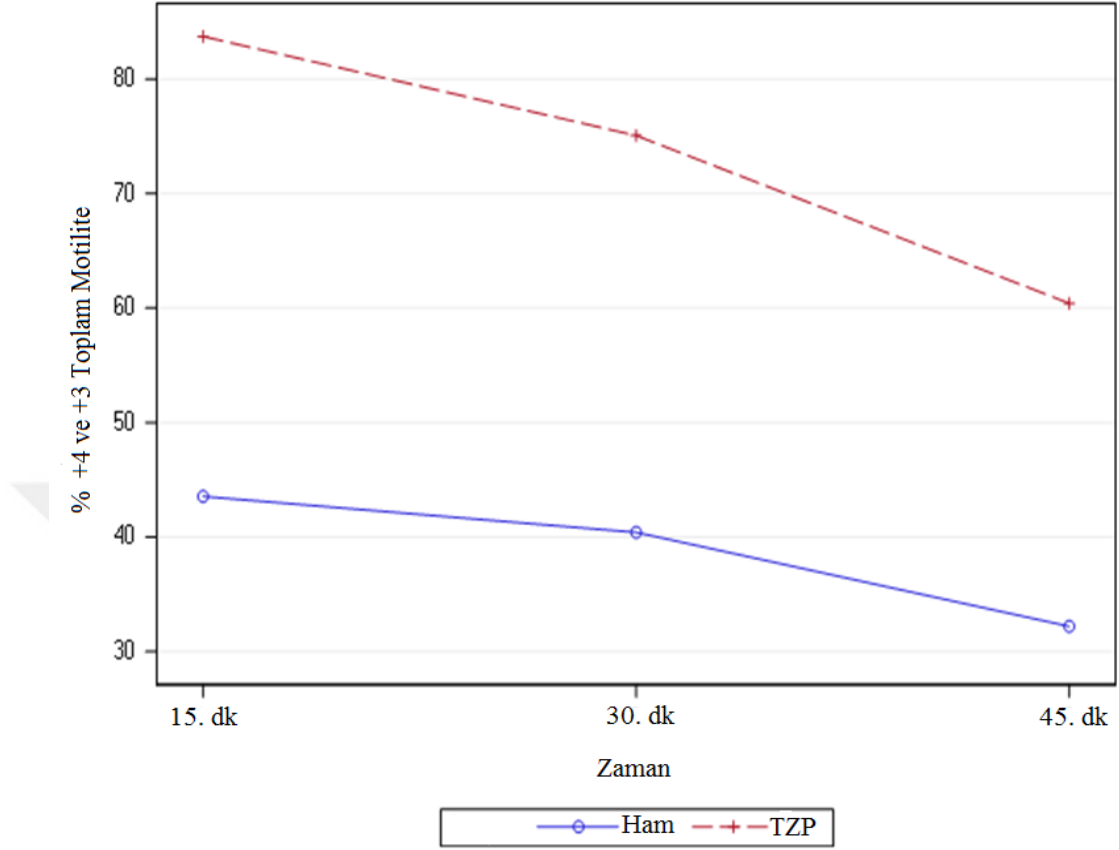
Grafiğe göre her ne kadar zamanla birlikte immotil yani +1 sperm artmış olsa da TZP grubu, semenin ham haline göre immotil sperm bakımından anlamlı oranda geridedir.

Tablo 7: Ham ve TZP grubunun +1 motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
15. dk	HAM	TZP	39.3103	3.7466	112	10.49	<.0001	<.0001
30. dk	HAM	TZP	37.1724	3.7466	112	9.92	<.0001	<.0001
45. dk	HAM	TZP	32.9655	3.7466	112	8.80	<.0001	<.0001

+1 motilite analizinde grup, zaman, grup-zaman etkisi $p < 0.05$ 'den küçük olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur.

Grafik 6: +3 ve +4 toplam motilite değerinin Ham ve TZP grubu olarak zamana bağlı değişimi



Bu grafikte toplam olarak +4 ve +3 motiliye sahip spermeler semenin ham hali ve TZP ile muamele edilmiş hali arasında kıyaslanmış, TZP grubu anlamlı oranda yüksek bulunmuştur.

Tablo 8: Ham ve TZP grubunun +3 ve +4 toplam motilite değerlerinin birbiriyle karşılaştırılması

Simple Effect Comparisons of Grup*Zaman Least Squares Means By Zaman Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer								
Simple Effect Level	Grup	Grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adj P
15. dk	HAM	TZP	-40.1724	3.6258	112	-11.08	<.0001	<.0001
30. dk	HAM	TZP	-34.6552	3.6258	112	-9.56	<.0001	<.0001
45. dk	HAM	TZP	-28.2069	3.6258	112	-7.78	<.0001	<.0001

+4 ve +3 toplam motilite analizinde grup, zaman, grup-zaman etkisi $p < 0.05$ 'den küçük olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Günümüzde üreme yaşında olan çiftlerin yaklaşık %10'u- %15'i bir gebelik sağlayamamakta ve infertil olarak değerlendirilmektedir. İnfertilite vakalarının ise yaklaşık %30-50'si erkek infertilitesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle erkek infertilitesinde tanı ve tedavi yöntemleri daha da önem kazanmıştır. Genel olarak infertil bir erkeğin semen parametrelerinde en önemli faktörlerden birinin motilite olduğu bilinmektedir. Çünkü ister IUI ister ICSI uygulaması olsun, motil sperm canlılığının hem önemli bir göstergesidir hem de tüm YÜT tedavi yöntemlerinde dikkate alınan ilk parametrelerden biridir.

Literatürde yer alan bilgilere göre swim-up metodu, kullanılan farklı sperm hazırlama teknikleri ile karşılaştırıldığında hazırlanması basittir, reaktif oksijen türleri oluşumunu engeller ve DNA bütünlüğünün korumaktadır. Bu bakımdan kullanışlı bir yöntem olmuştur. Bu nedenle çalışmamızda swim-up metodunu kullandık. Çalışmamızda farklı bir medium ile hazırlanan ve swim-up tekniği kullanılan kontrol grubu oluşturmadık. Yapılan çalışmalarda farklı markaların sperm hazırlama mediumları swim-up tekniği kullanılarak karşılaştırılmış olup, farklı mediumların farklı sonuçlar ortaya koyduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bu tekniğin standart hale gelmiş olmasından, biz de Trombositten Zengin Plazma'nın etkinliğini araştırmaya odaklandık (Anbari ve ark. 2016; Delilbaşı 2008).

Trombositten zengin plazma hazırlanmasında $CaCl_2$ ile trombositleri aktifleştirme yöntemini tercih ettik. Literatürde yer alan birçok çalışma $CaCl_2$ patlatılan TZP'lerde daha fazla büyüme faktörünün ortaya çıktığını göstermiştir. Farklı bir patlatma yöntemi ise trombositleri soğuk-sıcak şokuna uğratarak büyüme faktörlerinin açığa çıkarılması şeklindedir. $CaCl_2$ ilavesi yapılan ve soğuk-sıcak şokuna uğratarak hazırlanan TZP kombinasyonlarında ise daha fazla büyüme faktörünün açığa çıktığı bilinmektedir (Roffi ve ark. 2014).

TZP ile ilgili farklı alanlarda tedavi edici araştırmalar yapıldığı görülmektedir. Bugüne kadar TZP'nin ortopedi, plastik ve rekonstrüktif cerrahi, diş hekimliği ve jinekoloji gibi farklı alanlarda kullanım bulunduğunu bilmekteyiz. a-TZP'nin bu alanlarda kullanım bulması ise içerdiği büyüme faktörlerine dayanmaktadır. Bu büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi, doku jenerasyonu, progenitör hücrelerin

tetiklenmesi gibi farklı fonksiyonları olduğu düşünülmektedir (Turan ve ark. 2011). Bizim bu çalışmadaki amacımız ise swim-up tekniğiyle hazırlanacak semen örneklerinde TZP'nin fonksiyonunun anlaşılması ve olumlu etkileri olduğu takdirde YÜT tedavilerine sunabileceği avantajları değerlendirmek olmuştur.

Çalışmaya başladığımızda literatürde TZP'nin doğrudan semen üzerine etkilerini araştıran hiçbir kaynak bulunmamaktaydı. Fakat 12 Mayıs 2019'da Andrology dergisinde yayımlanan bir makalede (Bader ve ark. 2019) H₂O₂ kaynaklı oksidatif strese uğratılmış insan sperm hücrelerinde otolog TZP'nin in vitro etkisini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre H₂O₂ sperm hücreleri üzerinde zararlı etkiler göstermiştir. Fakat %2'lik TZP tedavisi, strese uğrayan çalışma grubunda ROS-pozitif hücrelerde, DNA fragmantasyonunda, vakuolizasyonda ve ölü hücreler üzerinde TZP olmayan gruba göre önemli düşüş göstermiş, yine TZP tedavisi uygulanan grupta özellikle progresif ve toplam motilitede ciddi artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlar yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz motilite bulgularını desteklemektedir.

TZP ile ilgili doğrudan sperm işleme prosedürü üzerine uygulanan başka bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat TZP'nin testis üzerine etkilerini inceleyen, TZP içinde bulunduğunu bildiğimiz büyüme faktörlerinin tek başına sperm ve oosit hücreleri üzerinde etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda da olsa kaynak bulunmaktadır. Bilhassa bu büyüme faktörlerinin ayrı ayrı incelendiği çalışmaların araştırmamızı destekler nitelikte olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü TZP, ayrı ayrı incelenmiş bu büyüme faktörlerini yüksek konsantrasyonda kendi içinde barındırmaktadır.

İyibozkurt ve ark. (2009), yaptıkları bir çalışmada VEGF'nin sperm motilite ve canlılığı üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmada, insan spermi için 5,10,15 ve 20 ng/ml konsantrasyonlarda VEGF kullanılmış, maksimum etkinin 15 ng/ml'de olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmaya göre VEGF'e maruz kalan spermatozoada anlamlı oranda hız ve düz çizgi hızı artmıştır. VEGF'e maruz kalan spermlerde canlılık süresi de uzamıştır. Kısaca VEGF'nin insan sperminde motilite ve viabiliteye olumlu sonuçları olmuştur. (Bader ve ark. 2019) ise TZP ile yapmış oldukları çalışmada öncelikle farklı TZP konsantrasyonlarını değerlendirip, ideal konsantrasyonun %2 olduğunu belirtmişlerdir. Biz ise çalışmamızda saf TZP kullandık ve kontrol grubuna kıyasla deney grubunda ciddi motilite artışı gözlemledik.

Caries ve ark. (2009), ise boğalarda testis gelişimi sırasında VEGF-A'nın fonksiyonunu araştırmışlardır. Araştırma, eksplant doku kültürleri ile yapılmış olup VEGF-A'nın bulunduğu deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı oranda artmış germ hücreleri gözlemlenmiştir. Aynı zamanda kültür esnasında real-time PCR yapılmış, hücre ölümü ile ilgili gen ekspresyonlarının VEGF tedavisi boyunca düşüş gösterdiği bulunmuştur. Yine bununla birlikte VEGF aktivitesi baskılanıp 120 saat sonunda kontrol edildiğinde ise germ hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre VEGF hücre sağ kalımı ve sperm üretimi üzerinde etkilidir.

Artini ve ark. (2008), ise insan embriyoları kültür ortamında iken ICSI yapıldıktan sonra, pronükleer aşamada ve blastosit evresinde VEGF seviyelerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda embriyoların blastosit aşamasında iken önemli oranda VEGF sentezi yaptığını göstermiştir.

Bir başka çalışmada (Obermair ve ark. 1999) seminal sıvıdaki VEGF konsantrasyonlarını ve sperm üzerinde VEGF reseptör varlığını araştırmışlardır. Araştırmaya göre seminal sıvıda 2-100 ng/ml VEGF olan hastaların 6 kat daha fazla gebelik şansı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Fakat VEGF erkek faktörlü kısırlık indeksi ile ilişkili bulunmamıştır. Aynı zamanda spermatozoa üzerinde VEGF reseptörlerinin ekspresyonu tesbit edilmiştir.

Spelekova ve ark. (2011), ise yaptıkları araştırmada sıçan ejakülatlarına EGF ilave etmiş, işlem sonunda 24,48 ve 72 saat sonrası motilite parametrelerini kontrol etmiştir. EGF'nin etkisi ilk 30 dk'dan sonra gözlemlenmiştir. EGF sıçan sperm motilitesinde önemli bir etki göstermiş ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda ise en yüksek progresif motiliteye ulaşılmıştır. Sonuç olarak EGF'e maruziyet süresi ve EGF konsantrasyonu sperm motilite parametreleri üzerinde önemli etkilere sahiptir. Biz ise yaptığımız araştırmada inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte TZP katmanına immotil spermelerin daha fazla ulaştığını gözlemledik. Bunun nedeni kullandığımız metod ile ilişkili olabilir. Yayınlanmamış verilere göre TZP ile basit yıkama yapılarak hazırlanan semen örneklerinde inkübasyon süresinin artışı motiliteyi olumlu yönde etkilemiştir.

Shin ve ark. (2014), köpek sperminin depolama amaçlı dondurulup çözündürülme esnasında IGF-I'nin işlevini araştırmışlardır. Araştırmaya göre, IGF-I dondurma-çözme sonucu sperm plazma zar bütünlüğü ve morfoloji üzerine bir etki göstermemiştir. Ancak IGF-I'nin mitokondriyal membran potansiyelini koruduğu ve donma-çözme işleminin sperm motilisine olumsuz etkilerini minimize ettiği bulunmuştur.

Luo ve ark. (2002), VEGF'nin sığır oositlerinin matürasyonu üzerine etkisini araştırmış, VEGF ile muamele edilen oositlerin maturasyonunda VEGF'nin önemli etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Chang ve ark. (2015), IVF tedavisine başlanmış, fakat düşük endometrium kalınlığı (≤ 7 mm) nedeniyle embriyo transferi ertelenmiş 5 kadında TZP'nin endometrium üzerine etkilerini incelemiştir. IVF tedavisine başlanan hastalara standart hormon replasman tedavisi (HRT) uygulanmış, yetersiz endometrium kalınlığı sonucu tedaviye ek olarak otolog TZP uterus boşluğuna infüze edilmiştir. 72 saat sonrasında halen yeterli endometrium kalınlığına ulaşamayan hastalara infüzyon tekrarlanmıştır. TZP infüzyonu sonucu bütün hastalarda başarılı endometrial genişleme ve gebelik gözlemlendiği kaydedilmiştir. Bu çalışmaya göre TZP, endometrial kalınlaşmayı desteklemektedir.

Farklı çalışmalarda ise Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) ve sperm parametreleri arasındaki ilişkiler incelenmiş, PAF'ın sperm motilitesini olumlu yönde etkilediği söylenmiştir. PAF, trombosit aktivasyonunda rol alan bir fosfolipittir ve hücre içi kalsiyumu artıran yüzey özel reseptörleri ile önemli fonksiyona sahiptir (Grigoriou ve ark. 2005). Bilindiği gibi trombositlerin aktive olması ile trombositlerden büyüme faktörü sekresyonu başlamaktadır. PAF-sperm ilişkisinin incelendiği çalışmalar sonucu artan motilite değerleri ise bize kendi çalışmamızla ilgili olarak büyüme faktörlerinin devreye giriyor olabileceğini ve bu sayede sperm motilitesinde olumlu sonuçlar geliştiğini düşündürmüştür.

Elde edilen bu bilgiler ışığında, Trombositten Zengin Plazma ile hazırlanan sperm örneklerinin hem sperm üzerine hem de implantasyon üzerine olumlu sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışma, TZP'nin sperm motilitesini önemli oranda olumlu etkilediğini göstermiştir. Biz bu olumlu etkinin özellikle Intra Uterin

İnseminasyon (IUI) tedavisi gören hastalarda etkili olabileceğini düşünüyoruz. Çünkü hem büyüme faktörleri ile yapılmış çalışmalar, hem de doğrudan a-TZP'yi kullanmış olduğumuz kendi çalışmamız sperm üzerine olumlu etkiler göstermişken, Yajie ve arkadaşları TZP'nin endometrium büyümesini ve implantasyonu desteklediğini göstermiştir. Bu bilgiler bize IUI hastalarında sperm motilitesinin artması ve endometriumun implantasyona hazırlanması bakımından TZP'nin oldukça efektif olacağını düşündürmüştür.

IUI tedavisi gören hastalar için TZP'nin bir diğer olumlu etkisi ise bunun “ev tipi aşılama”ya dönüşebilecek olmasıdır. Yapılan birçok çalışma, IUI ve IVF tedavisi gören erkeklerde tedavi öncesi test amaçlı verilen sperm örnekleri ile tedavi günü verilen sperm örnekleri arasında önemli fark oluştuğunu göstermiştir. Bu fark negatif yönde olup strese bağlı olduğu düşünülmüştür (Harrison ve ark. 1987). Araştırmalara göre stres faktörleri arasındaki en önemli etken klinikte sperm verme işlemidir. Eğer ev tipi aşılama tedavisi uygulanırsa çiftler kliniğe gelmenin neden olduğu stresten uzak kalmış olacaktır. Aynı zamanda TZP'nin sperm motilitesi üzerindeki olumlu etkisi ile sperm örneklerinin IUI tedavisine uygunluğunu sağlanabilecektir. Biz çalışmamızda sperm örneklerini swim-up tekniği ile hazırlanmasına karşın swim-down olarak sonuç alabilmiştik. Her iki teknik de “motilitesi en iyi olan”ı seçmeyi amaçladığından sonuç açısından bir olumsuzluk oluşturmamış oldu. Ev tipi veya laboratuvar olması farketmeksizin, yaptığımız yüzdürme metodunun IUI başarısını artıracaklarını düşünmekteyiz. Çünkü bu metotda yalnızca motil spermeler elde edilir ve immotil spermelerden ayrılmış olur. Aynı zamanda hareketli spermeler altta yer alan katmana yüzeceğinden spermeler seminal sıvıdan ayrılır ve bu da uterusu meydana gelebilecek kasılmaların önüne geçmiş olur. Böylece hastaya yalnızca fertilitte özelliği kazanmış ve seminal plazmadan uzak motil spermeler verilmiş olacaktır. Metodun uygulanması da ev tipi aşılama için kolaylıkla yapılabilecektir.

Yine elde ettiğimiz bulgular ve literatür taramamız ışığında TZP'nin ICSI yapılacak sperm ve oositler üzerinde de olumlu sonuçlar verebileceğini düşünmekteyiz. Çünkü tek başına VEGF'nin oosit matürasyonu ve embriyo kültürü üzerinde önemli etkisi olduğu kaydedilmiştir. Oysa TZP, içeriğinde yalnızca VEGF'yi değil, bunun dışındaki birçok büyüme faktörünü ihtiva etmektedir. Çalışmamızda TZP ile

hazırlanan sperm örnekleri motilite bakımından kontrol grubuna göre daha öndedir. TZP'nin ICSI işlemi uygulanacak hastalarda da kullanım bulmasını düşünmeliyiz.

Aynı zamanda Trombositten Zengin Plazma'nın ozmolaritesi ve pH'sı, rutinde kullanılan sperm yıkama mediumlarının ozmolarite ve pH'sına uyumludur. TZP'nin ozmolaritesi 275-299 mOsm/lit iken standart yıkama mediumlarının ozmolaritesi ise 290-300 mOsm/lit'dir. Ve pH aralığı da 7.2-7.4 olduğundan normal yıkama mediumlarının pH'sı ile uyumludur. Bu değerler bize TZP'nin normal fizyolojik yıkamaya uygun olabileceğini ve yardımcı üreme tedavilerinde güvenle kullanılabileceğini düşündürmüştür.

The screenshot shows a PubMed search results page. The search query is 'Platelet Rich Plasma and Sperm'. The results are sorted by 'Most recent' and show two items. The first item is 'In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H₂O₂-induced oxidative stress in human spermatozoa' by Bader R, Ibrahim JN, Moussa M, Mourad A, Azoury J, Alaaeddine N. The second item is 'The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan' by Dehghani F, Soloude N, Bordbar H, Panjeshahin MR, Karbalay-Doust S. The page also includes filters for article types, text availability, and publication dates, as well as a search details section showing the search query: '("platelet-rich plasma"[MeSH Terms] OR ("platelet-rich"[All Fields] AND "plasma"[All Fields]) OR "platelet-rich plasma"[All Fields] OR ("platelet"[All Fields] AND "rich"'))'.

Resim 25: Pubmed üzerinden yapılan ‘‘Trombositten Zengin Plazma ve Sperm’’ başlıklı kaynak taraması (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Platelet+Rich+Plasma+and+Sperm 14.05.2019).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Swim-up tekniği ile hazırlanan semen örneklerinde Trombositten Zengin Plazmanın Etkisinin Değerlendirilmesi başlıklı çalışmamızda elde edilen sonuçlar ve önerilerimiz kısaca şu şekildedir:

1. Trombositten Zengin Plazma sperm motilitesini olumlu yönde etkilemekte olup raw (ham) hali ile kıyaslandığında en fazla fark gösteren motilite grubu +3 hıza sahip spermelerde olmuştur.
2. Trombositten Zengin Plazma, sperm hazırlama için alternatif bir supplement olabilir.
3. Trombositten Zengin Plazma, spermde motilite artışını sağlamaktadır ve bu nedenle ev tipi aşılama yönteminde avantaj sağlayabilecek bir sperm hazırlama solüsyonu olabilir.
4. Trombositten Zengin Plazma'nın sperm parametreleri üzerine olan etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı metodların da kullanılacağı daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Aghajanova L, Houshdaran S, Balayan S, Manvelyan E, Irwin JC, Huddleston HG, & Giudice LC. In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2018; 35(5), 757-70.
- Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Ski Appendage Disord*. 2018:18-24.
- Anbari F, Halvaei I, Nabi A, Ghazali S, Khalili M. A, & Johansson L. The quality of sperm preparation medium affects the motility, viability, and DNA integrity of human spermatozoa. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 2016; 9(4), 254.
- Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013; 4:67.
- Aras İ. Erkek infertilitesinde semen parametreleri ile sperm kromozom anöploidi sıklığı ilişkisinin araştırılması. Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2009 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cavit Can).
- Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: A literature review. *Implant Dent*. 2009;18(4):303-10.
- Artini PG, Valentino V, Monteleone P, Simi G, Parisen-Toldin MR, Cristello F, Cela V, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor level changes during human embryo development in culture medium. *Gynecol Endocrinol*. 2008; 24(4): 7-184.
- Bacic M, Edwards NA, Merrill MJ. Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues. *Growth Factors*. 1995;12(1):11-15.
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008; 16: 585-601.
- Beydola T, Sharma R K, Agarwal A. Sperm preparation and selection techniques. Chapter 29, Section 6. 2013;244-51.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*. 1997; 18(1): 26-45.
- Blum WF, Bottcher C, Wudy SA. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Diagnostics Endocr Funct Child Adolesc*. 2011;16(1): 157-182.
- Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- β in disease: The dark side of tissue repair. *J Clin Invest*. 1992; 90(1):1-7.
- Brown GL, Curtsinger LJ, White M, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β . *Ann Surg*. 1988; 208(6):788-94.
- Caires KC, de Avila J, McLean DJ. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction*. 2009; 138(4):667-77.
- Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertility and Sterility*. 2004; 82(2):358-66.
- Carlson NE, Roach RB. Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Asso*. 2002; 133: 1383-6.
- Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowen L, Lucato ML. The hypoosmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril*, 1996; 65:972.
- Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med*. 2011; 39: 266.
- Chang Y, Li J, Chen Y, Wei L, Yang X, Shi Y, Liang X, Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 15;8(1):1286-90.

- Colville-Nash PR, Willoughby DA. Growth factors in angiogenesis: Current interest and therapeutic potential. *Mol Med Today*. 1997; 3(1): 14-23.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*. 2010; 16(3): 231-45
- Costabile, R. *Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System*. M. Goldstein, P. N. Schlegel, M. Goldstein, ve P. N. Schlegel, *Surgical and Medical Management of Male Infertility*. New York, USA: Cambridge University Press. 2013; 1-7
- Cramer M, Meyer D. Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet α -granule resembling that of weibel palade bodies blood, 1985; Vol 66, No 3: 710-13
- Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2482-94.
- Delilbaşı, L. *In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni uygulamalar ve güncel yaklaşımlar)*. İn: Delilbaşı L. (eds). Ankara: Güneş Kitabevleri, 2008; 61-83.
- Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy- future or trend? *Arthritis Res Ther*. 2012; 14(4):1-10.
- Dhurat R, & Sukesh MS. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 2014; 7(4), 189.
- Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem*, 2011; 2, 11-17.
- Ferrari M, Zia S, Valbonesi M. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*. 1987;10: 50-47.
- Floege J, Eitner F, Alpers CE. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 12-23.
- Franken DR, & Oehninger S. Semen analysis and sperm function testing. *Asian Journal of Andrology*, 2012; 14(1), 6.
- Gerotziapas GT, Elalamy I, Lecrubier C, et al. The role of platelet factor 4 in platelet aggregation induced by the antibodies implicated in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood coagulation & fibrinolysis* 2001; 12(7):511-20.
- Grigoriou O, Makrakis E, Konidaris S, Hassiakos D, Papadias K, Baka S, & Creatsas G. Effect of sperm treatment with exogenous platelet-activating factor on the outcome of intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, 2005; 83(3), 618-20.
- Harrison KL, Callan VJ, Hennessey JF. Stress and semen quality in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*, 1987; 48(4): 633-6.
- Hughes GC, Biswas SS, Yin B, et al. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: Comparative effects of bFGF and VEGF. *Ann Thorac Surg*. 2004; 77(3):818-812.
- Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am*. 2004; 29(4): 551-63.
- <http://anatomysciences.com/sperm-diagram-by-human-body/sperm-diagram-by-human-body-whats-the-function-of-a-sperm-cell-definition-structure/> (15.05.2019).
- <https://ib.bioninja.com.au/higher-level/topic-11-animal-physiology/114-sexual-reproduction/human-fertilization.html> (15.05.2019).
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Platelet+Rich+Plasma+and+Sperm>
- <https://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-morfologia-de-los-espermatozoides/> (15.05.2019).
- <https://www.sunflowerhospital.in/sperm-washing-technic.php> 18.05.2019
- Iyibozkurt AC, Balcik P, Bulgurcuoglu S, Arslan BK, Attar R, Attar E. Effect of vascular endothelial growth factor on sperm motility and survival. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19(6):784-8.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Temel Histoloji*. İn: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B, ed. 8. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi. 1998.

- Kadioğlu, A. WHO Laboratuvar El Kitabı. İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. Türk Üroloji Derneği, 2011; 1-50.
- Kark LR, Karp JM, & Davies JE. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clinical oral implants research*, 2006; 17(3), 321-27.
- Kayıkçı MA, Çam HK, Akman Y, Erol A. Erkek infertilitesini değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce Tıp Fakóltesi Dergisi*, 2002, 4:35-38.
- Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; 531-64.
- Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chang J. Flexor tendon healing in 73 vitro: Effects of TGF- β on tendon cell collagen production. *J Hand Surg Am*. 2002; 27(4):615-20.
- Kubota S, Kawata K, Yanagita T, Doi H, Kitoh T, Takigawa M. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. *J Biochem*. 2004; 136(3): 279-82.
- Kuyucu F. Oligoastenospermik infertil hastalarda varikosel saptanan ve varikosel saptanmayan grupların mitokondrial DNA delesyonlarının araştırılması. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Üroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Elazığ, 2006. (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Arlan Ardiçođlu).
- Luo H, Kimura K, Aoki M, Hirako M, Effect of vascular endothelial growth factor on maturation, fertilization and developmental competence of bovine oocytes. *J Vet Med Sci*. 2002; 64(9):803-6.
- Machin SJ, Keenan JP, McVerry BA. Defective Platelet aggregation to the calcium ionophore in a patient with a lifelong bleeding disorder. *J Clin Pathol*. 1983; 36(10):1140-44.
- Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant dentistry*, 2001; 10(4), 225-28.
- McLachlan RI, Baker HG, Clarke GN, Harrison KL, Matson PL, Holden CA, et al. Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology*. 2003; 35(1): 25-33.
- Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF. Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. *J Clin Invest*. 1991; 87(2): 694-703.
- Nakamura N, Shino K, Natsuume T, et al. Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Ther*. 1998; 5(9):1165-70.
- Natali I. Sperm preparation techniques for artificial insemination - comparison of sperm washing, swim up, and density gradient centrifugation methods, artificial insemination in farm animals, Dr. Milad Manafi (Ed.), <http://www.intechopen.com/books/artificialinsemination-in-farm-animals/sperm-preparation-techniques-for-artificial-insemination-comparison-of-spermwashing-swimup-and-den>. 2011. (13.10.2014).
- Obermair A, Obruca A, Pöhl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, Wojta J, Feichtinger W. Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertil Steril*. 1999;72(2): 269-75.
- Ok E. Asthenozoospermia olgularında semen analizi ve sperm defektlerinin faz kontrast mikroskobu ile ortaya konması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, 2005. (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Doğan Özyurt).
- Özdener H. Semen Analizi: Morfolojik Yaklaşım. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 1993, 13(5):417-408.
- Öztaş, E. Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Gliklazid ve Atorvastatin Kombinasyon Tedavisinin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji A.B.D. Doktora Tezi, İstanbul, 2016. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gül Özhan; Doç. Dr. Emine Elif Güzel Meydanlı)
- Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol*. 1989; 109(1):429-40.
- Pietrzak WS, Eppley BL. *Scientific Foundations Platelet Rich Plasma: Biology and New Technology*. The Journal Of Craniofacial Surgery. 2005; 16, (6).
- Reddy SHR, Reddy R, Babu NC, & Ashok GN. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. *Journal of Oral and*

- Maxillofacial Pathology JOMFP, 2018; 22(3), 367.
- Rendu F, & Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 2001; 12(5), 261-73.
- Roffi A, Filardo G, Assirelli E, et al. Does platelet-rich plasma freeze-thawing influence growth factor release and their effects on chondrocytes and synoviocytes? *Biomed Res Int*. 2014; 2014.
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 1974; 71(4):1207-10.
- Ross MH ve Pawlina W. Male Reproductive System. M. H. Ross, W. Pawlina, M. H. Ross, & W. Pawlina, *Histology A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*. China: Wolters Kluwer Health. 2016; 7. b.s./790-833.
- Salamanna F, Veronesi F, Maglio M, Della Bella E, Sartori M, & Fini M. New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: general overview on still open questions and outlook. *BioMed Research International*, 2015.
- Sánchez, V., Wistuba, J., & Mallidis, C. Semen analysis: update on clinical value, current needs and future perspectives. *Reproduction*, 2013, 146(6), R249-R58.
- Satar DA, & Gençdal S. Sperm değerlendirilmesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2013, 22(4).
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*. 1995; 108
- Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Anthony J, Thomas JR, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology*. 2001; 22(4):575-83
- Shin SM, Kim S, Hong JG, Kim YJ. IGF-I improves mitochondrial membrane potential during hypothermic storage of canine spermatozoa. *J Vet Med Sci*. 2014, Jul;76(7):1065-7.
- Spaleková E, Makarevich AV, Lukáč N. Ram Sperm Motility Parameters under The Influence of Epidermal Growth Factor. *Vet Med Int*. 2011; 2011:642931.
- Speroff L, Fritz A. Marc. Female infertility. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition, 2011: 1250-6
- Su CY, Kuo YP, Nieh HL, et al. Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel. *Transfusion* 2008; 48: 2420- 2414.
- Turan Y, Erbil DAH, Koç DE. Plateletten Zengin Plazma ve Dermatoloji. 2011; 2(4):355-60.
- White, B. A. ve Porterfield S. P. *Endocrine and Reproductive Physiology*. Philadelphia, USA: Elsevier Mosby, 2013.
- World Health Organisation. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
- Yılmaz B, Kesikburun S. Plateletten zengin plazma uygulamaları. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*. 2013; 59(4):338-44.
- Xie X, Zhang C, & Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy*, 2014; 16(1), 204.
- Yuan N, Wang C, Wang Y, Yu T, Long Y, Zhang X, et al. Preparation of autologous platelet-rich gel for diabetic refractory dermal ulcer and growth factors analysis from it. *Wound Repair Regen*. 2008; 22: 468-71.
- Zhang F, Liu H, Stile F, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on rat achilles tendon healing. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112(6):1619-1613.
- Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan MV, & Wang JH. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells-implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015; 6(1), 173.

8. ÖZGEÇMİŞ

1995 Adana doğumludur. İlköğretimini Atatürk İlkokulu'nda tamamladı ve 2013 yılında Sungurbey Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji bölümünü kazandı. 2017 yılında lisans eğitimini tamamlayıp aynı yıl Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) ABD'da yüksek lisans eğitimine başladı.

Tel: 0537 315 32 38

Mail: sksaime77@gmail.com



9. EKLER

EK 1

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

Toplantı Sayısı:74

Toplantı Tarihi: 05.10.2018

Karar Sayısı:2018/1510:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Selçuk DUMAN' ın "Swim-up tekniği ile hazırlanacak semen örneklerinde Trombositten Zengin Plazma Etkisinin Değerlendirilmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 27.09.2018 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Saime ŞİK' ın yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Selçuk DUMAN' ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

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

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Selçuk DUMAN

Yardımcı Araştırmacı: Saime ŞİK

ASLI GİBİDİR

05.10.2018

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZÜ

İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı



BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın Gönüllü,

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'nde Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Öğrencisi Saim ŞİK'ın Yüksek Lisans Tezi amaçlı yürüttüğümüz "Swim-up tekniği ile hazırlanacak semen örneklerinde Trombositten Zengin Plazma etkisinin değerlendirilmesi" adlı araştırmamızla ilgili bilgiler aşağıda yer almaktadır. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Yapacak olduğumuz çalışmanın amacı, bazı erkek infertilitesi (kısırlığı) yaşayan hastalarda alternatif bir tedavi seçeneği oluşturmaktır.

Çalışmamıza katılım sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmaya katılan gönüllülerimiz istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilir. Çalışmaya katılırsanız size herhangi bir ödeme yapılmayacak ya da sizden herhangi bir maddi katkı/malzeme katkısı istenmeyecektir. Araştırmada kullanılacak tüm malzemeler ve yapılabilecek tüm harcamalar araştırmacı tarafından karşılanacaktır.

1. Araştırma, semen (sperm, meni) analizi için başvuru yapmış hastaların analiz günü rutin semen analizleri yapıldıktan sonra atık hedefli semenlerinin Trombositten Zengin Plazma'ya tabi tutulmasına yönelik bir çalışmadır. Çalışma bitiminde elde edilen sonuç başarılı olursa bu çalışmanın Yardımcı Üreme Tekniklerine başvuran hastalarda kullanılması söz konusu olabilecektir. Çalışmada hastanın aleyhine işlenen bir durum söz konusu olmadığı gibi bir risk unsuru da taşımamaktadır. Bu çalışma yalnızca araştırma amaçlı yürütüldüğünden, size dair klinik fayda vadetmez.
2. Semen hazırlığında özel sıvılarda rutin yıkama ve yüzdürme metodları şu anda kullanılmaktadır. Araştırmamızda da swim-up (yukarı yüzdürme) metodu kullanılacaktır.
3. Araştırma süresi 3 aydır.
4. Gönüllülerimizin kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Ancak elde edilen bulgular bilimsel amaçlı kullanılacaktır.

5. Araştırmaya semen için 25 ve Trombositten Zengin Plazma eldesi için 10 gönüllü katılacak olup, her iki örnek için gönüllülerin yaş aralıkları 18-50 olarak belirlenmiştir.
6. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edilirse gönüllülerimiz ve kanuni temsilciler zamanında bilgilendirilecektir.
7. Çalışma süresi içinde herhangi bir nedenle günün 24 saati aşağıda bilgileri bulunan araştırmacımıza ulaşabilirsiniz;

- Adı – soyadı: Prof Dr. Selçuk DUMAN
Tel. No : 0505 407 56 70

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

<i>Gönüllü Adı Soyadı:</i>		<i>Tarih ve İmza:</i>
<i>Telefon:</i>		

<i>Araştırmacı Adı Soyadı:</i>		<i>Tarih ve İmza:</i>
--------------------------------	--	-----------------------

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın Gönüllü,

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'nde Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Öğrencisi Saim ŞİK'ın Yüksek Lisans Tezi amaçlı yürüttüğümüz "Swim-up tekniği ile hazırlanacak semen örneklerinde Trombositten Zengin Plazma etkisinin değerlendirilmesi" adlı araştırmamızla ilgili bilgiler aşağıda yer almaktadır. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Yapacak olduğumuz çalışmanın amacı, bazı erkek infertilitesi (kısırlığı) yaşayan hastalarda alternatif bir tedavi seçeneği oluşturmaktır.

Çalışmamıza katılım sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmaya katılan gönüllülerimiz istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilir. Çalışmaya katılırsanız size herhangi bir ödeme yapılmayacak ya da sizden herhangi bir maddi katkı/malzeme katkısı istenmeyecektir. Araştırmada kullanılacak tüm malzemeler ve yapılabilecek tüm harcamalar araştırmacı tarafından karşılanacaktır.

1. Araştırma için sizden 10 cc kan alınacaktır. Elde edilen kan laboratuvarında santrifüj edilip (yüksek devirli döndürme ile) Trombositten Zengin Plazma elde edilecektir. Elde edilen Trombositten Zengin Plazmalar dondurulup buzdolabının buzluğunda saklanacak, semen örneklerinin çalışılacağı günlerde çözdürülüp kullanılacaktır.
2. Sizden kan alınması sizin için herhangi bir risk unsuru oluşturmaz.
3. Semen hazırlığında özel sıvılarda rutin yıkama ve yüzdürme metodları şu anda kullanılmaktadır. Biz de elde ettiğimiz Trombositten Zengin Plazma'yı bu çalışmada sperm yüzdürme ortamı olarak kullanacağız. Araştırmamızda swim-up (yukarı yüzdürme) metodu kullanılacaktır.
4. Araştırma süresi 3 aydır.
5. Gönüllülerimizin kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Ancak elde edilen bulgular bilimsel amaçlı kullanılacaktır.

6. Araştırmaya Trombositten Zengin Plazma eldesi için kan verecek olan 10 gönüllü, semen (sperm, meni) için ise 25 gönüllü katılacaktır. Semen örnekleri için günlük semen analizi yapılmış hastaların analizden sonra atık hedefli semenleri gönüllü onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edilecektir. Gönüllülerin yaş aralıkları 18-50 olarak belirlenmiştir.
7. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edilirse gönüllülerimiz ve kanuni temsilciler zamanında bilgilendirilecektir.
8. Çalışma süresi içinde herhangi bir nedenle günün 24 saati aşağıda bilgileri bulunan araştırmacımıza ulaşabilirsiniz;

- Adı – soyadı: Prof Dr. Selçuk DUMAN
Tel. No : 0505 407 56 70

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

<i>Gönüllü Adı Soyadı:</i>		<i>Tarih ve İmza:</i>
<i>Telefon:</i>		