



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİGRASYON SEDİMENTASYON YÖNTEMİNİN SEMEN
HAZIRLAMADAKİ ETKİNLİĞİNİN SANTRİFÜGASYON
KULLANILAN YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sevil KIRATLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKÇU

Tez Danışmanı

İkinci Tez Danışmanı

Gaziantep

2016

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**MİGRASYON SEDİMENTASYON YÖNTEMİNİN SEMEN
HAZIRLAMADAKİ ETKİNLİĞİNİN SANTRİFÜGASYON
KULLANILAN YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

SEVİL KIRATLI

Tez Savunma Tarihi: 01.07.2016
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
Tez Danışmanı

Doç.Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKÇU
İkinci Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof.Dr. Mehmet YÜNCÜ

Yrd.Doç.Dr. Nuray BOSTANCIERİ

Yrd.Doç.Dr. Emine PETEKKAYA

BEYAN

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

Sevil KIRATLI

TEŐEKKÜR

Bu tez çalıőmasını yapmama vesile olan, çalıőmalarım boyunca canı gönülden ilgilenen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danıőmanlarım Sayın Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ ve Sayın Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKÇU'ya çok teőekkür ederim.

Tezım süresince bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Serap S. İNALÖZ DEMİR' e, Sayın Yrd. Doç. Nuray BOSTANCIERİ'ne, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayhan ERALP'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet TÜRKER'e teőekkür ederim.

Tezımın her aşamasında yardımını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. A. Serdar GÜRSES'e çok teőekkür ederim.

Tezımın istatistiksel analizinde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Serdal Kenan KÖSE'ye ve tez çalıőmalarım sırasında bana yardımlarını esirgemeyen sevgili Ebru İBİŐ ve Süheyla İŐBASAR'a teőekkür ederim.

Her zorlukta bana destek olan, hayatımda hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan sevgili annem Nevin KIRATLI'ya sonsuz teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....Sayfa No

KISALTMALAR ve SİMGELER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
RESİMLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	5
2.1.1. Testis ve Gelişimi.....	5
2.1.2. Testis Histolojisi.....	7
2.1.2.1. Seminifer Tübüller.....	8
2.1.2.2. Sertoli hücreleri.....	9
2.1.2.3. Spermatojenik hücreler.....	11
2.1.2.3.1. Spermatogonyumlar.....	12
2.1.2.3.2. Spermatozitler.....	12
2.1.2.3.3. Spermatoitler.....	13
2.1.2.3.4. Spermatozoon.....	14
2.1.2.4. İnterstisyum.....	15
2.1.2.5. Leydig Hücreleri.....	15
2.1.2.6. Rete Testis.....	15
2.1.2.7. Duktuli Efferentes.....	16
2.1.2.8.Epididimis.....	16
2.1.2.9. Duktus Deferens.....	17
2.1.2.10. Duktus Ejakulatoryus.....	17
2.1.2.11. Vezikula Seminalis.....	17
2.1.2.12. Prostat Bezi.....	18
2.1.2.13. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri).....	19
2.1.3. Testis Anatomisi.....	19

2.1.3.1. Testis damarları, lenf dolaşımı ve sınırları	20
2.1.4. Testis Fizyolojisi.....	21
2.2. Spermatogenez.....	23
2.2.1. Spermatozitoz.....	24
2.2.2. Mayoz	25
2.2.3. Spermiozitoz	26
2.3. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	27
2.3.1. Standart Sperm Yıkama.....	27
2.3.2. Swim-up Yöntemi.....	28
2.3.3. Migrasyon-Sedimentasyon Yöntemi.....	28
2.3.4. Dansite Gradyent Santrifüjasyon Yönt.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Makler Kamerasında Hareketlilik ve Konsantrasyon Tayini.....	32
3.2. Morfoloji Değerlendirmesi.....	32
3.3. Canlılık Değerlendirmesi.....	33
3.4. Sperm DNA Fragmantasyonu Tayini.....	33
3.5. Anilin Mavisi Boyama ile Persiste Histon Tayini.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Hareketlilik ve Konsantrasyon.....	35
4.2. Morfoloji Değerlendirmesi.....	35
4.3. Canlılık Değerlendirmesi.....	37
4.4. Sperm DNA Fragmantasyonu.....	39
4.5. Anilin Mavisi Boyama ile Persiste Histon Değerlendirmesi.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	56
EK 1.....	57
EK 2.....	59

KISALTMALAR ve SİMGELER

DGS	: Dansite Gradient Sentrifügasyon
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	: Gonadotropin salıcı hormon
LH	: Lüteinleştirici Hormon
MS	: Migrasyon Sedimentasyon
RNA	: Ribonükleik Asit
ROR	: Reaktif Oksijen Radikalleri
ÜYTE	: Üremeye Yardımcı Tedaviler

ŞEKİLLER DİZİNİ.....Sayfa No

Şekil 2.1. Testiküler gelişim evreleri.....	7
Şekil 2.2. Testisin histolojik yapısı.....	8
Şekil 2.3. Seminifer tübülde hücre bağlantı kompleksleri.....	10
Şekil 2.4. Spermin yapısı.....	14
Şekil 2.5. Spermatogenez.....	23
Şekil 2.6. Spermatozitojenesis.....	26
Şekil 3.1. Migrasyon sedimentasyon tüpüne örneklerin yüklenmesi ve sperm eldesi.....	30

RESİMLER DİZİNİ.....Sayfa No

- Resim 4.1.** Normal baş, boyun, akrozom ve kuyruk yapısına sahip spermatozoon morfoloji görüntüsü (Diff Quick boyası 100X objektif)..... 36
- Resim 4.2.** Normal baş, boyun, akrozom ve kuyruk yapısına sahip spermatozoa morfoloji görüntüsü (Diff Quick boyası 100X objektif)..... 37
- Resim 4.3.** Hücre içerisine boya alarak pembemsi görüntü oluşturan canlılığını yitirmiş Spermatozoon görüntüsü (eozin-nigrozin boyama 100X objektif)..... 38
- Resim 4.4.** Yıldız: Pembe boyanmış ölü spermatozoon, Beyaz ok: Boya almamış canlı spermatozoa (eozin-nigrozin boyama 100x objektif)..... 38
- Resim 4.5.** Yıldız: Pembe boyanmış ölü spermatozoon, Beyaz ok: Boya almamış canlı spermatozoa (eozin-nigrozin boyama 100x objektif).....39
- Resim 4.6.** Sperm kromatin saçılma testinde normal (ok) ve DNA kırığına sahip anormal sperm görüntüsü (yıldız) (40X objektif).....40
- Resim 4.7.** Sperm kromatin saçılma testinde normal (yıldız) ve DNA kırığına sahip anormal sperm görüntüsü (ok) (40X objektif).....40
- Resim 4.8.** Sperm kromatin saçılma testinde normal sperm görüntüsü (100X objektif).....41
- Resim 4.9.** Sperm kromatin saçılma testinde normal (yıldız) ve DNA kırığına sahip anormal sperm görüntüsü (ok) (100X objektif).....41
- Resim 4.10.** Anilin mavisi ile boyalı yayma preparatlarında histon-protamin değişimi gerçekleşmeyen anormal sperm koyu renkte görünmekte (100X objektif).....42
- Resim 4.11.** Anilin mavisi ile boyalı yayma preparatlarında persiste histon bulunmayan normal sperm boyayı almamıştır (100X objektif).....43
- Resim 4.12.** Anilin mavisi ile boyalı yayma preparatlarında persiste histon bulunmayan normal sperm boyayı almamıştır (100X objektif).....43

TABLolar DİZİNİ.....Sayfa No

Tablo 2.1. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	27
Tablo 4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Yaş ve Seminal Parametrelerinin Ortalama Değerleri.....	35
Tablo 4.2. İşlemler sonrası konsantrasyon ve motilite değerleri.....	35
Tablo 4.3. İşlemler sonrası morfoloji sonuçları.....	36
Tablo 4.4. İşlemler sonrası canlılık sonuçları.....	37
Tablo 4.5. İşlemler sonrası DNA fragmantasyonu sonuçları.....	39
Tablo 4.6. İşlemler sonrası Persiste Histon Değerleri.....	42

ÖZET

MİGRASYON-SEDİMENTASYON YÖNTEMİNİN SEMEN HAZIRLAMADAKİ ETKİNLİĞİNİN SANTRİFÜGASYON KULLANILAN YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Sevil KIRATLI

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ, Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU

Temmuz 2016, 72 sayfa

Çalışmamızda migrasyon-sedimentasyon yönteminin semen hazırlamadaki etkinliğinin santrifügasyon kullanılan yöntemle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi ve Eğitim Merkezi'ne başvuran progresif ileri hareketli sperm oranı %10'un üzerinde olan erkek hastalar üzerinde yapılmıştır.

İki farklı yöntemle (santrifüj-gradient-swim-up; SGS, migrasyon-sedimentasyon; MS) seçilen spermatozoonlar; hareketlilik, konsantrasyon, morfoloji, canlılık, DNA fragmentasyonu ve persiste histonların varlığı açısından incelenerek karşılaştırılmıştır.

Yapılan çalışma neticesinde MS grubu örneklerde işlem sonrası spermatozoon sayı ve hareketliliğinin SGS grubuna kıyasla daha iyi olduğu, ancak gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Yine, SGS ve MS gruplarında sırasıyla; normal morfolojiye sahip spermatozoon oranı 12.19 ± 6.45 ve 10.67 ± 5.44 , canlılık oranı 74.09 ± 16.65 , ve 70.45 ± 16.78 , DNA fragmentasyonu oranı 3.91 ± 3.96 , ve 2.95 ± 3.33 , persiste histon varlığı oranı 10.59 ± 13.40 , ve 8.86 ± 7.89 olarak tespit edildi, ancak deney grupları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı.

Sonuç olarak migrasyon-sedimentasyon yönteminin, santrifüj kullanılan gradient-swim-up kombinasyonuna göre sperm seçme etkinliğinde anlamlı farklılık görülmemiştir. Migrasyon sedimentasyon, bir sperm seçme yöntemi olarak, motilite sorunu olmayan hasta örneklerinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: infertilite, migrasyon-sedimentasyon, santrifügasyon, sperm seçimi

ABSTRACT

EFFICACY OF MIGRATION-SEDIMENTATION COMPARED TO METHODS WITH CENTRIFUGATION FOR SPERM PREPARATION

Sevil KIRATLI

Master of Science Thesis, Department of Histology and Embryology

Supervisors: Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ, Acc. Prof. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU

July 2016, 72 pages

In our study, the effectiveness of semen preparation using migration-sedimentation method was evaluated and compared to centrifugation based methods.

Male patients who applied to Ankara University School of Medicine Center for Assisted Reproduction and had forward progressive motile sperm rate above 10% in their ejaculate were included in the study. Spermatozoa that selected by two different methods (centrifuge-gradient-swim-up; SGS, migration-sedimentation; MS) were investigated and compared according to motility, concentration, morphology, viability, DNA fragmentation and presence of persistent histones.

The concentration and motility of sperm in MS group was better improved than the SGS group, but the difference between groups was not found significant. Similarly, in SGS and MS groups respectively; sperm with normal morphology rate was $12.19\% \pm 6.45$ vs. $10.67\% \pm 5.44$, survival rate was $74.09\% \pm 16.65$ vs. $70.45\% \pm 16.78$, DNA fragmentation rate was $3.91\% \pm 3.96$, vs. $2.95\% \pm 3.33$, presence of persistent histone ratio was $10.59\% \pm 13.40$, vs $8.86\% \pm 7.89$ and none of the difference between the experimental groups was statistically significant.

As a result, migration-sedimentation method, compared to centrifugation used in gradient-swim-up combination was evaluated to be similarly effective. To conclude, migration sedimentation was assessed to be a safe method for sperm selection for patients with normal motility.

Key words: centrifugation, infertility, migration-sedimentation, sperm selection

1. GİRİŞ

Üremeye yardımcı tedaviler (ÜYTE) sırasında, erkekten masturbasyon yöntemiyle alınan semen örneği çeşitli işlemlerden geçirilerek, içeriğindeki spermatozoonlar oosite enjeksiyon için hazır hale getirilir. Bu işlemler kabaca likefaksiyon, sperm değerlendirme, seçme ve yıkama yöntemleridir. Sperm seçimi ÜYTE için oldukça önemli bir aşamadır ve genellikle santrifüj tekniği kullanılarak yapılmaktadır. Santrifüj ile toplanan semen örneği iki basamaklı gradient solüsyonu içerisinde geçirilir ve bu gradient farkı nedeniyle semen içinde bulunan lökositler, immatür spermatojenik hücreler, epitel hücreleri vb. solüsyonun üst katmanlarında takılacağı için elimine edilmiş olur. Süpernatant kısmının uzaklaştırılmasıyla normal sperm popülasyonu pellette elde edilmiş olur. Gradyent solüsyonlarına bu vizköz yapısını veren içerisinde barındırdıkları silika partikülleridir ve ilk santrifüj işleminden sonra pellet olarak ayrılan spermallerden uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla yıkama işlemi ikinci bir santrifüj etkisiyle pelletteki spermallerin çöktürülmesi ve böylece yabancı maddelerden ayrıştırılması görevini görür. Ardından gerçekleştirilen swim-up tekniği ilk aşamada seçilen spermallerin en hareketlilerini seçmekte ikinci bir eliminasyon metodu olarak kullanılır. Özet olarak, gradient ve swim-up tekniğiyle elde edilen spermaller 2 aşamalı, 10'ar dakikadan toplam 20 dakikalık santrifüj etkisine maruz kalırlar.

Santrifügasyonun sperm fonksiyonlarına başta motilite olmak üzere zararlı etkileri olduğu bildirilmiştir (1). Aynı zamanda santrifüj sırasındaki fiziksel etkenler nedeniyle ortaya çıkan hücre hasarı nedeniyle reaktif oksijen radikallerinin oluştuğu da bilinmektedir (2,3). Santrifüjün direk etkisi ile mekanik membran hasarının oluşabildiği ve oluşan reaktif oksijen radikallerinden kaynaklanan sperm fonksiyon hasarları gösterilmiştir (4). Ayrıca oluşan reaktif oksijen radikallerinin spermde DNA fragmantasyonuna (5), sperm membranında lipid peroksidaz ve mitokondriyal ATP hasarına sebep olabileceği bildirilmiştir (6). Bunların yanında gradiyent dansite santrifügasyon ve swim-up tekniklerinin gerek DNA'sı sağlıklı sperm seçiminde ve gerekse anöploidik spermallerin eliminasyonunda üstün teknikler olduğu bilinmektedir (7).

Tüp bebek tedavileri ve bununla ilgili tıp teknolojisi sürekli gelişmekte, yeni tedavi protokolleri kullanıma girmektedir. Sperm hücrelerinin sağlıklı olması embriyo gelişimi üzerinde etkilidir. Bu nedenle sperm kalitesini ve yapısını bozan hücresel ve çevresel

faktörlerin ortaya konması önemlidir. Bu şekilde yeni tekniklerinin geliştirilmesine katkı sağlanabilecektir.

Bu çalışmadaki amaç semenden migrasyon sedimentasyon yöntemi ile elde edilen spermler ile, gradiyent solüsyonlarıyla santrifüj edilip swim-up yöntemi ile hazırlanan spermleri karşılaştırılarak seçim yöntemlerinin birbirlerine üstünlüğünü ve spermlerde oluşan olası hasarları incelemektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi skrotum ile sarılı olan bir çift testis, iç ve dış genital kanallar, destekleyici bezler ile penisten meydana gelen bir sistemdir. Dış genital kanallar sistemini meydana getiren epididimis, vas-deferens, ejakülatuar kanal ve erkek uretrası dışarıya sperm taşınmasından sorumludur. Destekleyici salgı bezleri olan bir çift seminal vezikül, tek prostat bezi ve iki bulboüretal bezin salgıları ise spermin beslenmesinde, semen oluşturulmasında ve aynı zamanda bu salgının kadın üreme sistemi içerisine taşınmasında görev alırlar (8).

2.1.1. Testis ve Gelişimi

Testisler olgun erkek üreme hücrelerinin ve testosteronun üretildiği, karın boşluğunun dışında skrotum adı verilen bir kesede bulunan bir çift organdır (9).

Testisler paraksiyal mezodermlle lateral plağı geçici olarak birbirine bağlamakla görevli olan mezodermden gelişmektedirler (10,11). Embriyonun cinsiyeti genetik açıdan döllenme esnasında belirlenmiş ise de, erkek ve dişi yapısal özellikleri embriyo gelişiminin 7. haftasının ardından gözlenebilir. Her iki eşeyde de gonadlar birbirine benzer görünüme sahip olduğunda bu evre seksüel gelişimin farklanmamış evresi, bu evredeki gonadlar da farklanmamış gonadlar olarak adlandırılır (10,11).

Testisler karın arka duvarını kaplayan mezotel, altında yer alan embriyonik bağ dokusu (mezenşim) ve ilkel germ hücreleri olmak üzere 3 kaynaktan köken alır (10,12). Gonadlar embriyonik evrenin 5. haftasında, mezonefrik böbreğin medialinde, mezoteldeki kalınlaşma ile gelişmeye başlamaktadır. Mezodermal epitel ile altında bulunan mezenşimin yoğunlaşmasıyla mezonefrozun medialinde genital veya gonadal kabartılar şekillenir. Gelişimin 6. haftasına kadar genital kabartılarda germ hücresi bulunmamaktadır. Her iki eşeyde de belirtilen haftada farklanmamış olan gonadların yapısı aynıdır. Farklanmamış gonad en dışta korteks, içte ise medulla tabakalarından meydana gelir. Embriyo XX eşey kromozomuna sahip ise farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma dönüşür, medullası geriler. Buna karşın embriyo XY eşey

kromozomuna sahip ise medulla testise dönüşürken korteks bazı kalıntı yapılar dışında geriler (10-12).

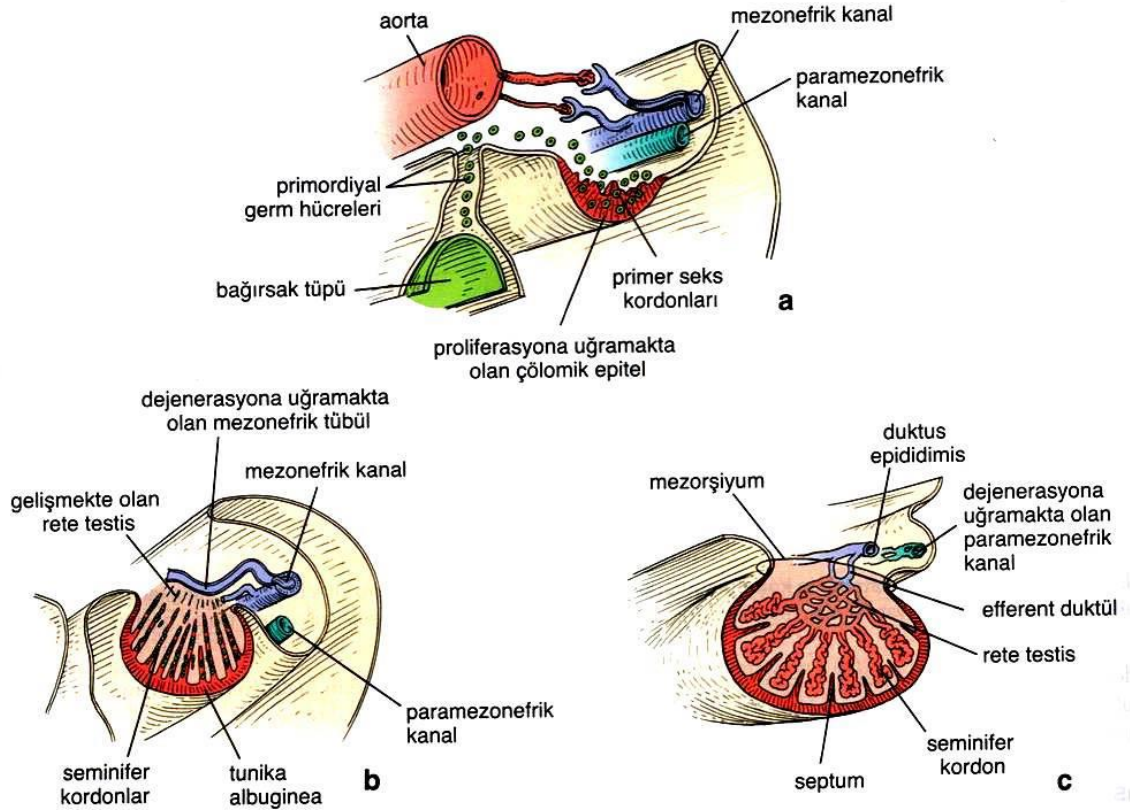
Epiblasttan köken alan ilkel germ hücreleri embriyonik gelişimin 4. haftasının başında vitellüs kesesinin allantoise yakın olan duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirlemeye başlarlar. Bu hücreler yuvarlak ve büyük bir nukleusa, belirgin bir veya birkaç nukleolusa sahiptir. Sitoplazmalarında da alkalen fosfataz düzeyi yüksektir. Çok sayıda glikojen ve lipid damlacıkları içerirler. Dördüncü haftada sonbarsağın arka mezenteri boyunca ameboid hareketler yapmak suretiyle ilerleyerek 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşmakta, 6. haftada ise genital kabartılara yerleşmektedir. İlkel germ hücreleri genital kabartılara ulaşamamaları halinde gonadlar gelişemez. İlkel gonadların testise farklanmasında ilkel germ hücrelerinin uyarıcı etkisi söz konusudur (10,11).

İlkel germ hücrelerinin migrasyonu ve çoğalması bir tirozin kinaz olan c-kit reseptörüyle hücre membran ligandı olan kök hücre faktörünün etkileşimine bağlıdır (13). İlkel germ hücrelerinin gonadlara migrasyonundan önce ve gonadlara ulaştıkları anda genital kabartılardaki kölom epiteli çoğalır, mezenşim içerisine gömülerek ilkel eşey kordonları olarak adlandırılan, yüzey epiteline bağlı olan parmak şekilli düzensiz kolonlar meydana getirirler (11).

İlkel eşey kordonları testis belirleyici faktörü kodlayan Y kromozomu üzerinde yer alan SRY geninin etkisi ile testis kordonlarını meydana getirmek için çoğalır. Testis kordonları gonadların hilusuna doğru dallanarak anastomoz yapmakta ve böylelikle de rete testisi meydana getirmektedirler. Testis kordonlarıyla yüzey epiteli arasındaki ilişki tunika albuginea olarak adlandırılan fibröz bağ dokusu katmanının oluşumu ile kesilir (10,11,13).

Gelişimin 4. ayında testis kordonları at nalı şeklinde bir görünüme kavuşur, iki uçları birleşir ve tubuli rekti olarak adlandırılan ince bir kanal biçimlenir. Tubuli rektiler rete testise açılmaktadırlar (12). Testis kordonları ilkel germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden gelişen destek hücrelerinden (Sertoli hücreleri) oluşmaktadır. Testis kordonları arasında gonadal kabartıların mezenşimden köken alan Leydig hücreleri mevcut olup bunlar gelişimin 8. haftasında testosteron salgılamaya başlarlar ki bu hormon erkek genital kanalları ve dış genital organları şekillendirir (11). Testis kordonları puberteye kadar kapalı olup puberteyle beraber kordonların lümenleri açılır ve aynı zamanda seminifer tübüller biçimlenir. Kanalize olan seminifer tübüller de rete

testis tübülleri ile birleşerek duktuli rekti ve duktuli efferenteslere açılırlar. Daha sonra bunlar da tek bir kanal olan duktus epididimis ile duktus deferensle birleşirler (10,11). Seminifer tübül duvarı destek hücreleri olan Sertoli hücresi ve üreme hücrelerinden gelişen spermatogoniumlar olmak üzere iki hücre tipinden oluşur (10).

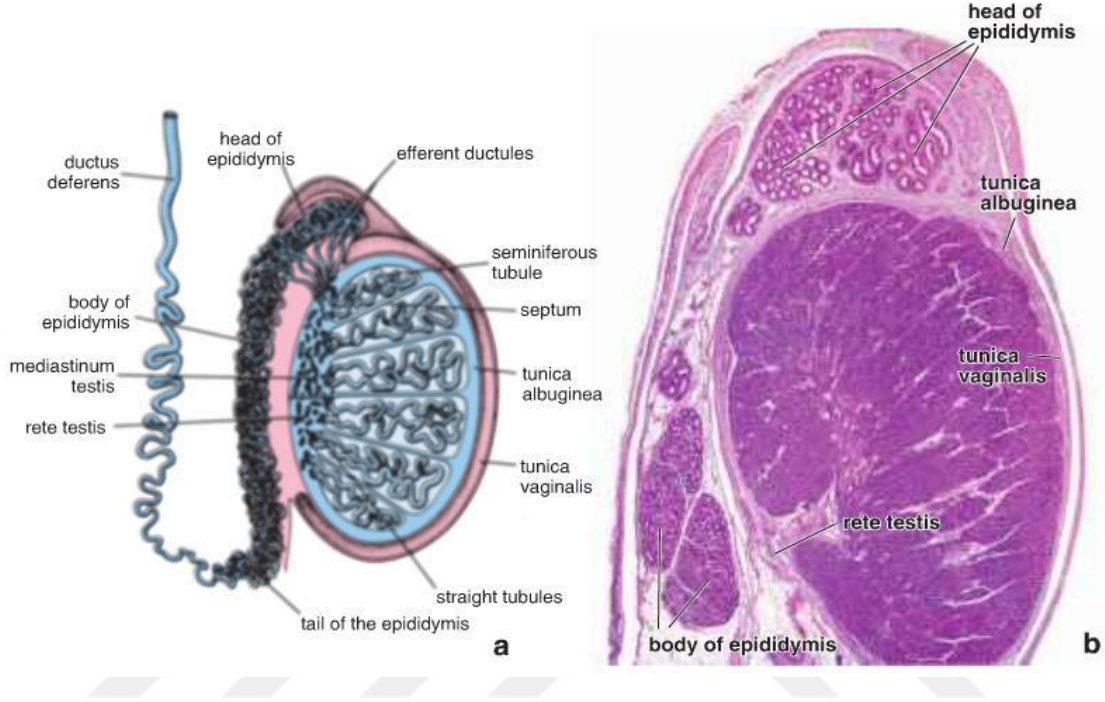


Şekil 2.1. Testiküler gelişim evreleri. a) 5 haftalık embriyoda farklılaşmamış gonad evresi b) 5. Haftadan sonraki evre c) Testiküler gelişimin son evreleri (10).

2.1.2. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi testisler, yardımcı bezler, testis dışı ve içi genital kanallar ile penisten meydana gelmektedir. Testisler embiyonik gelişim, eşeyssel olgunlaşma ve üreme fonksiyonlarını etkileyen, puberte ile birlikte spermatozoonların üretimi ve beslenmesiyle erkek eşey hormonu testosteronun sentezinden sorumlu, ekzokrin ve endokrin fonksiyonu bulunan bir çift organdır. Yanlardan basık, oval görünümlü, iri badem büyüklüğünde, her biri 10-25 gram ağırlığında, 2.5x3.5 cm boyutlarında olan testislerin posterior kısmı epididimis ile bağlantılıdır. Testisi dıştan örten tunika albuginea katmanı, testisin posterior kısmında kalınlaşarak mediastinum testisi meydana getirir ve fibröz uzantılar şeklinde organın iç kısmına sokulur. Testise giriş yapan ve testisten çıkış yapan kan ve lenf damarlarıyla kanallar bu tabaka içerisinde seyredir.

Mediastinum testis içerisine doğru uzanan ince bağ dokusu septumları testisi 250 civarında lobüle bölmekte olup her bir lobülün içerisinde spermilerin üretildiği ve sayıları 1-4 arasında olan seminifer tübüller yer alır. Seminifer tübüllerin arasındaki boşluk kan damarlarını, lenf damarlarını, sinirleri, Leydig hücrelerini ve makrofajları çevreleyen interstisyel dokuyla kaplıdır (Şekil 2.2) (14, 15).



Şekil 2.2. Testisin histolojik yapısı. a) Testisin sagittal kesiti, b) Testisin Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanmış sagittal kesiti (16).

2.1.2.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller 30-80 cm uzunluğunda ve yaklaşık olarak 150-200 μm çapındaki yoğun kıvrımlara sahip kanallar olup her bir testiste 250-1000 kadar bulunmaktadır. Seminifer tübüller anastomoz gösteren kıvrımlar şeklinde başlamakta olup mediastinum'a doğru yaklaşırken düz ve kısa tübüller olan tubuli rekti'yi meydana getirirler. Tubuli rektiler de mediastinumda bulunan ve anastomozlaşan kanallar olan rete testise açılırlar. Seminifer tübüller; seminifer epitel ve germinal epitel olarak adlandırılmakta olan çok tabakalı bir epitel ile kaplı olup seminifer epitel dışta bazal lamina, kollajen lifler ve kontraksiyon özelliği olan myoid hücrelerden meydana gelen özelleşmiş, peritübüler doku ya da tunika propria olarak adlandırılan çok katmanlı bir bağ dokusuyla çevrilidir. Myoid hücrelerin organizasyonu türler arasında farklılık arz

etmektedir. Kemirgenlerde tek tabakalı bir yapıya sahip iken insanlarda ise 3-5 tabakalıdır. Bu hücreler elektron mikroskopik seviyede düz kas hücrelerine benzeyen, bazal laminayla sarılı, aktin filamentler açısından zengin olan hücreler olup kasılıp gevşeme kabiliyetlerinden ötürü seminifer tübüllerin çapında değişikliğe neden olarak hareketsiz spermatozoonların rete testise doğru ilerleten ritmik hareketi tesis etmektedirler. Seminifer epitelde spermatojenik hücreler ve Sertoli hücreleri şeklinde 2 temel hücre grubu söz konusudur (15).

2.1.2.2. Sertoli hücreleri

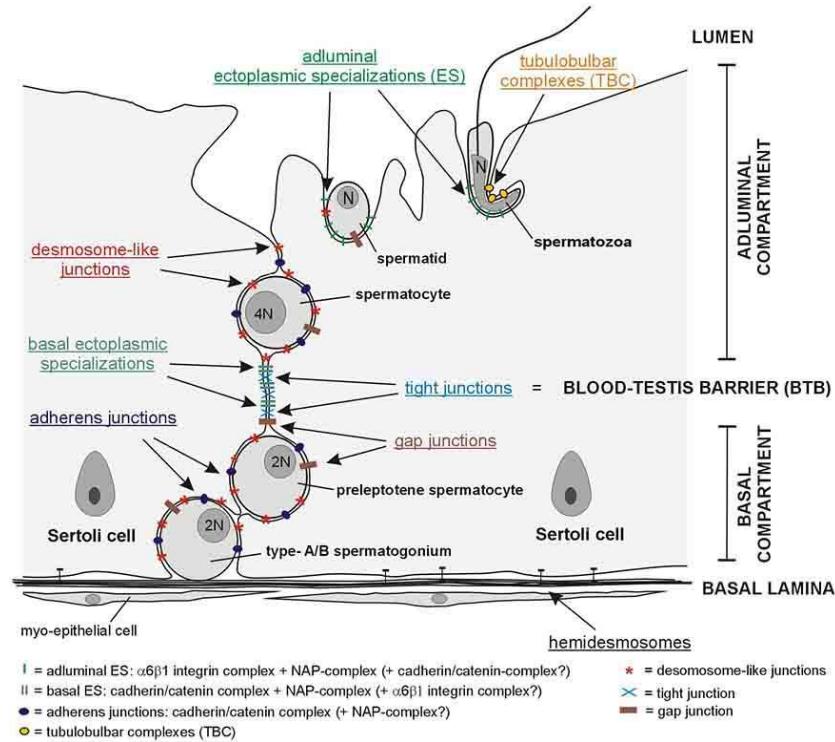
Bu hücreler bazaldan lümene dek uzanmakta olan uzun, prizma şekilli büyük hücrelerdir. Destek hücreleri olarak da adlandırılmakta olan Sertoli hücreleri gelişmekte olan sperm hücrelerinin beslenmesinden, korunmasından ve desteklenmesinden sorumludurlar. Aynı zamanda tam manasıyla farklılaşamayan ve olgunlaşamayan spermatojenik hücreleri fagosite etmek suretiyle ortadan kaldırmaktadırlar. Spermatojenik hücrelerinde olduğu gibi bölünme kabiliyetleri bulunmamaktadır. Puberteye dek seminifer epitelin baskın hücre tipiyken puberteden sonra sayılarında azalma gerçekleşir. Bu hücreler ileri yaştaki erkeklerde spermatojenik hücre popülasyonu azaldığı zaman yeniden seminifer epitelin temel elemanına dönüşürler (16).

Sertoli hücreleri ökromatik, büyük, oval ya da üçgen şekilli ve bazal sitoplazmada konumlanmış olan nükleusa sahiptir. Nükleusları bir ya da fazla iç katlantılara sahiptir. Bazı türlerde karyozom olarak adlandırılan kendine özgü üç parçalı yapıda DNA ve RNA içeren cisimcik çifti tarafından çevrelenen 1-2 adet bariz nükleolusa sahiptir (17). Elektron mikroskopunda Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında yoğun miktarda lipid damlacıkları gözlenmektedir. Aynı zamanda bariz golgi kompleksi, bol ve tübüler mitokondriler, gelişmiş granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum, primer ve sekonder lizozomlar, glikojen granüller, serbest ribozomlar, mikrotübüller ve mikrofilamentlere sahiptirler (15).

İnsanlarda bazal sitoplazmada nükleus yakınında “Charcot-Böttcher” adı verilen inklüzyon cisimcikleri de görülebilmekte olup bu hücrelerin sınırları ışık mikroskopunda kolay ayırt edilememektedir. Hücrelerin apikalinde gelişmekte olan spermatozoonların baş kısımları bulunmaktadır. Birbirlerine komşu Sertoli hücreleri

arasında pek çok bağlantı kompleksi mevcuttur. Komşu membranlar arasında 50'nin üzerinde paralel kaynaşma bölgelerinin yer aldığı zonula oklüdens tipi bağlantılar söz konusu (15,16) olup bu sıkı bağlantı kompleksleri interstisyel dokudaki kan damarlarıyla seminifer tübüller arasında kan-testis bariyeri oluşturulmasını sağlar. Bu bariyer ile seminifer epitel bazal ve adluminal bölümlere ayrılır. Bu bariyer germ hücrelerinin kandan gelen toksik kimyasallar, ilaçlar ve mutajenler gibi zararlı maddelere karşı korunmasını ve seminifer tübüllerin aminoasit, iyon, protein ve karbonhidrat içeriğinin kan ve lenf içeriğinden daha farklı olmasını sağlar (17). Spermatogonyumların farklılaşması sperme has proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Eşeyssel olgunlaşmanın, immünolojik kabiliyetin gelişmesinden sonra meydana gelmesi neticesinde farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanmakta olup bu durum germ hücrelerinin ölümüne yol açabilecek bir immün yanıtı teşvik eder. Kan-testis bariyeri seminifer tübüllere immünooglobulinlerin geçişine mani olarak haploid germ hücreleri, sekonder spermatosit, spermatid ve spermiler ile immün sistem arasında ortaya çıkabilecek herhangi bir etkileşimin de önüne geçilmesini sağlar (16,18).

Sertoli hücreleri membranlarında sıkı bağlantıların yanı sıra oluklu bağlantı komplekslerine, tubulobular komplekslere, ektoplazmik özelleşmelere, fokal bağlantılara, desmozomlara ve hemidesmozomlara da sahiptirler (Şekil 2.3) (19).



Şekil 2.3. Seminifer tübülde hücre bağlantı kompleksleri (20).

Spermatojenik hücreler Sertoli hücrelerinin lateral uzantılar ile oluşturulan bölmelere yerleşmiş olan hücrelerdir. Seminifer tübüllerin bazal bölümlerine yakın olan yerlerde Sertoli hücreleri arasında spermatogonyumlar ve erken dönem primer spermatositler yerleşirken luminal bölgelere doğru ise daha olgun olan spermatositler ve spermatidler yerleşmiştir. Spermatojenik hücreler olgun hale geldikçe lümene doğru ilerlerken Sertoli hücreleri arasında yer alan bağlantı komplekslerinin meydana getirmiş olduğu bariyeri aşmalıdır (15).

Sertoli hücreleri testosteron ve dihidrotestosterona yüksek bağlanma affinitesine sahip olan androjen bağlayıcı protein sentezlemekte olup bu protein luminal bölgede testosteron hormonunun yüksek konsantrasyonlarda tutulmasını sağlayacak gelişim ve farklılaşma aşamalarındaki sperm hücrelerinin olgunlaşmasında rol oynar. Bu hücrelerde aynı zamanda folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını baskılayan inhibin, plazminojen aktivatörü ve transferrin sentezlenmektedir (13).

Yukarıdaki açıklamalar dikkate alındığında Sertoli hücrelerinin fonksiyonları aşağıdaki gibi sıralanabilir (16-18):

- Kan-testis bariyerini meydana getirmek
- Gelişen spermatojenik hücelere destek olmak
- Seminifer tübül lümenine sperm taşınımını kolaylaştıracak olan protein ve iyon açısından zengin sıvı salgılamak
- Spermiogenez sonunda atılan rezidüel cisimsikleri ya da gelişimini tamamlayamamış olan spermatojenik hücrelerin fagoside edilmesini sağlamak
- Embriyonik gelişim sırasında erkek fetusta Müller kanallarının gerilemesini sağlayan Anti Müllerian hormonu üretmek
- Plazminojen aktivatörü ve transferrin gibi molekülleri sentezlemek ve aynı zamanda FSH uyarımı ile androjen bağlayıcı protein sentezlemek.
- Ön hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını baskılayan inhibin ve uyarıcı peptidleri (aktivin) salgılamak.

2.1.2.3. Spermatojenik hücreler

Spermatojenik hücreler düzenli bir şekilde bölünmek suretiyle olgun spermelere farklılaşan hücrelerdir. 4-8 tabaka hücre içermektedirler. Bu hücreler bazaldan lümene

doğru; spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler, spermatozoon Őeklinindedir. Bu hücresler aşağıda başlıklar halinde kısaca aŐıklanmıŐtır.

2.1.2.3.1. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar bazal bÖlümde bazal laminayla doğrudan ilişkili olan hücresler olup Sertoli hücresleri arasındaki zonula oklüdenslerin altında yerleŐtiklerinden kan-testis bariyerinin dıŐındadırlar. Üç temel spermatogonyum tipi söz konusudur. Tip A spermatogonyumlar seminifer epitelin kök hücresleri olup yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli oval nükleusa sahiptirler. Puberteden itibaren mitotik bölünmeler geçirmek suretiyle ya Tip A koyu spermatogonyumları veya Tip A aÇık spermatogonyumları meydana getirirler. Tip A aÇık spermatogonyumlar mat boyanan, ince granüler kromatinli oval nükleusa sahiptirler. Mitoz bölünmeler neticesinde farklılaŐarak Tip B spermatogonyumları meydana getirirler. Bunlar merkezi yerleşimli nükleolusa sahip küresel nükleusludurlar. Nükleus kromatini nükleolus çevresinde ve nükleus kılıfı boyunca yoğunlaŐma gösterir (16).

2.1.2.3.2. Spermatositler

Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmeleri neticesinde oluşan primer spermatositler sentez fazını tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz aŐamasına girerler ki bu aşamada leptoten, zigoten, pakiten ve diploten fazlarını geçirerek diakinez safhasına ulaŐırlar ve crossing over'den sonra kromozomlar ayrılır. Bu aşamadan sonra hücresler metafaz aŐamasına girerler ve kromozomlar takip eden anafazda her bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün civarında bir süre almasından ötürü mikroskop altında incelenen hücreslerin önemli bir kısmı bu aşamada görölmektedir. Spermatojenik seride en büyük hücresler nükleuslarındaki sinaptonemal kompleksin varlığı ile karakterize primer spermatositlerdir. Birinci mayoz bölünmenin ardından ortaya çıkan sekonder spermatositler 2n DNA ve 23 kromozom (22+X ya da 22+Y) iÇerir. Testis kesitlerinde sekonder spermatositler zor görölrler. Çünkü bunlar interfaz aşamasında kısa süre kalmakta ve hızlı bir Şekilde mayoz bölünmeye girmektedirler (16, 21).

2.1.2.3.3. Spermatidler

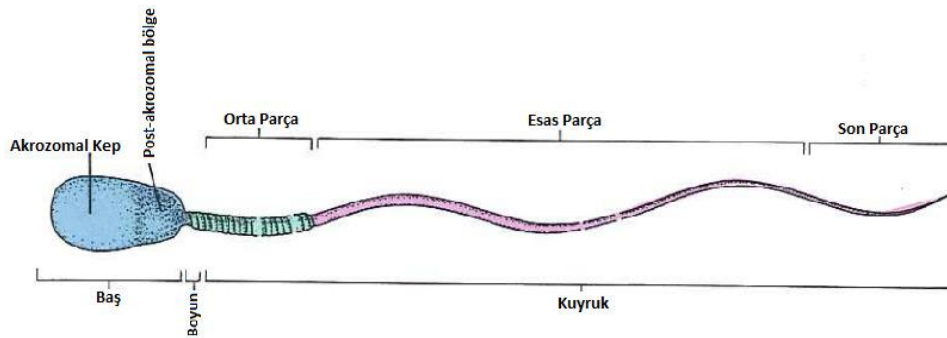
Spermatidler sekonder spermatositlerin ikinci mayozu neticesinde ortaya çıkan hücreler olup diğer hücrelere kıyasla daha küçük olmaları, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan nukleusları ve seminifer tübüllerde lümen yakınında Sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerinde yerleşmeleriyle tanınmaktadırlar. Bu hücreler spermiyogenez olarak adlandırılan farklılaşma aşamasını geçirerek metamorfoza uğrarlar ki bu süreçte akrozom oluşur, nukleus yoğunlaşır ve uzar, kuyruk gelişir ve sitoplazmanın önemli bir kısmı kaybedilir. Yeni oluşan spermatid merkezî yerleşimli olan bir nukleus, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondriye ve aynı zamanda bir çift sentriole sahiptir. Spermatidin olgun sperm haline gelme süreci “Golgi fazı”, “şapka (cap) fazı”, “akrozomal faz” ve “olgunlaşma fazı” olmak üzere 4 faz içermekte olup bu fazlar spermatidlerin özel bağlantılar ile Sertoli hücre membranına fiziksel olarak bağlandığında oluşurlar.

- **Golgi Fazı:** Nukleusun bir kutbuna yerleşen golgi kompleksi PAS (+) granüller olan proakrozomal granülleri salgılamaya başlarlar. Bu granüller nukleus kılıfına yakın yerleşime sahip olan akrozomal vezikül içerisinde yoğunlaşır. Sentrioller akrozomal vezikülün şekillendiği nukleus bölgesinin karşı kutbuna doğru göç ederek sperm kuyruğunun şekillenme sürecini başlatır.
- **Şapka Fazı:** Akrozomal vezikülün yerleştiği nukleus yüzeyinde yarıya kadar yayılması ile karakterizedir. Akrozomal şapkanın altındaki nukleus kılıfı porlarını kaybetmek suretiyle kalınlaşır. Nukleus içeriği yoğunlaşır.
- **Akrozomal Faz:** Kromatini yoğunlaşan nukleus yassılaşır. Sitoplazmik kısım posteriorda kalır. Sitoplazmik mikrotübüller silindirik bir kılıf olan manşet şeklinde düzenlenir. Akrozomal yüzeyin karşı kutbuna göç edip kuyruğun erken gelişimini başlatan sentrioller modifiye olarak spermin boyun kısmını şekillendirir. Manşetin kaybolması ve sitoplazma derininden boyun kısmı ve uzantısına mitokondriyon göçü gerçekleşir ki böylelikle de orta parça şekillenir.
- **Olgunlaşma Fazı:** Sitoplazmik artık olan rezidüel cisimciğin spermden atıldığı faz olgunlaşma fazıdır. Rezidüel cisimcikler Sertoli hücrelerince fagosite edilir.

Neticede seminifer tübülün lümenine salınan olgun spermatozoonlar ortaya çıkar (16,13).

2.1.2.3.4. Spermatozoon

Olgun germ hücresi spermatozoon olarak adlandırılır. İnsanda spermatogonyumda spermatozoon oluşunu esnasında yaklaşık 64 günlük bir süre geçmekte olup bu sürece spermatogenezis denir. Olgun insan spermatozoonu baş, orta parça ve kuyruk olmak üzere 3 ana kısımdan meydana gelir (şekil 2.4). Spermin baş ve kuyruğu plazma membranı tarafından sarılıdır. Baş, akrozom ile sarılmış nukleustan meydana gelir. Nukleus yassılaşmış olup kromatin açısından zengindir. Nukleusun anterior yarısı akrozom tarafından örtülüdür. Özel bir tip lizozom olarak kabul edilmekte olan akrozom, akrozin olarak adlandırılan tripsin benzeri proteazlar, asit fosfataz, hyalurodinaz ve nroaminidaz gibi çeşitli hidrolitik enzimlere sahiptir. Spermin orta parçası, baş ve kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. Bu kısım bir çift sentriole sahiptir. Distal sentriol kuyruğun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık etmektedir. Kuyruk yapısal olarak siliuma benzemekte olup orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 kısma ayrılmaktadır. Orta parça sarmal olarak dizilmiş olan mitokondrilerin oluşturduğu tabakadır. Dokuz artı iki (9+2) mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler olarak adlandırılan sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan 9 adet uzunlamasına filamandan meydana gelir. Kuyruğun esas parçası en uzun kısımdır. Yedi adet dış yoğun lif ile sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan meydana gelmektedir. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf spermin öne doğru hareketi esnasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet meydana getirir. Kuyruğun son parçası dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından ötürü yalnızca aksoneme sahiptir (16,21).



şekil 2.4. Spermin yapısı (16)

2.1.2.4. İnterstisyum

Testisin seminifer túbülleri arasında yer alan boşluklar bağ dokusu elemanları, sinirler, kan ve lenf damarları ve Leydig hücreleri ile doludur. Testiküler kapillerler pencere tipte olup kan proteinleri gibi büyük moleküllerin serbest bir şekilde geçişine izin verirler. İnterstisyel alanın lenf damarları açısından zengin olması buradan alınan interstisyel sıvıyla lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır (16,21).

2.1.2.5. Leydig Hücreleri

Leydig ya da testisin interstisyel hücreleri yuvarlak veya poligonal görünümlü hücrelerdir. Bu hücreler eozinofilik sitoplazmaya sahip olup merkezi yerleşimli olan nukleus kaba kromatin granülleri ve belirgin bir nukleolusa sahiptir. Steroid sentezleyen hücre özelliklerine sahip olan sitoplazma yaygın agranüler endoplazmik retikulum, küçük yağ damlacıkları, túbüler kristal mitokondriler, lipofuksin granülleri, Reinke kristali ve öncüllerine sahiptir. Leydig hücreleri sekonder eşey karakterlerinin oluşumundan sorumlu olan testosteronu üretmektedirler. Testosteron sentezi mitokondri ve agranüler endoplazmik retikulumundaki enzimler ile gerçekleştirilir. İnterstisyel hücrelerin aktiviteleri ve miktarları hormonal uyarımlar ile ilişkilidir. Gebelik esnasında üretilen plasental gonadotropik hormon, maternal kandan fetüse geçmekte olup androjenik hormonları üreten fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Androjenik hormonlar gelişim esnasında erkek genital organların farklılaşması için gereklidir (16,13).

2.1.2.6. Rete Testis

Yoğun damara sahip olan mediastinum içerisine yerleşmiş, birbirleriyle anastomozlaşan túbüler yapılar olan rete testisler bir tubulus ağı oluşturmaktadırlar. Tubuli rekti olarak adlandırılan düz seminifer túbüller mediastinum testisteki bu kanal ağına açılmaktadır. Tek katlı kübik ya da alçak prizmatik epitel ile kaplı, düzensiz bu kanalların epitel hücreleri tek bir apikal silium ve birkaç kısa mikrovillusa sahip olup nukleusları oldukça koyu boyanmakta ve bu hücrelerin yaslandığı bazal membran mediastinumun yoğun kan damarlı bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Spermiler tubuli rekti ve rete testisten

oldukça hızlı bir şekilde geçtiği için kesitlerde lümende spermelere oldukça az rastlanmaktadır (14,15).

2.1.2.7. Duktuli Efferentes

Yaklaşık 20 adet olan ve kıvrımlı bir yapıya sahip kanallar olup rete testisi epididimise bağlanmaktadır. Yalancı çok katlı prizmatik epitel ile kaplıdır. Bu kanallar sistemi testisten çıkarken oldukça kıvrımlı bir şekil alarak konik yapılar meydana getirmekte olup bu konik yapıların bazalinde efferent kanallar epididimise açılmaktadır (16).

Efferent kanalların epitelinde yer alan hücreler prizmatik ve kübik yapıları hücreler olup uzun boylu hücrelerinde silium mevcut iken kısa boylu olan hücrelerinde ise yoğun miktarda mikrovillus, apikal sitoplazmalarında yoğun miktarda lizozom, mikropinositotik vezikül ve membran ile sınırlı yoğun cisimler mevcuttur. Seminifer tübüllerden salgılanan sıvının önemli bir kısmı bu hücrelerce geri emilmektedir. Bazal membrana komşu yerleşen kübik bazal hücreler diğer hücrelere dönüşebilme özelliğine sahip kök hücrelerdir. Aynı zamanda elastik liflere sahip olan sirküler ince bir kas tabakası da bu kanalı çevrelemekte olup bu kas tabakası ve siliumların hareketiyle spermeler bu kanallar boyunca ilerlemektedir (14,15).

2.1.2.8. Epididimis

Epididimis duktus efferentes ve duktus epididimisten meydana gelmekte olup testislerin arka yüzü boyunca uzanmaktadır. Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 ana kısımdan meydana gelir ve baş kısmında efferent duktus mevcuttur. Duktus epididimis ise oldukça kıvrımlı, uzun bir kanaldır ve epididimisin gövde ve kuyruk kısmında yer almaktadır. Bu kanalı çevreleyen sıkı bağ dokusu yoğun kan damarı ve düz kas hücrelerine sahiptir. Yalancı çok tabakalı stereosilyalı prizmatik epitel bazal hücreler ve esas hücrelerden meydana gelir. Esas hücreler pek çok uzun stereosilyalara sahip, uzun boylu prizmatik hücreler olup sitoplazmalarında yoğun granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum ağının yanı sıra bir Golgi kompleksi mevcuttur. Bazal hücreler kök hücre özelliğindedir. Epitel içerisinde "halo hücreleri" olarak adlandırılan lenfositler gözlemlenebilir. Baş ve gövde kısımlarında bağ dokusunun yanı sıra sirküler düz kas tabakası mevcuttur (14,16).

Duktus epididimis, spermelerin hareket ve fertilité kabiliyetini kazandığı özel bir kanaldır. Aynı zamanda duktuli efferentesten geriye kalan absorbe edilmemiş olan sıvının geri emilimi ve Sertoli hücrelerince ortadan kaldırılmamış olan rezidüel cisimlerin ve bozulmuş durumdaki spermelerin fagosite edilmesi gibi olaylar da burada gerçekleşmektedir. Esas hücreler sperm olgunlaşmasını sağlayan siyalik asit, gliserofosfokolin ve glikoproteinleri salgılar (16).

2.1.2.9. Duktus Deferens

Duktus deferens epididimis kuyruğunun devamıdır. Kalın duvarlı ve muskular bir boru olan duktus deferens testisin arka yüzünden yukarı doğru uzanıp spermatik kordonun bir elemanı olarak inguinal kanaldan geçerek karın boşluğuna ulaşır. Mesane düzeyinde genişleme yaparak ampullayı meydana getirir ve bu yapının son kısmına seminal vezikülün kanalları da katılır. Daha sonra prostata girerek üretraya açılır. Prostata giren segment “duktus ejakulatorius” olarak adlandırılmaktadır. Epiteli çok katlı yalancı prizmatik epitel olup hücrelerinin büyük kısmı yüzeyinde stereosiliuma sahiptir. Epitel altında elastik lifler açısından yoğun bir lamina propria mevcuttur. Mukoza, lümeneye doğru katlantılar yaptığından lümen düzensiz bir görünüme sahiptir. Kas tabakası ite ve dışta longitudinal, ortada sirküler seyreden kas liflerinden meydana gelmiş olan kalın bir tabakadır (16).

2.1.2.10. Duktus Ejakulatorius

Duktus ejakulatorius yaklaşık olarak 1 cm uzunluğunda, basit prizmatik epitel ile kaplı, kısa ve düz bir kanal olup prostat bezine girmekte ve prostatik üretraya açılmaktadır. Mukoza lümenine doğru katlantılar yapmaktadır. Duvarında düz kaslar yoktur (17).

2.1.2.11. Vezikula Seminalis

Vezikula seminalis yaklaşık 1,5 cm uzunluğunda, kıvrımlı ve tubuloalveolar yapıdaki bir çift bezdir. Bu bezlerin iç kısmında lümeneye doğru uzanan salgı epitelinin kapladığı bağ dokusunun girinti-çıkıntıları mevcuttur. Son derece ince katlar meydana getiren mukozaya, dallı ve birbirine bağlantılar oluşturan petek şeklinde bir görünüme sahiptir.

Labirent şeklinde izlenen lümeni çok katlı yalancı epitel ile kaplıdır. Kısa, bazal hücreler ve prizmatik hücrelere sahiptir. Testosteron hormonuna bağlı olarak epitel yüksekliği farklılık arz eder. Hücrelerin bazıları mikrovillusa sahip iken bazıları ise tek bir flagelluma sahiptir. Hücreler granüler endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi açısından zengindir. Yoğun miktarda salgı granülleri söz konusudur. Epitelin altında fibroelastik bağ dokusu ve bunun altında da içte sirküler, dışta ise longitudinal kaslar mevcut olup en dış kısımda ise bağ dokusundan yapılmış bir kapsül bulunur (17, 22, 23). Ejakülataın %70'lik kısmı insanda bu bezin salgısı olup bu bezler viskoz, sarımsak renkli, spermatozoonları aktiveştiren sitrat, inozitol, prostoglandinler ve çeşitli proteinler içeren bir salgı salgılar. Bu salgı aynı zamanda yoğun oranda fruktoz içermektedir ki, spermatozoonlar salgıdaki monosakkaritleri hareket için gerekli olan enerjiyi elde etmek amacıyla kullanmaktadırlar (22).

2.1.2.12. Prostat Bezi

Normal erişkin bireylerin prostatı kestane büyüklüğünde olup yaklaşık olarak 20 gramdır. Retroperitoneal yerleşimli olan prostat bezi mesane boynu ve üretranın çevresini sarmaktadır. Çeperi ince, belli belirsiz bir fibroelastik bağ dokusuna sahip kapsül ile karışık düz kas ve arka tarafından da ejakülatör kanalların girişine sahiptir. 30-50 kadar dallanmış tubuloalveolar bezden meydana gelmekte olup bunların kanalları prostatik üretraya açılmaktadır. Prostatta 3 ayrı bölge söz konusudur: bunlardan ilki prostat hacminin %25'lik kısmını kaplayan merkezi bölgedir (santral kuşak). Bu bölge çok katlı yalancı epitel ile kaplıdır. İkinci bölge ise prostat bezi hacminin %70'lik kısmını kaplayan periferik bölge olup prostat kanseri bu bölgede gelişmektedir. Üçüncü ve son bölge ise geçiş bölgesi olup iyi huylu prostat hiperplazilerinin önemli bir kısmı bu bölgeden kaynaklanmaktadır (22,23).

Prostat bezinin lümeninde çoğunlukla çapı 0,2-2mm arasında olan glikoprotein yapıda, küçük küresel cisimcikler mevcut olup bunlar prostat taşları ya da korpora amilasea olarak adlandırılmaktadır. Önemi tam manasıyla anlaşılammış olmasına karşın sayıları yaşa bağlı olarak artış göstermektedir. Prostat bezi çok katlı yalancı epitele sahip, bazal hücreler ve salgı yapan hücrelerden meydana gelmektedir. Prostat salgısı ejakülat sıvısının yaklaşık %15'ini teşkil etmekte olup yoğun miktarda asit fosfataz, amilaz ve fibrinolize sahiptir (22).

2.1.2.13. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)

Çapları 3-5 cm arasında olan bu bezler üretranın membranöz kısmının proksimalinde yer alarak buraya boşalmaktadır. Bulboüretal bezler mukus salgılayan tek katlı silindirik epitel ile kaplı bezlerdir. Fibroblast, düz ve çizgili kasa sahip bir kapsüle sahip olup bu kapsülden ayrılan bölmeler bezi loblara ayırmaktadır. Bezin salgısı kayganlaştırıcı fonksiyona sahip, berrak bir mukustur (17,22).

2.1.3. Testis Anatomisi

Testisler, funikulus spermatikus'a asılı vaziyetteki skrotum içerisinde bulunan, androjenlerin sentezi ve erkek üreme hücreleri olan sperm yapımıyla görevli, oval görümlü, her biri yaklaşık 10-14 gram ağırlığında, 4.5-5cm uzunluğunda ve 2.5 cm çapındaki organlardır (24-26).

Testislerin bağlı bulunduğu funikulus spermatikusta duktus deferens, a.duktus deferens, plexus duktus deferens, a. testikularis, plexus testikularis, plexus pampiniformis, a.kremasterika, n. genitofemoralis'in ramus genitalis'i ve lenf damarları mevcuttur (27, 28).

Skrotum ısı düzenlemesi ile görevli, kıvrımlı yapıda bir kese olup iç yüzeyi septum skroti ile ikiye ayrılmaktadır ki testisler de bu boşluklarda yer alır. Testislerin skrotum içerisinde bulunması vücut sıcaklığından 2-3°C daha düşük sıcaklıkta olmalarını sağlar ki bu da spermatogenezis için gerekli sıcaklığın (34°C) oluşmasını sağlar. Skrotum sıcakta gevşeyip sarkmakta, soğukta ise büzüşerek toplanmakta olup bu durum düz kas liflerinin kontraksiyonu ile gerçekleşir (29, 30).

Testislerden her biri margo anterior ve margo posterior olarak adlandırılan iki kenara, fasies medialis ve lateralis olarak adlandırılan iki yüze, ekstremitas superior ve inferior olmak üzere de iki uca sahiptir (25, 29).

Testisler fetal yaşamda karın boşluğu arka duvarında retroperitoneal olarak gelişmekte, doğumdan önce canalis inguinalis'ten geçmek suretiyle skrotum içerisine inerler. Bu iniş esnasında karın boşluğunda kendilerini saran periton kesesi olan prosesus vaginalis'i de birlikte taşırlar. Doğumun ardından periton boşluğuyla ilişkisini kesen bu

bu kese tunika vajinalis ismini alır. Testisler dıştan içe doğru tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa olmak üzere üç tabaka ile çevrelenmiştir (25,27).

Tunika vajinalis skrotumun iç yüzeyini kaplayan lamina parietalis (periorchium) ve testisi saran lamina visseralis (epiorchium) şeklinde iki tabakaya sahip olup bu tabakalar arasındaki boşluk ise vajinalis boşluğu olarak adlandırılır ve vajinalis boşluğunda az miktarda seröz sıvı bulunur (26).

Tunika albuginea testisleri kaplayan mavimsi-beyaz renkte, kalın, fibröz kapsüldür, bu tabaka testisin arka kenarından içeri doğru testisin damar ve sinirlerinin giriş-çıkış yaptığı bölge olan mediastinum testis ile (Highmore korusu) devam etmektedir (28). Mediastinum testisten çıkan uzantılar septula testis olarak adlandırılmakta olup bunlar testis parankim dokusundan geçmek suretiyle tunika albuginea'nın iç yüzeyine ulaşır ve organı lobubli testis olarak adlandırılan 250-300 adet lopçuğa böler. Lobüller mediastinuma doğru daralmakta olup her bir lobuli testiste tubuli seminiferi kontorti ve tubuli seminiferi rektleri bulunur. Tubuli seminiferi kontortileri kaplayan bağ dokusu kan ve lenf damaları, sinirler ve Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) bakımından yoğundur. Tubuli seminiferi kontorti/seminifer tübül duvar yapısı, Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücreleri ihtiva eder (28).

Tubuli seminiferi kontortiler mediastinuma girerken birleşmek suretiyle tubuli seminiferi rektleri meydana getirmektedirler. Sayıları 20-30 kadar olup bu kanallar da mediastinum testise girerek burada rete testis adı verilen bir ağ meydana getirirler. Rete testisten 10-12 adet duktuli efferentes olarak adlandırılan küçük kanallar çıkmaktadır ve duktuli efferentesler de tunika albuginea'dan geçmek suretiyle epididimise girerler. Tunika vaskuloza tunika albuginea'nın iç yüzeyini kaplayan ve testisin damar ağından meydana gelen tabakadır (27).

2.1.3.1. Testis damarları, lenf dolaşımı ve sinirleri

Testisler a.testikularis ve v. testikularis isminde iki damar tipine sahiptir. Testisler aorta abdominalis'ten ayrılan a.testikularis'ler tarafından kanlandırılmakta olup bu arter ilk gelişme bölgesi olan bel bölgesinde aorta abdominalis'ten çıkarak aşağıya testislere doğru uzanmaktadır. Arterler testise geldikten sonra septalar vasıtasıyla interstisyumda dağılırlar. A.testikularis, funikulus spermatikus'la beraber testisin arka kenarı olan

margo posterior'dan organ içerisine girerek mediastinum testiste pek çok dala ayrılır (30). Testislerin venöz kanı v.cava inferior'a boşalmaktadır. V.testikularis, testis ile epididimisten çıkar ve venöz bir bağ olan plexus pampiniformis'i oluşturmak için birleşir. Plexus pampiniformis 8-12 venden meydana gelmekte olup funikulus spermatikus içerisinde duktus deferens'in önünde a.testikularis'i sarar. Plexus pampiniformis testisin ısı düzenleyici sisteminin bir parçası olarak bezin sabit ısıda olmasını sağlar. Sol v. testikularis plexus pampiniformis'ten çıkarak sol v. renalis'e dökülür, sağ v. testikularis'in kökeni benzer olmasına karşın v. kava inferior'a açılır (29,31).

Testisin lenf damarları yüzeysel ve derin olmak üzere iki grup olup bunlardan yüzeysel lenf damarları tunika vajinalis'in yüzeyinde, derin lenf damarları da testis ve epididimis'in içerisinde uzanır ve funikulus spermatikus'la beraber karın boşluğuna girerler (24,25).

Testisler otonom sinirler ile innerve olur, bunlar a.testikularis'in çevresindeki plexus testikularis'ten gelir. Plexus testikularis; 10. kafa çifti n. vagus'tan gelen parasempatik lifleri, medulla spinalis'in T10-11. segmentlerinden gelen sempatik ve visseral afferent lifleri içerir (25).

2.1.4. Testis Fizyolojisi

Testis dokusu ekzokrin ve endokrin fonksiyonları yerine getiren bir dokudur. Ekzokrin fonksiyonu seminifer tübüllerde spermiyogenezis ile spermiyumları üretmekte iken endokrin fonksiyonu ile de androjenler olarak bilinen erkeklik hormonları salgılanmaktadır (32).

Testislerin ana hormonu hipofiz bezi ön lobundan salgılanmakta olan lüteinleştirici hormonun (LH) etkisiyle Leydig hücrelerinde üretilen testosteron olup bu hormon testisin Leydig hücrelerinde kolesterolden sentezlenmektedir. LH'nin Leydig hücrelerini uyarması cAMP yoluyla olmakta olup cAMP kolesteril esterden kolesterol şekillenmesini artırmakta, protein kinazın aktive edilmesiyle de kolesterol pregnenolona dönüştürülmektedir. Kolesterolden pregnenolon sentezi mitokondrilerde gerçekleşmekte olup pregnenolon mitokondrileri terk ederek mikrozomal enzimler vasıtasıyla progesterona dönüştürülür. Leydig hücrelerinin granülsüz endoplazmik retikulumda

progesteron ilk olarak androstenediona, androstenedion da testosterona dönüştürülür (32, 33).

Testosteron hormonunun temel etki yeri prostat olup diğer pek çok dokuda 5α -redüktaz enzimi aracılığı ile dihidrotestosteron'a çevrilir. Dihidrotestosteron, dış genital organların gelişiminin uyarılmasında oldukça önemli etkiye sahiptir (34, 35).

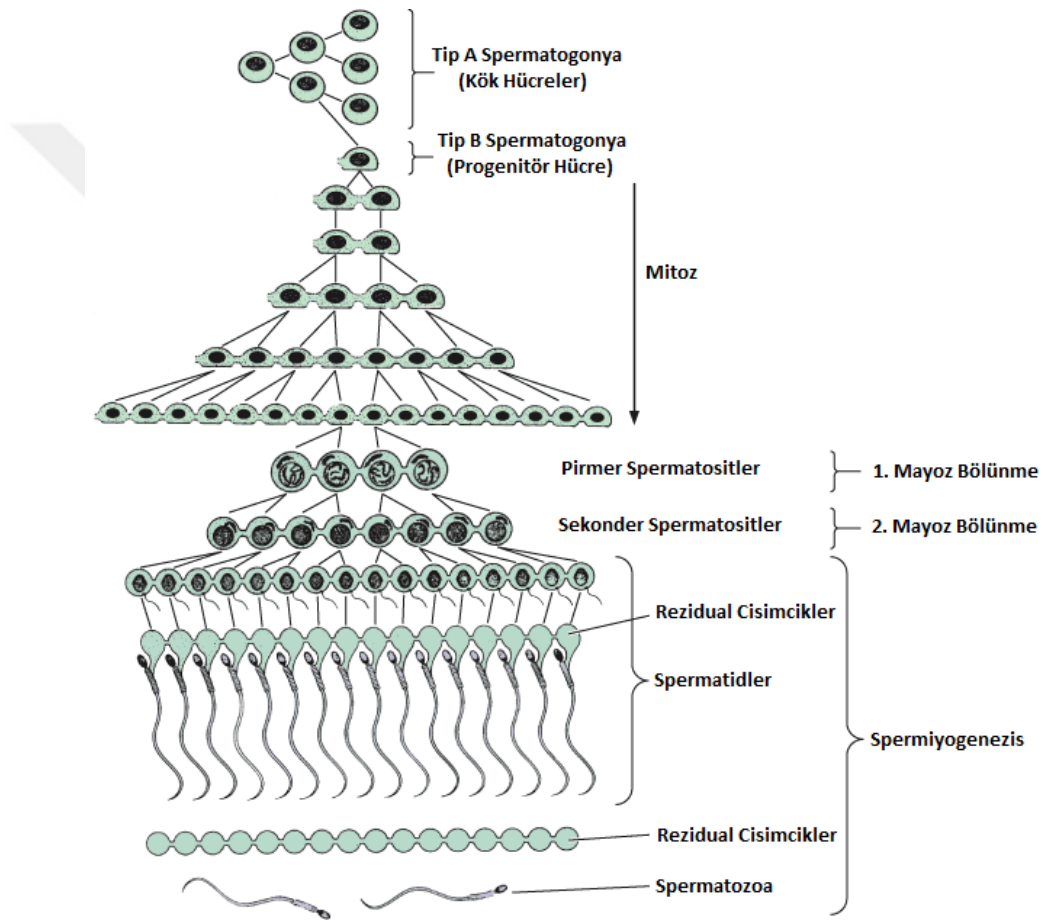
Doğumdan önceki aşamada testosteron hormonu mezonefrik kanalları uyarmak suretiyle erkek genital kanalların oluşumunu sağlamanın yanı sıra bu evrede aynı zamanda dihidrotestosteron da erkek dış genital organları olan penis ve skrotumun ve aynı zamanda prostatın gelişimini sağlar (36).

Ergenlik döneminde penis boyu ve enindeki büyüme, aksesuar bezlerin büyümesi ve salgı oluşturmaları, sesin kalınlaşması, sakal ve bıyık çıkması, pubik kıllanma ve genel olarak vücudun kıllanması, libido artışı, vücut yapısında maskülen gelişim gibi sekonder eşey özelliklerinin gelişmesi gibi durumlar testosteron hormonuyla ilişkili olan durumlardır. Erkek tipi kıl dağılımı ise dihidrotestosteron ile ilişkilidir. Testosteron hormonu aynı zamanda protein sentezini artırmakta, yıkımını azaltmakta ve büyüme hızını etkilemektedir. Kemik büyümesini sağlayan epifiz kısmına etki etmek suretiyle büyümesini durdurmaktadır. Aynı zamanda parakrin etkiyle testosteron hormonu Sertoli hücrelerinde spermatogenezisi devam ettirir (32, 34).

Hipotalamusun arkuat nükleusu, hipotalamo-hipofizeal portal kana gonadotropin salıcı hormon (GnRH) ve LH salgılaması yönünde uyarmaktadır (37). LH, Leydig hücrelerinden androjen salgılanmasını sağlamakta olup salgılanan testosteron hormonu belirli bir seviyenin üzerine çıktığında negatif geri bildirim düzeneği sayesinde hipotalamustan GnRH ve hipofiz bezinden de LH salınımını baskılar. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ise Sertoli hücrelerindeki reseptörler vasıtasıyla Sertoli hücrelerinden inhibin ve aktivin gibi glikoproteinik hormonların salgılanmasını sağlar. FSH bilhassa spermatogenezisi uyarmaktadır. İnhibin, hipofiz bezi ön lobundan FSH salınımını baskılamaktayken aktivin ise uyarmaktadır. Aynı zamanda embriyolojik gelişim esnasında Müller kanallarının gerilemesini sağlayan Müller Kanalı Baskılayıcı Madde de Sertoli hücrelerinden salgılanmaktadır (38).

2.2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler neticesinde hücre farklılaşmasıyla olgun sperm oluşması sürecidir (39, 40). Bu süreçte (Şekil 2.5) germ hücreleri mayoz sonrası 46 kromozomlu 2n (diploid) durumdan, 23 kromozomlu n (haploid) duruma geçerler ve yine 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresiyle birleşmek suretiyle 46 kromozomlu yeni bir bireyin oluşmasına imkan sağlarlar. Her aşamada hücreler spermatogonyum, spermatosit ve spermatid gibi farklı isimler almaktadırlar (41).



Sekil 2.5. Spermatogenez (44).

Seminifer tübül içerisinde spermatogenezin bütün aşamalarındaki sperm öncülü hücreler söz konusu olup farklılaşma aşamasını tamamlayan hücreler seminifer tübül içerisine bırakılır. Bu nedenle de testistin farklı kesimlerindeki farklı alanlarında gelişimin farklı evrelerindeki sperm üretimi devam etmekte ve farklılaşan hücreler gözlemlenebilmektedir (41).

İnsan vücudunun en kompleks hücrenel farklılaşma olayları arasında yer alan spermatogenez yaklaşık 64 günlük bir süreç olup olgun spermatozoonun ejakülatta görülmesi ise 74 gün almaktadır (43).

Spermatogenez “spermatositogenez”, “mayoz” ve “spermiyogenez” olmak üzere 3 bölüme ayrılmakta olup her bir vere kendine has özellik ve sorumluluklara sahiptir (44). Bu aşamalar aşağıda başlıklar halinde kısaca açıklanmıştır.

2.2.1. Spermatositogenez

Seminifer tübül bazal membranı üzerinde oturan spermatogonyumlar küçük diploid germ hücreleri olup puberteye dek bölünmezler. Spermatositogenez pubertede başlamakta olup spermatogonyumlar mitoz ile çoğalarak yerlerine yeni gelecek olan spermatogonyumları ve nihayetinde de primer spermatositleri meydana getirirler. Spermatogonyumlar ışık mikroskopunda yapılan incelemede nukleuslarının bariz koyu görünümleri ile ayırt edilmektedirler. Sitoplazmada nukleus çevresinde yerleşen ve 6µm çapındaki Lubarsch kristaloidleri mevcuttur. İnsan spermatogonyumları rutin histolojik peraparatlardaki görünümleri dikkate alınarak 3'e ayrılmaktadırlar:

1. **Koyu Tip A Spermatogonyumlar:** Seminifer epitelin kök veya rezerv hücreleridirler. Düzensiz aralıklar ile bölünmek suretiyle yeni koyu Tip A spermatogonyumları ve aynı zamanda açık Tip A spermatogonyumları oluştururlar.
2. **Açık Tip A Spermatogonyumlar:** Koyu tip hücreler ile aynı özelliklere sahip olan bu hücreler testosteron hormonu etkisiyle mitoz geçirerek çoğalırlar ve yeni açık Tip A hücreleri ve aynı zamanda Tip B hücrelerini oluştururlar.
3. **Tip B Spermatogonyumlar:** Açık Tip A spermatogonyumlara benzeyen bu hücreler mitoz sonucunda primer spermatositleri oluştururlar.

Bir koyu Tip A spermatogonyumun bölünmesiyle oluşan yeni hücreler sitoplazmik köprüler vasıtasıyla birbirlerine bağlı kalırlar, nukleusları tam olarak bölünse de sitoplazmaları tam manasıyla ayrılmadığı için oluşan hücreler inci dizileri gibi birbirlerine bağlıdırlar. Bu sitoplazmik bağlantılar spermatid olgunlaşmasının son dönemlerine dek sürer ve orijinal koyu Tip A hücresinden her bir kopyalamanın senkronize gelişimi ve hücrelerin birbirleriyle iletişimi için hayati önem arz eder. Aynı

zamanda bu sitoplazmik köprülerin hücreler arasında RNA ve protein değişimini kolaylaştırdığı da düşünülmektedir (43).

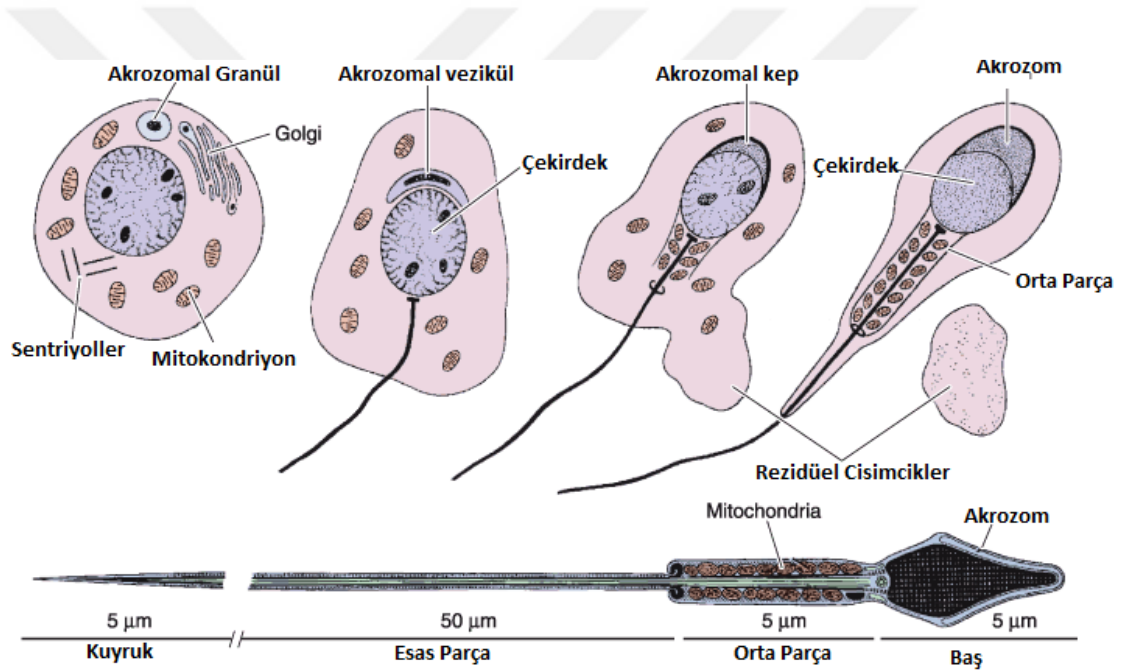
2.2.2. Mayoz

Tip B spermatogonyum mayotik profazın başladığını gösteren 2 adet preleptoten spermatozite mitoz bölünme ile farklılaşmakta olup bu hücreler bazal membrana yakın durmalarına karşın leptoten ve zigoten spermatozidler ise kan-testis bariyerinden hareket etmek suretiyle lümene doğru taşınmaktadırlar. Preleptoten, leptoten, zigoten spermatozidler seminifer tübülün özgün aşamalarında yer almakta olup rutin mikroskopi ile tanımlanabilmektedirler. Mayoz bölünme spermatogenezin uzun bir evresi olup seminifer tübülde yer alan germ hücre bölünmeleri 12 evrede meydana gelen 3 aşamada incelenir (44):

- 1) Mayoz I, $4n$ hücrelerin bölünmesi;
- 2) Birincil spermatozidlerden daha büyük olan ikincil spermatozidler düzenlenmesi ($2n$)
- 3) Mayoz II, $2n$ ikincil spermatozidler haploid (n) yuvarlak spermatidlere bölünmesi

2.2.3. Spermiyogenez

Spermatidler 8µm çapında, küçük yuvarlak haploid hücreler olup tek bir açık Tip A spermatogonyumdan meydana gelen tüm spermatidler intersellüler köprüler vasıtasıyla birbirlerine bağlıdırlar. Bir spermatid oluştuktan sonra tekrar bölünmez. Dolayısıyla haploid spermatidler olgun spermium oluşturacak olan spermiyogenez sürecine girerler. Yoğun bir dönüşümün gerçekleştiği bu aşamada nukleus karakteristik şeklini almakta olup artık sitoplazma kaybolur, akrozom ve kuyruk gelişir. Bu aşama insanlarda 16-22 gün kadar devam eder. Spermatidlerin farklılaşması daha önceki bölümler de ifade edildiği gibi “golgi evresi”, “şapka evresi”, “akrozomal evre” ve “olgunlaşma evresi” olmak üzere 4 aşamada gerçekleşir (Şekil 2.6).



Sekil 2.6. Spermatositogenezis (44).

2.3. Sperm Hazırlama Yöntemleri

Sperm hazırlamada çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Sperm örneği bu yöntemler ile laboratuvar ortamında pek çok aşamadan geçirilerek hazırlanmakta olup bu işlemler ile hareketliliği (motilite) ve morfolojisi iyi olan spermelerin seçilebilmesi sağlanabilir. Seminal plazma, ölü ya da zarar görmüş anormal spermatozoa, olgun olmayan germ hücreleri, bakteri, hücresel rezidüer ve beyaz küreler uzaklaştırılmaktadır. Yukarıda da ifade edildiği gibi sperm hazırlamada kullanılan birçok yöntem söz konusu olup bunlar Tablo 2.1’de görülmektedir (3,45). Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanları standart sperm yıkama (SSW), klasik swim-up (SWU) ve dansite gradient sentrifügasyondur (DGS) (3,46).

Tablo 2.1. Sperm Hazırlama Yöntemleri

— Standard Sperm Yıkama
— Migrasyon
• Swim up
• Migrasyon sedimantasyon
• Albumin sütunlarına doğru <i>swim-down</i>
Filtrasyon Yöntemleri
• <i>Glass-wool column</i> filtrasyonu
• <i>Glass-Bead</i> seperasyonu
• <i>Sephadex</i> sütunları
• Transmembran migrasyon
— Dansite gradient santrifügasyon
• Ficoll ile sperm tuzağı
• <i>Nycodenz</i> gradient
• Percoll
• <i>Percoll</i> sonrası ürünler
1. Puresperm
2. Isolate gradient
3. Ixaprep
4. PureCeption
5. Purewash
6. <i>Silselect</i>

2.3.1. Standart Sperm Yıkama

Bu yöntem ile semenden en yüksek sayıda toplam hareketli sperm elde edilmektedir. Fakat hazırlanan örneğin son hali hareketli, hareketsiz ve olgun olmayan spermelerin karışımı şeklindedir. Spermatozoa dışı hücresel elementlerde sıkça bulunduğu için intrauterin inseminasyon sonuçlarını negatif yönde etkileyebilir. Likefaksiyon sonrası

semen santrifüj tüpüne konur. Toplam hacim 10ml olacak şekilde kültür solüsyonu tüpe ilave edilir ve karıştırılır. Karışım 400 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılır. Karışıma kültür solüsyonu 10ml olacak şekilde yeniden ilave edilerek santrifüj işlemi 400 g'de 10 dakika boyunca tekrarlanır. Süpernatant atılarak dipte kalan kısma 0.5ml kültür solüsyonu ilave edilerek örnek intrauterin inseminasyon için hazır hale getirilir (46).

2.3.2. Swim-up yöntemi

Bilinen en eski ve en yaygın olarak kullanılan sperm hazırlama yöntemi olup belirli bir solüsyon içerisine konulan sperm örneğinde iyi kalite, hareketliliği yüksek spermelerin yüzerek yüze çıkması temeline dayanmaktadır. Bir mililitre sperm örneği tüp içerisine konular, üzerine 4ml kültür solüsyonu ilave edilerek karıştırılır. Daha sonra 500 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım uzaklaştırılır. Karışım başka bir 4ml'lik kültür solüsyonu içerisine konular. Yeniden 250 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Kültür solüsyonu 1ml olacak şekilde ilave edilerek test tüpü 45 derece eğimli bir şekilde 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılır. Sonuçta üst kısımdaki 500µl solüsyon içerisinde toplanan hareketli ve kaliteli sperm kısmı alınarak temiz bir tüpe konular, inceleme ve intrauterin inseminasyon için hazırlanır. Swim up yöntemi kolay uygulanabilir, ucuz, motilitesi oldukça yüksek olan (çoğu >%90) temiz örnek elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu avantajların yanı sıra bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu yöntem yalnızca sperm sayısı ve hareketliliği iyi olan örnekler için kullanılabilir. Aynı zamanda işlem sonrası örnek hacmi az olup spermatozoa reaktif oksijen radikallerinden zarar görebilir (3).

2.3.2. Migrasyon-Sedimentasyon Yöntemi

Migrasyon sedimentasyon yöntemi Tea ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir spermatozoa ayırma tekniğidir. Prensipte swim up tekniğinin sedimentasyon ile birleştirmiş halidir. Geleneksel swim up prosedürünün aksine spermatozoa direk olarak likefiye olmuş semenden elde edilir. İç kısmında bir koni bulunan özel cam veya plastik tüplerde bu işlem gerçekleştirilir. Supernatant medyumun içerisine göç eden spermatozonlar kısa bir zaman diliminde iç bölgedeki koniye çökerler. Dolayısıyla bu metot santrifüje maruz bırakıldıktan sonra swim up tekniği ile spermatozoa elde edilen

geleneksel yöntem ile santrifüjün etkilerini görmek amacıyla bir karşılaştırma yapılabilir (47).

2.3.4. Dansite gradient santrifügasyon yöntemi

Bu yöntemde en yaygın olarak Percoll solüsyonu kullanılmaktaydı. Fakat bu solüsyonun toksisitesinden ötürü günümüzde kullanılmamakta, bunun yerine *SpermGrad*, *IxaPrep*, *Puresperm*, *Silselect*, *Isolate* vb kullanılabilir. Percoll, PVP'ye kaplanmış 15-30nm çaplı koloidal silika partiküllerinden meydana gelmektedir. Olgun spermier solüsyondan daha yüksek gradientte olduklarından alt tabakada toplanmakta, olgun olmayan spermier ise üst tabakada toplanmaktadır. Gradient işlemi için sperm likefiye olması için 20 dakika boyunca bekletilir, 15ml'lik tüpte ejakülat hacmine eşdeğer olmak üzere yıkama sıvısı ilave edilir. 400g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve 0,5ml yıkama çözeltisi pellete ilave edilerek yeniden karıştırılır. Sperm konsantrasyonunun uygun gradient tabakaları 0,5 ml konularak hazırlanır. Bunun üzerine yıkanmış 0,5ml sperm ilave edilerek 300 g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilir. Sonrasında ise dipte kalan pellet pastör pipetiyle aspire edilerek üzerine 4ml yıkama solüsyonu konur ve 1800g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir, süpernatant kısmı uzaklaştırılıp 4ml yıkama solüsyonu katılarak 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet miktarına göre solüsyon katılarak işlem için hazır hale getirilir. Bu yöntemle hareketliliği iyi olan temiz sperm örneği elde edilmekte olup ejakülatta az sayıda sperm olduğunda en uygun yöntemdir. Örnekten lokositler büyük oranda elimine edilmekte, reaktif oksijen radikaller azalmakta, elde edilen sperm örneği de yeterli olmaktadır. Farklı solüsyonlar kullanılması sebebiyle zaman alıcı ve maliyetli bir yöntemdir. Aynı zamanda endotoksin riski söz konusu olup percoll spermatozoa için zararlı olabilir (3).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi ve Eğitim (ÜYTE) Merkezi'ne infertilite tedavisi için başvuran progresif ileri hareketli motilitesi %10'un üzerinde olan hastaların semen örneklerinden, tedavisi için gerekli kısım ayrıldıktan sonra kalan atık kısım dâhil edildi. Yapılan çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden etik kurul kararı alındı (Ek-1) ve çalışmaya katılacak gönüllülere çalışma hakkında bilgilendirilmeleri için hazırlanan form okutulup onaylatıldı (Ek-2).

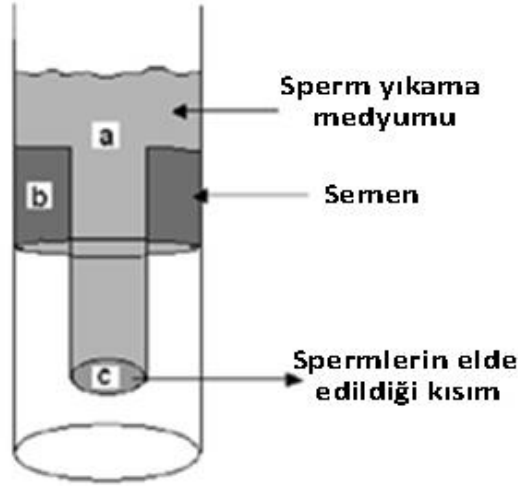
Çalışmaya dahil edilen gönüllülerden steril, kapaklı kaplara mastürbasyon yöntemiyle semen örnekleri alındı ve 30 dakika 37°C sıcaklıkta likefaksiyon için inkübe edildi. Likefaksiyon Pastör pipeti ucunda semenin ipliksi uzaması ile kontrol edildi. Likefaksiyon süresi 30 dakikayı aşan örnekler 30 dakika daha inkübe edildi. Bu süre içinde likefaksiyon oluşmayan örnekler çalışma dışında bırakıldı.

Likefiye olmuş semen örnekleri konsantrasyon tayini için Makler sayma kamarasında değerlendirildi. Çalışmaya 22 gönüllü dâhil edildi.

Hastanın tedavisinde kullanılacak miktar ayrıldıktan sonra kalan semen 2 gruba ayrıldı. Birinci gruba santrifüj-gradient-swim-up; SGS yöntemi uygulanırken ikinci gruba migrasyon-sedimentasyon; MS yöntemi uygulandı.

Birinci grup için 15 ml hacimli santrifüj tüplerine %80 ve %40'luk silika partikülü içeren gradient medyumlarından 0,5'er ml'lik sıvı sütunları hazırlandı (PureSperm 40/80, Nidacón, Göteburg, İsveç). Likefiye semen bu sıvı sütunlarının üzerine dikkatlice yayıldı ve 400 g hızda 10 dakika santrifüj yapıldı (gradient yöntemi). Santrifügasyondan sonra oluşan supernatan atıldı, pellet üzerine 2 ml sperm yıkama medyumu (SpermRinse, Vitrolife, Göteburg, İsveç) eklenerek pipetaj ile pellet kaldırıldı ve tekrar 400 g'de 10 dakika santrifüj edilerek spermatozoonlar yıkandı. Santrifüj sonrasında supernatantın 1 ml'lik kısmı uzaklaştırıldı ve tüp içerisinde kalan 1 ml supernatant ile pellet 30 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edilerek spermatozoonların pelletten yukarıya yüzmeleri sağlandı (swim-up yöntemi). Bu sürenin sonunda supernatantın 700 µl'si mikropipet yardımıyla temiz bir tüpe aktarıldı ve deneysel çalışmalarda kullanıldı.

İkinci grup için Şekil 3.1'deki migrasyon sedimentasyon (MS) tüpü (RI MSC, Research Instruments, Cornwall, Birleşik Devletler) kullanılarak spermlerin santrifüj edilmeden eldesi sağlandı. Bu amaçla, mikropipet yardımıyla likefiye semenden 400µl alınarak MS tüpünün dış odacığına dikkatlice yayıldı (Şekil 3.1'de "b" olarak gösterilen kısım).



Şekil 3.1. Migrasyon sedimentasyon tüpüne örneklerin yüklenmesi ve sperm eldesi

Daha sonra 5ml'lik steril bir enjektörle tübün orta aksından geçip taban kısmından (Şekil 3.1'de "c" olarak gösterilmiştir) başlayacak şekilde, 2ml sperm yıkama medyumu, dış hazneye yayılmış semeni kaplayacak tarzda (Şekil 3.1'de "a" olarak gösterilmiştir) yavaşça eklendi. Ardından 30 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edilerek migrasyon sedimentasyon yöntemi uygulandı. Bu sürenin sonunda MS tüpünün tabanından, orta aks boyunca bir mikropipetör geçirilerek 700 µl'lik medyum temiz bir tüpe aktarıldı ve deneysel çalışmalarda kullanıldı.

Her iki gruba da aşağıdaki testler uygulandı ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı:

1. Makler sayma lamında hareketlilik ve konsantrasyon değerlendirmesi,
2. Diff Quick hızlı boyama yöntemi ile morfoloji tayini,
3. Eosin-nigrosin boyası ile canlılık tayini,
4. Sperm kromatin saçılma testiyle DNA fragmentasyonu tayini,
5. Anilin mavisi boyası ile persiste histon tayini testleri yapıldı.

3.1. Makler Kamarada Hareketlilik ve Konsantrasyon Tayini

Deney gruplarından alınan 10'ar µl'lik örnekler Makler sayım kamarasının odacığına konup sayma lamı kapatılarak 10 µm kalınlığında yayma oluşturuldu. Işık mikroskopunda 200'lük büyütme altında Makler kamaranın odacığına tek katman olarak yayılan spermatozoonlar peşpeşe 10 karede sayıldı. Peşpeşe 10 karelik alanlardan 3 farklı bölgeden sayım yapılarak ortalaması alındı ve mililitre başına düşen milyon adet spermatozoon derişimi tespit edildi. Daha sonra hareketlilik tayini de DSÖ el kitabında belirtildiği şekilde kaydedildi (48).

3.2. Morfoloji Değerlendirmesi

Spermatozoon morfolojisinin ışık mikroskopik düzeyde değerlendirilmesi Diff Quick boyama yöntemiyle yapılmıştır (MGG boyama kiti, katalog numarası: 500101, Mediko Kimya Ltd. Şti., İstanbul, Türkiye). Boyalı preparatlarda en az 200 spermatozoon, Kruger'in *strict* kriterlerine göre değerlendirilmiştir (49). Her gruptan iki preparat olacak şekilde lamlara 20 µl spermatozoon süspansiyonu yayıldı. Hazırlanan preparatlar oda ısısında kurutuldu. Ardından preparatlara sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

Boyama içerisindeki reaktifler;

- A. Fiksatif çözeltisi; 1 dakika
- B. Eosine çözeltisi; 1 dakika
- C. Thiazine çözeltisi; 1 dakika uygulandı.

Her bir geçiş aşamasında preparat üzerindeki fazla çözeltinin akması için preparat birkaç saniye dik bir şekilde havada tutuldu. Preparatlar en son basamaktan sonra şale içerisindeki distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Örneklerin değerlendirilmesi bir sonraki gün yapıldı. Preparatlar 100 büyütme altında incelendi. Her bir grupta 200 adet spermatozoon değerlendirildi. Baş, orta parça, akrozom ve kuyruk morfolojisinde normal görünüme sahip olanlar yüzde cinsinden normal morfolojiye sahip olan spermatozoon olarak kaydedildi.

3.3. Canlılık Değerlendirmesi

Spermatozoon canlılık testi tek basamaklı eozin-nigrozin boyama tekniği ile yapıldı (50). Binde dokuzluk NaCl'li distile su içerisinde %0.67 eozin Y ve %10 nigrozin kaynatılarak çözüldü, oda sıcaklığına soğutulduktan sonra filtre edildi. Hazırlanan boyanın 20 µl'si 20 µl spermatozoon süspansiyonu ile 30 saniye süresince karıştırıldı. Karışım lama yayıldı, havada kurumaya bırakıldı. Havada kurutulduktan sonra preparatlar 100x objektif altında incelendi. Her bir gruptan 200 adet spermatozoon sayıldı. Sağlam sitoplazma zarına sahip canlı spermatozoonlar eozini sitoplazmalarına geçirmediğinden bu hücreler nigrozinle boyanan zeminde beyaz olarak; ölü spermatozoonlar ise pembe olarak izlendi (Resim-2). Yüzde cinsinden canlı spermatozoonlar hesaplandı.

3.4. Sperm DNA Fragmantasyonu Tayini

Sperm Kromatin Saçılma Testi için kit içinden çıkan çözeltilerle, kitin uygulama kılavuzu esas alınarak deneyler yapıldı (Halotech, Halosperm kit, Fina Biotech., Madrid, İspanya). İşleme başlamadan önce tüp içerisinde hazır olarak bulunan agaroz jel tüpleri mikro dalga fırında maximum sıcaklıkta 15 saniye eritildi. Eriyen jel tüpleri 37°C inkübatör içine yerleştirilmiş sıcak su banyosunda ısının eşit dağılması için bekletildi. Deney gruplarından 15'er µl spermatozoon süspansiyonu iki ayrı tüpteki 50 µl jel içerisine alındı. Oluşan jel-örnek karışımından 15 µl örnek kit içerisine temin edilen özel lam üzerine alındı ve lamel ile kapatılarak 5 dakika +4°C de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında lam üzerine kapatılan lameller kaldırıldı ve sırasıyla şu basamaklar uygulandı,

1. 7 dakika denaturasyon solusyonu içerisine alındı,
2. 25 dakika lysis solusyonuna bırakıldı,
3. 5 dakika distile suda yıkandı,
4. 2 dakika %70 etil alkol,
5. 2 dakika %90 etil alkol,
6. 2 dakika %100 etil alkol serilerinden geçirilerek kurumaya bırakıldı.

Kuruyan örnekler;

1. 15 dakika Eosin
2. 15 dakika Thiazine solüsyonunda boyandıktan sonra kurumaya bırakıldı.

Örneklerin değerlendirmesi bir sonraki gün yapıldı. Preparatlar 100X büyütmede incelendi. Her bir gruptan 100 adet spermatozoon sayıldı. Yüzde cinsinden sperm kromatin saçılması göstermeyen (DNA fragmantasyonu mevcut) spermatozoonlar hesaplandı.

3.5. Anilin Mavisi Boyama ile Persiste Histon Tayini

Anilin mavisi boyası; 0,5 gr anilin mavisi, 2,48 ml distile su ve 3,2 ml glasiyal asetik asit karışımıyla hazırlandı. Her iki yöntemle elde edilen spermatozoon örneklerinden 20 µl'si lama yayıldı. Havada kurumaya bırakıldı. Kuruyan rnekler 5 dakika Anilin mavisi solüsyonunda bekletilerek boyama yapıldı. Ardından distile suda yıkanan örnekler havada kurumaya bırakıldı. Örneklerin değerlendirmesi bir sonraki gün yapıldı. Preparatlar 100x büyütmede incelendi. Her bir gruptan 200 adet spermatozoon sayıldı. Yüzde cinsinden boyayı hücre içine alarak persiste histon açısından pozitif sonuç veren spermatozoonlar hesaplandı.

İstatistik

Yapılan alışmada SPSS paket programıyla tanımlayıcı istatistikler yapılmış, grup karşılaştırmalarında Wilcoxon testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen hastaların yaş ortalaması 34.63 ± 10.66 , ortalama semen hacmi 3.37 ± 2.12 ml, ortalama spermatozoon konsantrasyonu 129.42 ± 108.21 milyon/ml idi. Örneklerde ortalama a grubu ileri hareketli spermatozoon $\%44.26 \pm 14.14$, b grubu yerinde hareketli spermatozoon $\%13.47 \pm 4.68$, c grubu hareketsiz spermatozoon $\%42.42 \pm 13.18$ bulunmakta idi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmaya Dâhil Edilen Hastaların Yaş ve Seminal Parametrelerinin Ortalama Değerleri

	Ort.±SS
Yaş	34.63 ± 10.66
Hacim	3.37 ± 2.12
Konsantrasyon	129.42 ± 108.21
a grubu ileri hareketli	$\%44.26 \pm 14.14$
b grubu yerinde hareketli	$\%13.47 \pm 4.68$
c grubu hareketsiz	$\%42.42 \pm 13.18$

4.1. Hareketlilik ve Konsantrasyon

Santrifüje maruz bırakılan örneklerde (n=19) işlem sonrası spermatozoon konsantrasyonu 2.80 ± 3.06 milyon/ml, a grubu ileri hareketli spermatozoon $\%75.84 \pm 29.03$, b grubu yerinde hareketli spermatozoon $\%8.11 \pm 11.29$, c grubu hareketsiz spermatozoon $\%16.05 \pm 27.18$ olarak hesaplandı.

Migrasyon sedimentasyon yöntemi uygulanan örneklerde işlem sonrası spermatozoon konsantrasyonu 3.25 ± 2.87 milyon/ml, a grubu ileri hareketli spermatozoon $\%77.38 \pm 21.84$, b grubu yerinde hareketli spermatozoon $\%9.58 \pm 7.54$, c grubu hareketsiz spermatozoon $\%13.05 \pm 22.27$ olarak hesaplandı.

Bu iki yöntemle göre hazırlanan örneklerin hareketlilik ve konsantrasyon karşılaştırmasına göre istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. İşlemler sonrası konsantrasyon ve motilite değerleri

	Santrifüj sonrası Ort.±SS	Migrasyon Sedimentasyon Sonrası Ort.±SS	p değeri
Konsantrasyon	2.80 ± 3.06	3.25 ± 2.87	0.190
a grubu ileri hareketli	$\%75.84 \pm 29.03$	$\%77.38 \pm 21.84$	0.845
b grubu yerinde hareketli	$\%8.11 \pm 11.29$	$\%9.58 \pm 7.54$	0.348
c grubu hareketsiz	$\%16.05 \pm 27.18$	$\%13.05 \pm 22.27$	0.887

4.2. Morfoloji Değerlendirmesi

Santrifüje maruz bırakılan örneklerde işlem sonrası normal morfolojiye sahip spermatozoon %12.19±6.45, migrasyon sedimentasyon yöntemi uygulanan örneklerde işlem sonrası normal morfolojiye sahip spermatozoon %10.67±5.44 olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel önemli bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. İşlemler sonrası morfoloji sonuçları

	Santrifüj sonrası Ort.±SS	Migrasyon Sedimentasyon Sonrası Ort.±SS	p değeri
Normal morfolojiye sahip spermatozoon oranı	% 12.19±6.45	% 10.67±5.44	0.220

Baş, orta parça, akrozom ve kuyruk morfolojisinde normal görünümüne sahip olanlar yüzde cinsinden normal morfolojiye sahip olan spermatozoon olarak kaydedildi (Resim 4.1-4.3).



Resim 4.1. Normal baş, boyun, akrozom ve kuyruk yapısına sahip spermatozoon morfolojik görüntüsü (Diff Quick boyası 100X objektif)



Resim 4.2. Normal baş, boyun, akrozom ve kuyruk yapısına sahip spermatozoa morfolojik görüntüsü (Diff Quick boyası 100X objektif)

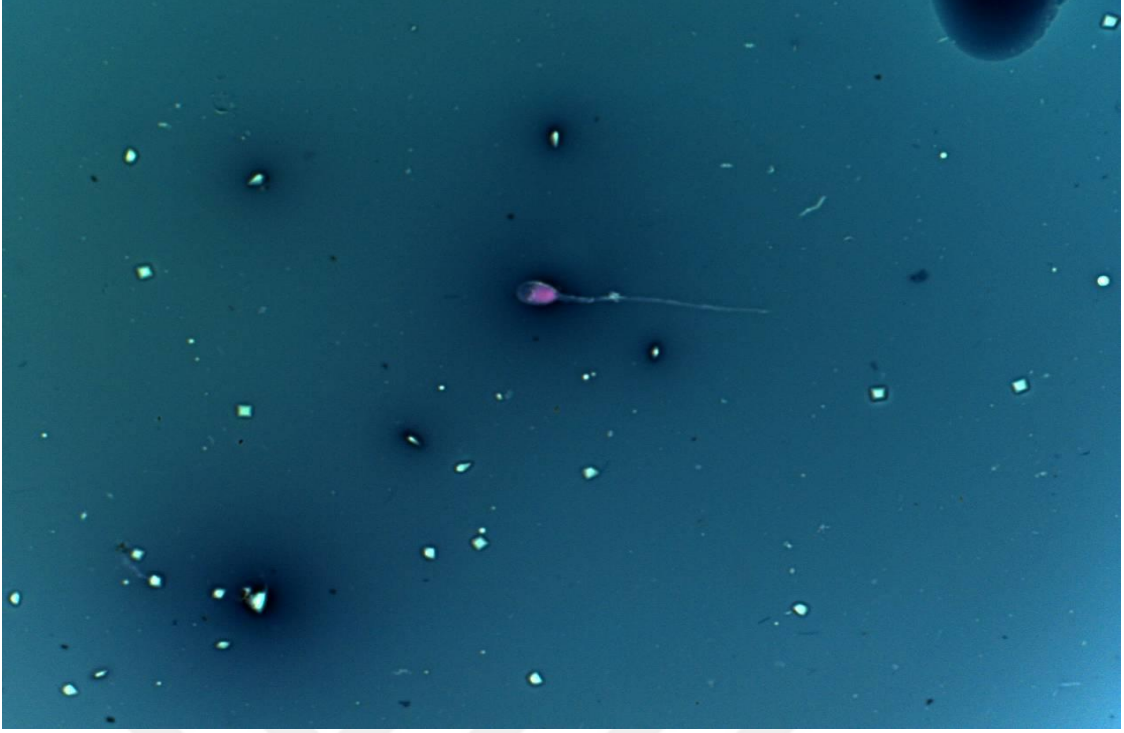
4.3. Canlılık Değerlendirmesi

Santrifüje maruz bırakılan örneklerde işlem sonrası spermatozoon canlılık oranı %74.09±16,65, migrasyon sedimentasyon yöntemi uygulanan örneklerde (n=22) işlem sonrası spermatozoon canlılık oranı %70.45±16,78 olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel fark anlamlı değildi. ($p>0.05$) (Tablo 4.4).

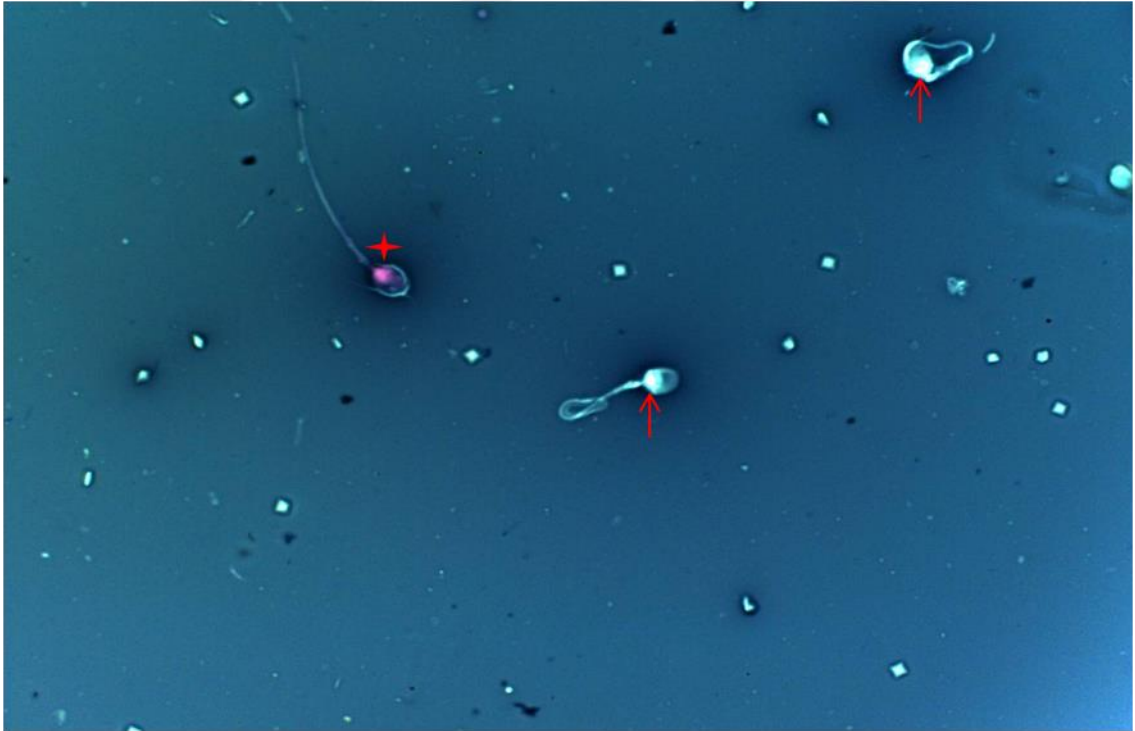
Tablo 4.4. İşlemler sonrası canlılık sonuçları

	Santrifüj sonrası Ort.±SS	Migrasyon Sedimentasyon Sonrası Ort.±SS	p değeri
Canlı spermatozoon yüzdesi	%74.09±16.65	%70.45±16.78	0.333

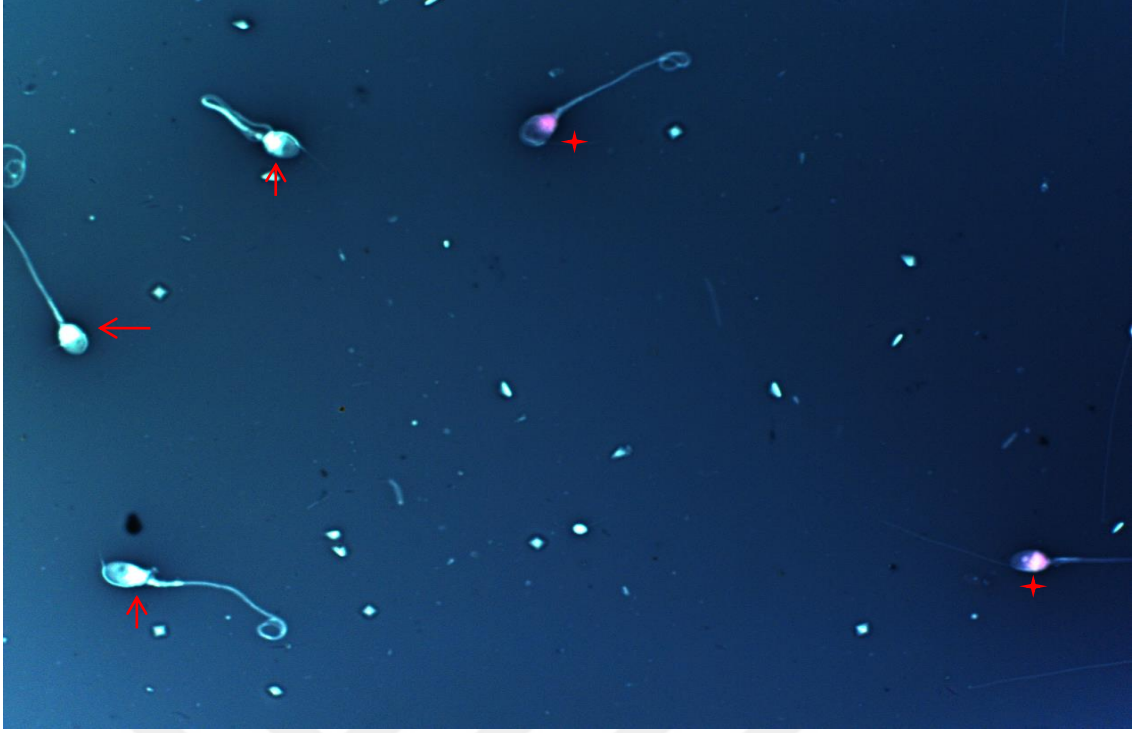
Sağlam sitoplazma zarına sahip canlı spermatozoonlar eozini sitoplazmalarına geçirmediğinden bu hücreler nigrozinle boyanan zeminde beyaz olarak; ölü spermatozoonlar ise pembe olarak izlendi (Resim 4.3.-4.5).



Resim 4.3. Hücre içerisine boya alarak pembemsi görüntü oluşturan canlılığını yitirmiş spermatozoon görüntüsü (eozin-nigrozin boyama 100X objektif)



Resim 4.4. Yıldız: Pembe boyanmış ölü spermatozoon, Oklar: Boya almamış canlı spermatozoa (eozin-nigrozin boyama 100x objektif).



Resim 4.5. Yıldız: Pembe boyanmış ölü spermatozoon, Ok: Boya almamış canlı spermatozoa (eozin-nigrosin boyama 100x objektif).

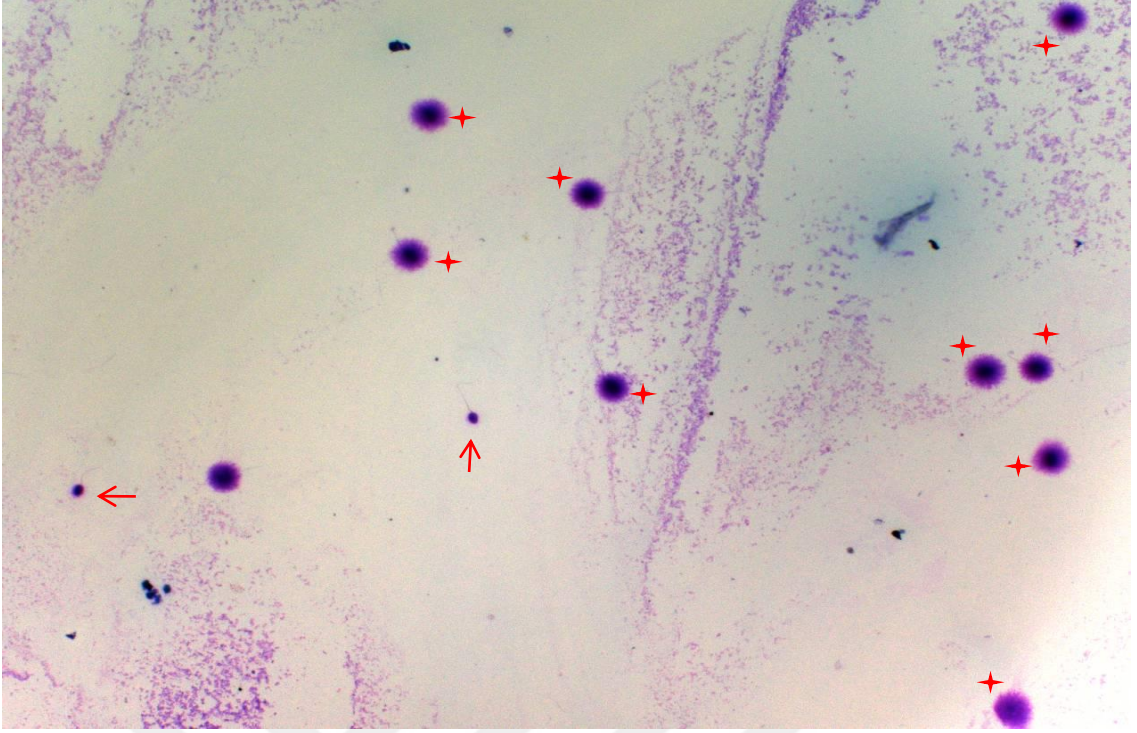
4.4. Sperm DNA Fragmantasyonu

Santrifüje maruz bırakılan örneklerde işlem sonrası DNA fragmantasyonu olan sperm %3.91±3.96, migrasyon sedimentasyon yöntemi uygulanan örneklerde (n=22) işlem sonrası DNA fragmantasyonu olan sperm %2.95±3.33 olarak sayıldı. İki grup arasında istatistiksel önemli bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Tablo 4.5).

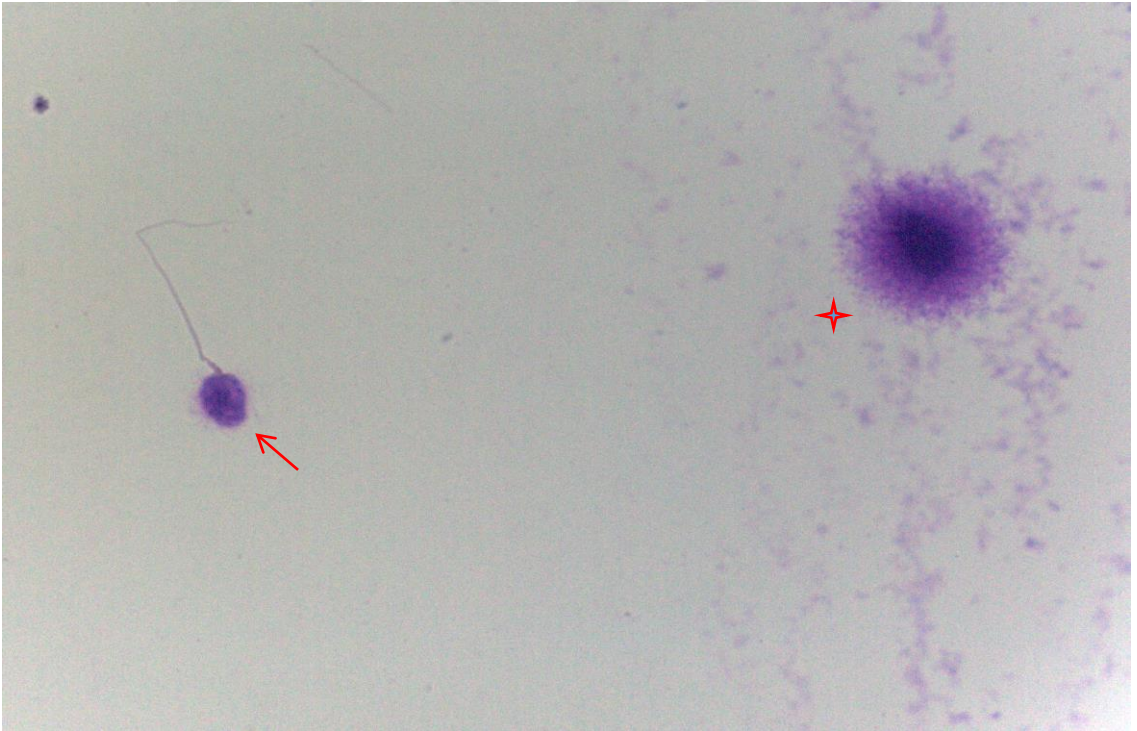
Tablo 4.5. İşlemler sonrası DNA fragmantasyonu sonuçları

	Santrifüj sonrası Ort.±SS	Migrasyon Sedimentasyon Sonrası Ort.±SS	p değeri
DNA fragmantasyon oranı	%3.91±3.96	%2.95±3.33	0.213

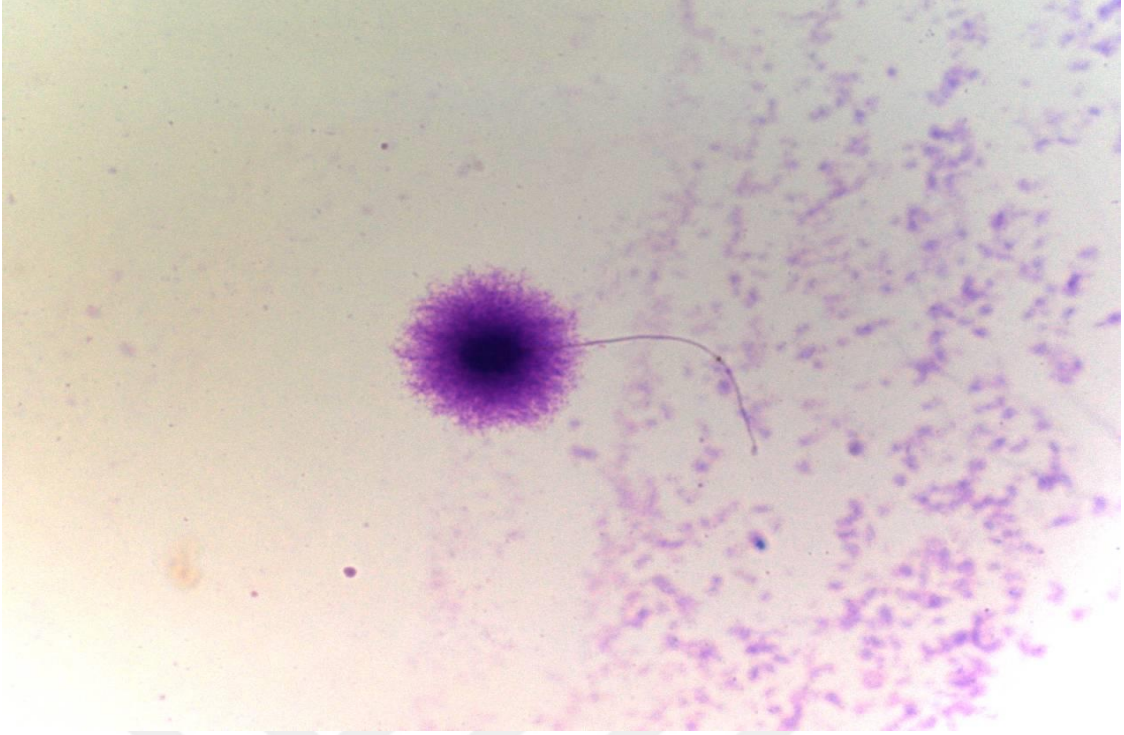
Yüzde cinsinden sperm kromatin saçılması göstermeyen spermatozoonlar hesaplandı (Resim 4.6-4.9).



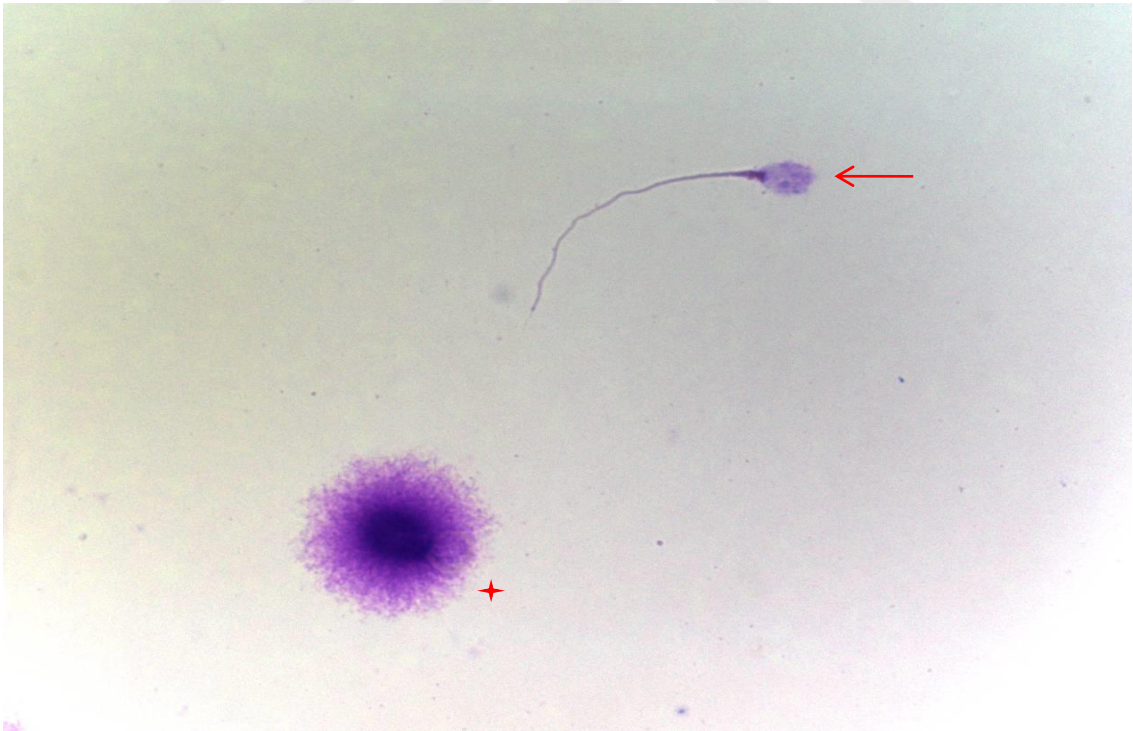
Resim 4.6. Sperm kromatin saçılma testinde normal (yıldız) ve DNA kırığına sahip anormal sperm görüntüsü (ok) (20X objektif)



Resim 4.7. Sperm kromatin saçılma testinde normal (yıldız) ve DNA kırığına sahip anormal sperm görüntüsü (ok) (100X objektif)



Resim 4.8. Sperm kromatin saçılma testinde normal sperm görüntüsü (100X objektif)



Resim 4.9. Sperm kromatin saçılma testinde normal (yıldız) ve DNA kırığına sahip anormal sperm görüntüsü (ok) (100X objektif)

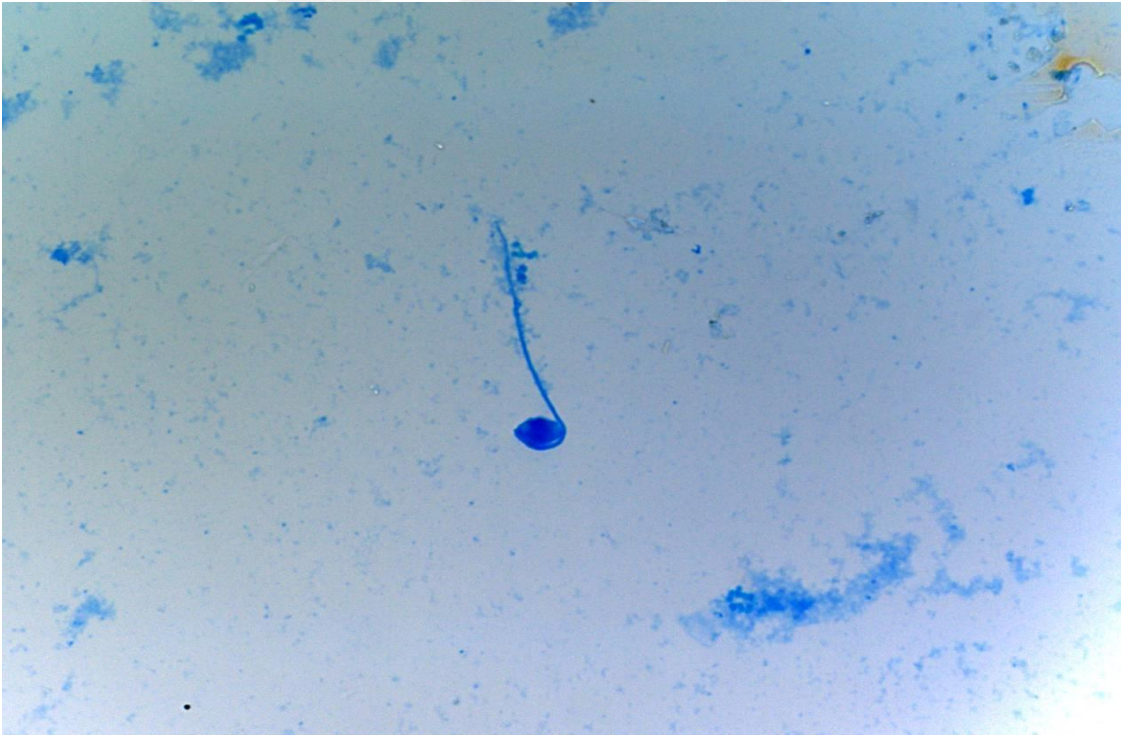
4.5. Anilin Mavisi Boyama ile Persiste Histon Değerlendirmesi

Santrifüje maruz bırakılan örneklerde işlem sonrası persiste histon içeriği olan spermiler %10.59±13.40, migrasyon sedimentasyon yöntemi uygulanan örneklerde (n=22) ise %8.86±7.89 olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05) (Tablo 4.6)

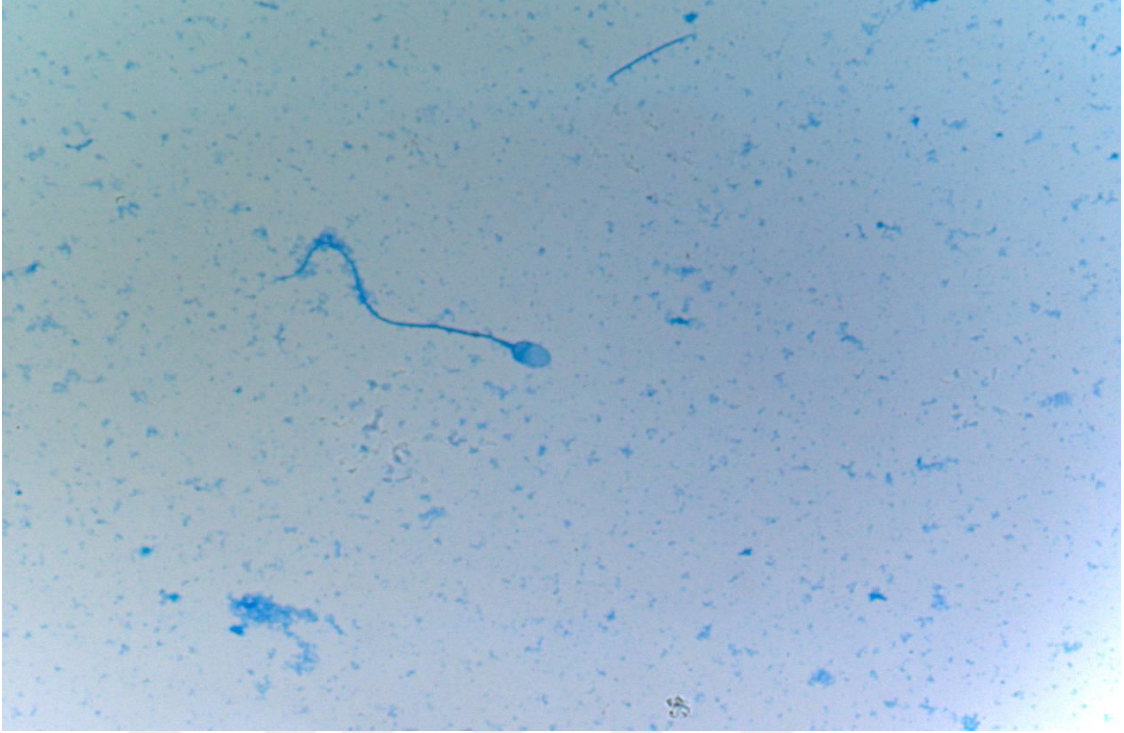
Tablo 4.6. İşlemler sonrası Persiste Histon Değerleri

	Santrifüj sonrası Ort.±SS	Migrasyon Sedimentasyon Sonrası Ort.±SS	p değeri
Persiste histon oranı	%10.59±13.40	%8.86±7.89	0.613

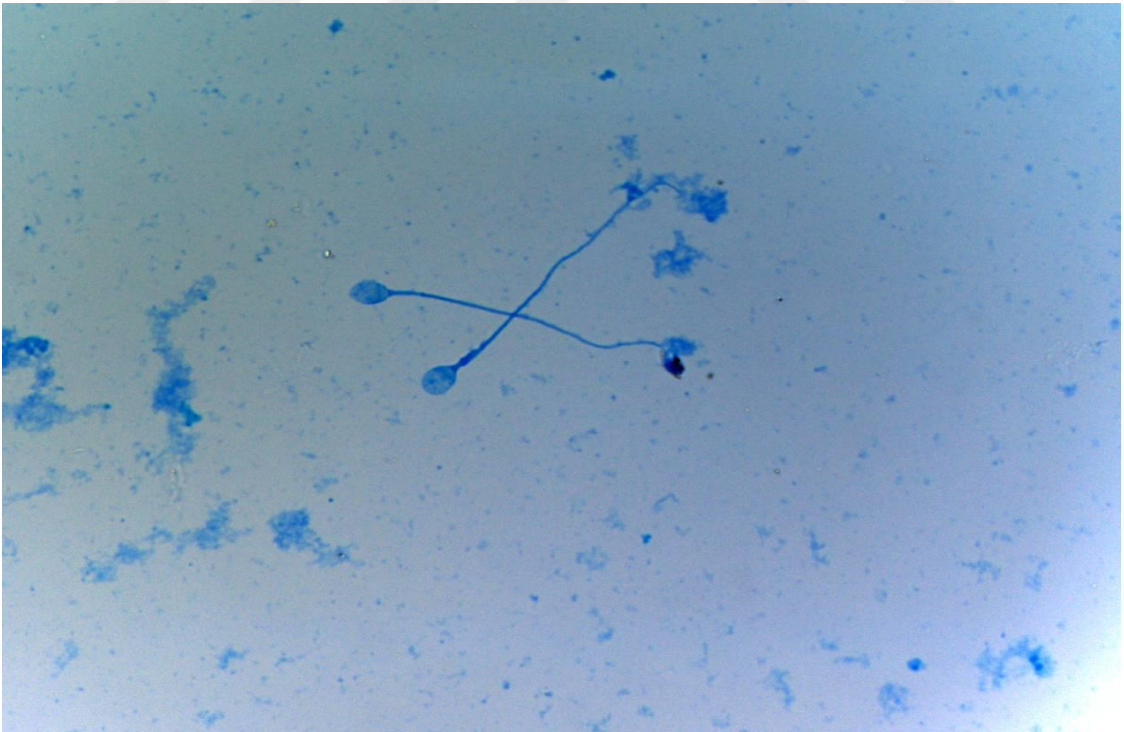
Yüzde cinsinden boyayı hücre içine alarak pozitif sonuç veren spermatozoonlar hesaplandı (Resim 4.10-4.12).



Resim 4.10. Anilin mavisi ile boyalı yayma preparatlarında histon-protamin değişimi gerçekleşmeyen anormal sperm koyu renkte görünmekte (100X objektif)



Resim 4.11. Anilin mavisi ile boyalı yayma preparatlarında persiste histon bulunmayan normal sperm boyayı almamıştır (100X objektif)



Resim 4.12. Anilin mavisi ile boyalı yayma preparatlarında persiste histon bulunmayan 2 adet normal sperm boyayı almamıştır (100X objektif).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerek doğal konsepsiyonda, gerekse yardımla üreme işlemlerinde, sperm hücrelerinin kalitesi embriyo gelişimi, gebelik oluşumu ve gebeliğin devamlılığı üzerinde doğrudan etkilidir (51). Bu nedenle sperm kalitesini ve yapısını bozan hücrel ve çevresel faktörlerin ortaya konması önem taşımaktadır. In vitro fertilizasyon, mikroenjeksiyon ve intrauterine inseminasyon (aşılama, IUI) gibi yardımcı üreme tekniklerinde, sperm fertilizasyon kapasitesini artırmak için spermatozoonları seminal plazmadan ayırmak rutin işlemlerin bir parçasıdır (4). Bu işlemlerden santrifügasyon, insan semeninde seminal plazmayı hücrel bileşenlerden ayırmak için kullanılan en yaygın ve etkili yöntemdir (52, 53). Ancak santrifügasyon yönteminin mekanik ve fiziksel etkileri, sağlıklı sperm eldesinde tartışmalı konular arasındadır. Yöntemlerin güvenilirliğini araştıran çalışmalar halen sürmektedir.

Santrifügasyonun başta motilite olmak üzere sperm fonksiyonlarına zararlı etkileri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1). Santrifüj sırasındaki fiziksel etkenler nedeniyle ortaya çıkan mekanik hücre membran hasarı nedeniyle oluşan reaktif oksijen radikallerinin (ROR) sperm fonksiyonlarında bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir (2, 3, 4). ROR oluşumunun spermde DNA fragmantasyonuna (5), sperm membranında lipid peroksidaz birikimine ve mitokondriyal hasara sebep olabileceği bildirilmiştir (6). Bunların yanı sıra santrifüjün kullanıldığı dansite gradiyent santrifügasyon (DGS) ve swim-up (SU) tekniklerinin, gerek DNA'sı sağlıklı sperm seçiminde ve gerekse anöploidik spermlerin elenmesinde göreceli üstünlüklerinin olduğu bilinmektedir (7).

DGS ve SU yöntemleri üremeye yardımcı tedavilerin (ÜYTE) günlük pratiğinde kombine şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel SU yöntemi spermatozoanın önceden yıkanmış ve tüp tabanına çöktürülmüş pelletten medyuma doğru aktif hareketini esas almaktadır. Genel olarak, inkübasyon süresi 30-60dk. kadardır. Bu teknik ile çok yüksek oranda morfolojisi normal, hareketli ve diğer hücrelerden arınmış spermatozoa süspansiyonu elde edilebilmektedir (3). İlk olarak Mahadevan ve Baker tarafından tanımlanan bu metot; dünya genelinde tüm ÜYTE laboratuvarlarında normozoospermi hastaları ile dişi infertilitesinde yaygın olarak kullanılan bir sperm hazırlama tekniği olmuştur (54). Bu şekilde hazırlanan spermatozoa ile *in vitro* ortamda elde edilen fertilizasyon oranlarının çok yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak bazı çiftlerde açıklanamayan fertilizasyon problemleri de görülebilmektedir (55, 56, 57). Sperm

mevcut nicel ve nitel özellikleri ile kullanılan yöntem farklılıkları inseminasyonun gerçekleşmesinde orantılı olarak değişimler oluşturduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Biz de bu çalışmalar doğrultusunda spermatozoa elde edilmesinde yeni bir yöntem olan migrasyon-sedimentasyon (MS) tekniğini geleneksel santrifüj kullanılan yöntemle (DGS+SU) karşılaştırarak santrifüj sırasında spermatozoanın görebileceği zararları ve yeni tekniğin konvansiyonel sistem kadar etkin olup olmadığını inceledik.

Çalışmamızda santrifüje maruz bırakılan örneklerde motilite oranı; ileri hareketli spermatozoon %75.84, yerinde hareketli spermatozoon %8.11, hareketsiz spermatozoon % 16.05 olarak tespit edildi. MS yöntemi uygulanan örneklerde ise işlem sonrası ileri hareketli spermatozoon oranı %77.38, yerinde hareketli spermatozoon %9.58, hareketsiz spermatozoon %13.05 oranında hesaplandı. MS yöntemindeki hareketli oranın santrifügasyona oranla kısmi fazlalığı, santrifüj sırasında spermatozoanın fonksiyonel durumunun olumsuz yönde etkilenmiş olabileceğini düşündürse de istatistiksel olarak iki yöntem arasında anlamlı bir sonuç ortaya çıkmamıştır ($p>0,05$).

Aksi bir şekilde bu durumun morfolojik değerlendirmesinde ise santrifüje maruz bırakılan örneklerde işlem sonrası normal morfolojiye sahip spermatozoon %12.19, migrasyon sedimentasyon yöntemi uygulanan örneklerde işlem sonrası normal morfolojiye sahip spermatozoon %10.67 olarak tespit edildi. İki grup arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.220$). Görüldüğü gibi yüksek hareketliliğe sahip spermlerin MS yönteminde de başarıyla elde edilmesi; bu yöntemin kolaylığı göz önünde bulundurulduğunda, günlük klinik uygulamalarda maliyetli cihaz alımlarına ihtiyaç göstermemesi açısından avantajlıdır. Alvarez ve arkadaşları ile Benau ve arkadaşları ise çalışmalarında santrifügasyonun sperm hücrelerinin hareketliliğinde önemli ölçüde bir azalma gerçekleştirdiğini ayrıca sperm hücrelerinin enzimatik aktivitelerinde de değişiklikler oluşturduğunu gösteren bulgularıyla bu durumu desteklemişlerdir (53,58).

Matas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sperm fonksiyonlarının santrifüj prosedüründen etkilenerek hasara uğradığı belirtilmiştir (1). Abidor ve arkadaşları santrifügasyon sırasında oluşan pelletteki sıkışmanın hücrelerde mekanik zorlamalara sebep olduğunu bildirmiştir (59). Ancak bizim çalışmamızda santrifüje maruz bırakılan örneklerde canlılık oranı %74.09 iken, MS tekniğindeki örneklerdeki canlılık oranı %70.45 hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz veriler Abidor ve arkadaşlarının çalışmasından farklılık gösterse de istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark çıkmadığı

gözlenmiştir ($p=0.333$). Aradaki değer farklılıklarının santrifüj hız ve sürelerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

DGS tekniği bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Yöntemin pahalı olması, endotoksin oluşturma potansiyeli ve farklı yoğunlukta medyumlar gerektirmesi nedeniyle uzun zaman alması gibi dezavantajlara sahiptir. (3). Bunun yanında, testiküler spermlerin işlenmesinde debrilerin kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi, çok az miktarlardaki ejakülden spermatozoa elde edilebilmesi, spermatozoonlarda iyi hareketlik özelliği sağlaması ve seminal plazma ve lökositleri rahatça uzaklaştırabilmesi, yöntemi tercih nedenleri arasında sayılabilir (3). DGS yönteminin DNA fragmentasyonuna sahip sperm oranlarında iyileştirme sağladığı bilinmektedir (60,61). Ancak Muratori ve arkadaşları DGS prosedürünün spermde DNA fragmentasyon artışına yol açtığını belirtmişlerdir (51). Bu çalışma bir ilk olarak, yardımcı üreme tekniklerinde sperm seçiminde DGS kullanımının sperm DNA fragmentasyonuna neden olabileceğini göstermiş ve daha da önemlisi bu durum görüldüğü zaman çiftlerin gebelik oluşturmada %50 daha düşük şansının olduğunu belirtmiştir (51). Uygun sperm seçimi başarılı bir fertilizasyonu gerçekleştirmek, kaliteli embriyo gelişimini sağlamak, gebelik oluşturmak ve canlı bebek doğumunu gerçekleştirmek için yeterli olmayabilir (62,63). Tüm bunların oluşumu için sperm kromatin bütünlüğünün sağlam olması zorunludur. Özellikle de ileri yaştaki kadınlarda oosit, spermatozonda oluşmuş DNA hasarını onaramayabilir (64, 65). DNA hasarlarıyla ilgili birçok çalışma yapılmış ve sperm DNA fragmentasyonun ÜYTE sonuçlarını negatif yönde etkileyen sonuçlar gösterilmiştir (66-70). DGC'nin sperm DNA fragmentasyonuna etkisi belirsizdir. Bazı çalışmalar DGC ile DNA'sı düzgün spermatozoa eldesini göstermişken (71), bazıları bir değişiklik olmadığını hatta DNA kalitesi düşük spermatozoa eldesi olduğunu belirtmiştir (72-76). Bunlara ek olarak ve daha da önemlisi DGC prosedürünün DNA hasarına sebebiyetiyle ÜYTE'de gebelik başarısını etkileyip etkilemediği halen bilinmemektedir.

Çalışmamızda sperm DNA fragmentasyon oranları kromatin saçılma testi ile incelenmiş ve test edilen yöntemlerin literatürdeki genel bulgularla uyum gösterecek şekilde sperm DNA fragmentasyon oranlarını azalttığı tespit edildi. Çalışmamızda santrifüje maruz bırakılan örneklerde işlem sonrası DNA fragmentasyonu olan spermler %3.91 iken, migrasyon-sedimentasyon yöntemi uygulanan örneklerde %2.95 olarak bulundu. Spermin yapısal bozukluğa uğradığını gösteren bir bulgu olarak görünmesine karşın istatistiksel olarak iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p=0,213$).

Tekrarlayan santrifüjler semendeki ROR üretimini önemli ölçüde artırmaktadır (52). Spermin plazma membranında yüksek miktarlarda doymamış yağ asitlerinin ROR ile lipid peroksidasyonuna girmesi, sperm hareketliliği de dâhil olmak üzere birçok sperm fonksiyonlarını önemli derecede etkilemektedir (4). ROR'daki yüksek artış sperm hücrelerinde membran hasarına yol açmaktadır. Bu durum spermlerde fonksiyon bozukluğu yaratarak fertilizasyon kapasitesini etkilemektedir (77,78,79). Çalışmamızın bir sonraki ayağı olarak, santrifüj edilmiş ve MS uygulanmış semen örneklerinde ROR artışı incelenerek farklar ortaya konabilir. Çalışmamızın bulgularında da ifade edildiği gibi, santrifüje maruz bırakılan örneklerde işlem sonrası persiste histon içeriğine sahip spermler %10.59 iken MS yöntemi uygulanan örneklerde bu oran daha da düşerek %8.86 olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmesi de, MS tekniğinin, DNA'nın paketlenmesinde bir yetersizlik durumu olan ve sperm DNA kırıklarına yol açan histon-protamin değişim yetersizliğinin giderilmesinde etkin bir yöntem olduğu izlenmiştir.

Literatür ışığında santrifügasyon-swim-up kombinasyonlu yönteminin dezavantajlarına yönelik birçok veriye ulaşılmıştır. Oligozoospermi ve asthenozoospermili vakalarda düşük verimli sperm eldesi, spermatozoonlarda ROR hasarlanmasının yüksek olması ve spermatozoonlarda normal kromatin kondansasyon oranının düşmesi yöntemin dezavantajlarından (3). Bu dezavantajları desteklercesine Henkel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada swim-up işleminden sonra normal kromatin kondansasyonuna sahip spermatozoan sayısında belirgin bir azalma gözlemişlerdir (80). Tekniğin bir başka dezavantajı ise kullanım için bir spermatozoa pelleti daha oluşturulması gerekmesidir. Bu işlem sırasında hücrelerin kendi aralarındaki ya da diğer hücrelerle temasları nedeniyle hücre kalıntıları ve lökositler tarafından çok yüksek oranda ROR oluşturulmaktadır (81).

Santrifügasyon-swim up yönteminin dezavantajları nedeniyle alternatif bir spermatozoa ayırma tekniği ileri sürülmüştür. Tea ve arkadaşları (47) tarafından geliştirilen migrasyon-sedimentasyon yöntemi spermatozoa ayırma tekniği olarak laboratuvarlarda uygulanmaya başlamıştır. Prensip olarak swim-up tekniğinin sedimentasyon ile birleştirmiş halidir. Geleneksel swim-up prosedürünün aksine spermatozoa direkt olarak likefiye olmuş semenden elde edilir. İç kısmında bir koni bulunan özel cam veya plastik tüplerde bu işlem gerçekleştirilir. Semenden medyumun içerisine göç eden spermatozoonlar kısa bir zaman diliminde iç bölgedeki koniye çökerler.

Yapılan çalışmaların sonucunda hareketlilik yüksek olsa da kazancın az olması nedeniyle bu yöntem yardımcı üreme tekniklerinde çok fazla kabul görmemiştir. Ayrıca swim-up yönteminde olduğu gibi az miktardaki ejakülat içinde iyi hareket kalitesinde ve yüksek sayıda sperm bulma zorluğu, spermatozoonları kurtarmadaki oranın çok düşük olması ve özel cam ve plastik tüpler gerektirmesi ve bu malzemelerin pahalılığı gibi yöntemsel anlamda da bazı dezavantajları bulunmaktadır. Zavos ve arkadaşları yardımcı üreme tekniklerinde spermatozoa eldesi için swim-up ve sedimentasyonu sağlayan iki bölmeli bir tüp önermiştir ancak yöntemin halen IVF veya ICSI için ne kadar kullanışlı olduğunu tartışılır durumdadır (82).

Sánchezve arkadaşları Şiddetli oligo ve/veya asthenozoospermia vakalarında bile 2-3 saatlik inkübasyondan sonra ejakulattaki sperm hücrelerinden ICSI için yeterli sayıda hareketli spermatozoa elde edilebildiğini göstermişlerdir (83). Çalışmalarında, DGS yöntemini MS yöntemiyle karşılaştırdıklarında, MS yöntemiyle ileri hareketli, normal sperm morfolojisine sahip, kromatin kondansyonu düzgün ve ölü sperm oranı düşük spermatozoon eldesinin daha iyi olabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca; modifiye edilmiş migrasyon-sedimentasyon yöntemi kullanılarak elde edilen spermatozoonların enjeksiyon pipetlerinin cam yüzeylerine daha az yapışma göstermesi dolayısıyla pipette daha az tıkanıklığın oluşması bir avantaj sağlamıştır (83). Bu bağlamda, son zamanlarda Hinting ve Lunardh'in önerdiği migrasyon tekniğine yakın bir yaklaşımla kalitesi çok düşük olan semenden ICSI de kullanılabilecek hareketli, kalitesi iyi spermatozoa elde etmişlerdir (84).

Sonuç olarak, klinik uygulamalarında spermatozoa konsantrasyonu ve motilite oranı yüksek olan hastalarda migrasyon-sedimentasyon yöntemi tercih edilebilir. Hem santrifüje bağlı ROR oluşumunun önüne geçilmiş hem de santrifüjün mekanik etkilerine bağlı olarak spermatozoada yapısal ve fonksiyonel hasarlanmalar engellenmiş olur. Ayrıca migrasyon sedimentasyon ile sperm hazırlama metodu; basit bir poliklinikte ya da muayenehane düzeninde, IUI gibi işlemler için laboratuvar gereksinimini ortadan kaldırabilir. Sonuçlarımız her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmasa da migrasyon sedimentasyon metodu, DGS ve swim-up yöntemine göre spermatozoon parametrelerinde daha iyi değerlerin elde edilmesine imkân vermiştir. Bu sonuçlar rutin olarak kullanılan ve büyük anlamda kabul görmüş sperm seçme yöntemleri temel alındığında, nispeten yeni bir yöntem olan migrasyon-sedimentasyon yönteminin de benzer başarıyla kaliteli spermatozoonları seçebildiğini kanıtlamaktadır. Yüksek sayıda

olgunun çalışmaya katılması anlamlı sonuçların ortaya çıkması yönünde bir yaklaşım olabilir. Dolayısıyla migrasyon-sedimentasyon yöntemi klinik kullanımda hem pratik, hem de daha verimli bir işlem olarak değerlendirilebilir.

Tüp bebek tedavileri ve bununla ilgili tıp teknolojisi sürekli gelişmekte, yeni tedavi protokolleri kullanıma girmektedir. Bu şekilde en iyi metodun belirlenmesine yönelik yapılan araştırmalarla daha doğal ve kaliteli sperm seçimi ile daha sağlıklı gebeliklere katkı sağlanacağı umulmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Matas C, Decuadro G, Martinez-Miro S, Gadea J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology*. 2007; 67: 1087-91.
2. Shekarriz M, DeWire DM, Thomas AJ, Agarwal A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *European urology*. 1995; 28: 31-5
3. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reproductive biology and endocrinology*. RB&E. 2003; 1: 108.
4. Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1991; 6: 173
5. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human reproduction*. 1998; 13: 896-900.
6. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effect on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl*. 1992; 13: 368
7. Zhang XD, Chen MY, Gao Y, Han W, Liu DY, Huang GN. The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. *Human fertility*. 2011; 14: 187-91
8. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Demir R. Ankara: Palme yayıncılık, 2006.
9. Bilgiç E. Normal Normospermik Fertil Erkeklerde Spermiyumun Antijenik Yapısı ve Bu Yapının Varikoselli Hastalardaki Değişiminin İncelenmesi Işık Mikroskobu Düzeyinde İmmunohistokimyasal (İmmunofloresan) Çalışma. 2007. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji A.B.D., Uzmanlık Tezi, 103 sayfa, Ankara, (Prof. Dr. Esin Aşan).
10. Moore KL, Persaud TVN and Torchia MG. *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects*. Müftüoğlu S, Atilla P ve Kaymaz F. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2009: p. 174-180.
11. Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji*. Başaklar AC. Ankara: Palme Yayıncılık, 2011: p. 246-250.
12. Coşgun A. ve Aras D. *Anatomi-Histoloji-Embriyoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1998: p. 230-236.
13. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş*. Demir R. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: p. 550-553.
14. Paker Ş. *Histoloji*. 2. Baskı. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1993.
15. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji* 2.baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2016: p. 335-337.
16. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text And Atlas*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

17. Skinner M, Griswold M. Sertoli Cell Biology. USA: Elsevier Academic pres, 2005.
18. Cormack DH. Essential Histology.6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
19. Kopera I, Bilinska BC, Cheng Y, Mruk D. Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. Phil. Trans. R. Soc. B. 2010; 365: 1593–605.
20. Goosens S, Roy F. Cadherin-Mediated Cell- Cell Adhesion In The Testis. Frontiers in Bioscience. 2005; 10: 398- 419.
21. Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö, Özgür H. Özel Histoloji Ders Notları. Adana: Ç.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, 2006.
22. Tekelioğlu M. Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp A.Ş, 2002.
23. Ovalle WK, Nahirney PC. Çeviri: Müftüoğlu S. Netter Temel Histoloji. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.
24. Hatipoğlu MT, Hatipoğlu G. Yüksekokullar Anatomi Ders Kitabı. Ankara: Selvi Yayınevi, 2006; p. 200-202.
25. Yıldırım M. İnsan Anatomisi. 6.baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.
26. Cumhuriyet M, Yener N, Tuncel M. Temel Anatomi. 1. baskı. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık, 2001: p. 287-291.
27. Arıncı K. ve Elhan A. Anatomi. Ankara: Güneş Kitabevi, 2006.
28. Ozan H. Ozan anatomi. 2. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006: p. 308-311.
29. Aktümsek A. Anatomi ve Fizyoloji (İnsan Biyolojisi). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 2001.
30. Özden M. Anatomi ve Fizyoloji. Ankara: Özkan matbaacılık, 2012: p. 406-409.
31. Drake RL. ve Vogl W. Gray's Tıp Fakültesi Öğrencileri için Anatomi. Yıldırım M. İstanbul Üniversitesi Cerahpaşa Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı: Güneş Kitabevi, 2007.
32. Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 19. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 2011: p. 368-373.
33. Yaman K. Fizyoloji. Bursa: Vipaş, 1999: p. 478-479.
34. Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyoloji Bilimler Derneği. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: p. 415-418.
35. Costanzo L. S. Physiology: Board Review Series. Philadelphia: Lippincott W&W, 2003: p. 268-275.
36. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz, C. Genel Histoloji. 3. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi, 2008.
37. Cagnacci, A. Melatonin in Relation to Physiology in Adult Humans. Journal of Pineal Research. 1996; 21: 200-13
38. Özbey, G. Erkeklerde hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın yapısı (derleme). Androloji Bülteni, 2006; 25: 132-137.

39. Levy R, Seifer-Aknin I. Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin.* 2001; 59(5): 531–45.
40. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod.* 2002; 17(10): 2665–72.
41. Arslan D. Farklı Semen Parametrelerine Göre İnsan Spermelerinde Apoptozis ve Nekrozisin Histokimyasal ve İstatistiksel Yöntemlerle Belirlenmesi. 2008. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 101 sayfa, İzmir. (Yrd.Doç.Dr. Remziye Deveci).
42. Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C, Millar MJ. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *Reprod Fertil.* 1994; 101(1): 193–8.
43. Aras İ. Erkek İnfertilitesinde Semen Parametreleri İle Sperm Kromozom Anöploidi Sıklığı İlişkisinin Araştırılması. 2009. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, 108 sayfa, Eskişehir. (Doç.Dr. Cavit Can).
44. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S. Adana: Nobel Tıp Kitapevleri, 2009.
45. Mortimer D. Practical Laboratory Andrology. USA: Oxford University Press, 1994.
46. Dickey RP, Brinsden PR, Pyrzak R. Manual of intrauterine insemination and ovulation induction. Cambridge University Press, 2010.
47. Tea NT, Jondet M, Scholler R. A migration-gravity sedimentation method for collecting motile spermatozoa from human semen. In: *In Vitro Fertilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy.* Harrison RF, Bonnar J (Eds.). Thompson W. MTP Press Ltd., Lancaster; 1984: p. 117-120.
48. Aitken J, AJ, Baker HWG, Barratt CLR, Behre HM, Björndahl L, Brazil C, De Jonge C, Doncel GF, Franken D, Haugen TB, Hinting A, Imade GE, Kruger TF, Odongo HO, Noonan E, Schrader SM, Wang CCL, Shu-Biu Yeung W. *Who laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed.* World Health Organization, 2010.
49. Menkveld R, OE, Kruger TF, Swanson RJ, Acosta AA, Oehninger S. *Atlas of human sperm morphology.* Williams & Wilkins, 1991.
50. Björndahl, L, Söderlund, I, Kvist, U, Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human reproduction.* 2003; 18(4): 813-6.
51. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C, Luppino B, Nadalini M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G, Maggi M, Baldi E, Borini A. Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques A Possible New Male Predictive Parameter of Pregnancy? *Medicine.* 2016; 20: 1-9.
52. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficiency of sperm preparation techniques. *J Androl.* 1989; 9: 367.

53. Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nunez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey B. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Fertil Steril*. 1993; 57: 409.
54. Mahadevan M, Baker G: Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. In: *Clinical In Vitro Fertilization*. Wood C, Trounson A (Eds.). Springer-Verlag, Berlin; 1984: 83-97.
55. Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Kovacs G: The investigation of idiopathic infertility by in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1980; 34: 431-438.
56. Mahadevan MM, Trounson AO, Leeton JF. The relationship of tubal blockage, infertility of unknown cause, suspected male infertility, and endometriosis to success of in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 1983; 40: 755-762.
57. Yates CA, De-Kretser DM. Male-factor infertility and in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1987; 4: 141-147.
58. Benau DA, Storey BT. Characterization of the mouse sperm plasma membrane zona-binding site sensitive to trypsin inhibitors. *Biol Reprod*. 1987; 36: 282-92.
59. Abidor JG, Li LH, Hui SW. Study of cells pellets: electrical properties and porosity. *Biophys J*. 1994; 67: 418-26.
60. Xue X, Wang WS, Shi JZ, Zhang SL, Zhao WQ, Shi WH, Guo BZ, Qin Z. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 9: 1161-6.
61. Wang M, Sun J, Wang L, Gao X, Lu X, Wu Z, Wang Y, Liu K, Tao J, Wu Y. Assessment of density gradient centrifugation (DGC) and sperm chromatin dispersion (SCD) measurements in couples with male factor infertility undergoing ICSI. *J Assist Reprod. Genet*. 2014; 12: 1655-63.
62. Lewis SE. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*. 2007; 134: 31-40.
63. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, et al. Markers of human sperm functions in the ICSI era. *Front Biosci*. 2011; 16: 1344-1363.
64. Ménézo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*. 2010; 18: 357-365.
65. Gavrieliouk D, Aitken RJ. Damage to sperm DNA mediated by reactive oxygen species: its impact on human reproduction and the health trajectory of offspring. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 868: 23-47.
66. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*. 2006; 21: 2876-2881.
67. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, et al. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14: 746-757.
68. Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I, Cambi M, Forti G, Baldi E, Muratori M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl*. 2012; 14: 24-31.

69. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2014; 102: 998–1005.
70. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2015; 30: 120–127.
71. Parmegiani L, Cognigni GE, Filicori M. Sperm selection: effect on sperm DNA quality. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 791: 151–172.
72. Zini A, Mak V, Phang D, Jarvi K. Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril.* 1999; 72: 496–499.
73. Zini A, Nam RK, Mak V, Phang D, Jarvi K. Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing. *Fertil Steril.* 2000; 74: 824–827.
74. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2010; 25: 2415–2426.
75. Aitken RJ, Finnie JM, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Kuczera L, Rothkirch TB, De Iuliis GN. Potential importance of transition metals in the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Hum Reprod.* 2014; 29: 2136–2217.
76. Stevanato J, Bertolla RP, Barradas V, Spaine DM, Cedenho AP, Ortiz V. Semen processing by density gradient centrifugation does not improve sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation rates. *Fertil Steril.* 2008; 90: 889–890.
77. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species. *J Reprod Fertil.* 1987; 81: 459.
78. Gagnon C, Iwasaki A, de Lamirande E, Kovalski N. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann NY Acad Sci.* 1992; 637: 436.
79. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril.* 1992; 57: 409.
80. Henkel R, Franken DR, Lombard CJ, Schill WB. The selective capacity of glass wool filtration for normal chromatin condensed human spermatozoa: A possible therapeutic modality for male factor cases? *J Assist Reprod. Genet.* 1994; 11: 395-400.
81. Ford WCL. The role of oxygen free radicals in the pathology of human spermatozoa: Implications of IVF. In: *Clinical IVF Forum; Current Views in Assisted Reproduction.* Matson PL, Lieberman BA (Eds.). Manchester University Press, UK; 1990: 123-139.
82. Zavos PM, Abou-Abdallah M, Aslanis P, Correa JR, Zarmakoupis-Zavos PN. Use of the multi-ZSC one-step standardized swimup method: recovery of high-quality spermatozoa for intrauterine insemination or other forms of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril.* 2000; 74: 834-835.

83. Sánchez R, Stalf T, Khanaga O, Turley H, Gips H, Schill WB. Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in andrological patients. *J Assist Reprod Genet.* 1996; 13: 110-115.
84. Hinting A, Lunardi H: Better sperm selection for intracytoplasmic sperm injection with the side migration technique. *Andrologia.* 2001; 33: 343-346.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sevil KIRATLI
Doğum tarihi ve yeri : 02.03.1985-Gaziantep
e_mail : sevil_kiratli@windowslive.com
Telefon : +90 537 730 79 80

EĞİTİM

2003: Gaziantep Merkez Anadolu Lisesi, Gaziantep-TÜRKİYE
2003-2005: Mustafa Kemal Üniversitesi, Biyoloji Lisans Eğitimi, Hatay-TÜRKİYE
2005-2006: Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Lisans Eğitimi (Mustafa Kemal Üniversitesinden Yatay Geçiş), Adana-TÜRKİYE
2006-2007: Linköping Üniversitesi, Biyoloji Lisans Eğitimi (Erasmus Öğrenci Değişim Programı) Linköping-İSVEÇ
2007: Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Lisans Diploması, Adana-TÜRKİYE
2008-2009: Stockholm Üniversitesi, Biyoloji Yüksek Lisans Programı, Stockholm-İSVEÇ
2009-2010: Karolinska Enstitüsü, Yüksek Lisans Tez Projesi, Stockholm-İSVEÇ
2010-2011: Karolinska Enstitüsü, PhD Kursları, Stockholm-İSVEÇ

DENEYİMLER - EĞİTİMLER

- İsveç, Karolinska Enstitüsü, Androloji Laboratuvarı, Avrupa Üreme Tıbbı ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) yöntem ve kurallarına göre semen analizi; sperm konsantrasyonu, hareketliliği, morfolojisi, kalite kontrol yöntemleri, İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyon (ICSI) yöntem ve tüm aşamaları. Sperm, Embriyo, Yumurta, Over Dokusu, Testis Dokusu dondurma ve çözme yöntemleri
- Norveç, IVF-Klinik Oslo, Almanya, Münih Üreme Tıbbı Kliniği, Gaziantep, Gazi Novafertil Tüp Bebek Merkezi, Androloji ve Embriyoloji Laboratuvarı
- Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı , Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi, İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyon (ICSI) yöntem ve tüm aşamaları. Sperm, Embriyo, Yumurta, Over Dokusu, Testis Dokusu dondurma ve çözme, Preimplantasyon Genetik Tanı (PGD) yöntemleri

SERTİFİKALAR

- T.C. Sağlık Bakanlığı, Üremeye Yardımcı Tedavi Yöntemleri (ÜYTE) Embriyoloji Laboratuvar Sorumlusu Sertifikası, Ankara Üniversitesi, Ankara-TÜRKİYE

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Migrasyon-sedimentasyon yönteminin semen hazırlamadaki etkinliğinin santrifügasyon kullanılan yöntemle karşılaştırılarak değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

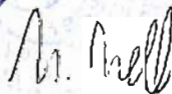
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Uz.Dr.İ.Sinan ÖZKAVUKCU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi ve Eğitim Merkezi Embriyoloji Laboratuvarı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlensel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Çalışması					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	ETK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

30 Temmuz 2015

ASLI GİBİDİR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet MELLİ
İmza:



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Migrasyon-sedimentasyon yönteminin semen hazırlamadaki etkinliğinin santrifüjasyon kullanılan yöntemle karşılaştırılarak değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:12-504-15	Tarih: 27 Temmuz 2015		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof Dr Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Inci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.A. Rehi SOYLU	Biyo fizik	H.Ü Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Müdübe SUTAY	İşletme	-	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Migrasyon-sedimentasyon yönteminin semen hazırlamadaki etkinliğinin santrifügasyon kullanılan yöntemle karşılaştırılarak değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Uz.Dr.İ.Sinan ÖZKAVUKCU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi ve Eğitim Merkezi Embriyoloji Laboratuvarı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	<input type="checkbox"/>		
		In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>		
		İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Çalışması				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Migrasyon-sedimentasyon yönteminin semen hazırlamadaki etkinliğinin santrifügasyon kullanılan yöntemle karşılaştırılarak değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	ILAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:12-504-15	Tarih: 27 Temmuz 2015		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Seher DEMİNER	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Zaife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.A. Ruhu SOYLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Mühübe SUTAY	İşletme	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı'nın

Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ

İmza:

30 Temmuz 2015

ASLI GIBİDİR

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmıştır.

EK 2

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın Adı : MİGRASYON-SEDİMENTASYON YÖNTEMİNİN SEMEN HAZIRLAMADAKİ ETKİNLİĞİNİN SANTRİFÜGASYON KULLANILAN YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ!!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Çalışmanın amacı semenden migrasyon sedimentasyon yöntemi ile elde edilen spermelerin, santrifüj kullanılarak elde edilen spermelerle karşılaştırarak incelemektir.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Gönüllülerin bu çalışmaya dahil edilebilmesi için Dünya Sağlık Örgütünün belirlediği semen analiz kriterlerinde progresif ileri hareketli motilitesi %10'un üzerinde olması gerekmektedir.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 20 dir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Tüp bebek tedavileri ve bununla ilgili tıp teknolojisi sürekli gelişmekte, yeni tedavi protokolleri kullanıma girmektedir. Bu çalışmada santrifüjün sperm hücreleri üzerinde olumsuz bir etkisi bulunup bulunmadığı araştırılarak, sperm hücresinin en iyi hangi şekilde elde edilebileceğine katkıda bulunulacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Çalışma adına hastalar üzerinde bir işlem veya ilaç uygulanmayacaktır. Dolayısıyla çalışmanın kendi protokolü itibariyle hastalara getireceği bir risk bulunmamaktadır.

ARAŞTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİNER İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?

Çalışma süresince birlikte kullanımının sakıncalı olduğu ilaç ve besinler yoktur.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

Alınan örneğin Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine belirlediği semen analiz kriterlerinde progresif ileri hareketli motilitesi %10'un altında durumlarda araştırma dışı bırakılabilirsiniz.

DİĞER TEDAVİLER NELERDİR?

Çalışma öncesinde veya çalışma süresince herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

EK 2

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın Adı : MİGRASYON-SEDİMENTASYON YÖNTEMİNİN SEMEN HAZIRLAMADAKİ ETKİNLİĞİNİN SANTRİFÜGASYON KULLANILAN YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK/SORUMLULUK KİMDEDİR VE NE YAPILACAKTIR?

Çalışmada bir zararlanma durumu yoktur. Herhangi bir diğer konularda sorumluluk Ankara Üniversitesi ÜYTE Merkezi sorumlusu Uzm. Dr. Sinan ÖZKAVUKÇU'dur.

YENİ BULGULAR

Araştırma sürecinde herhangi bir tedavi veya uygulama yer almayacaktır.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Histolojik araştırma sürecinde herhangi bir tedavi veya uygulama yer almamaktadır; dolayısıyla çalışma nedeniyle şahsınızda bir sorun oluşması mümkün değildir.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Çalışma atık materyalden yapılacağından dolayı herhangi bir gider bulunmamaktadır.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR ?

Çalışma Ankara Üniversitesi ÜYTE Merkezi tarafından desteklenmektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MIDİR?

Size ait tüm kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz görülmeyecektir. Sadece araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde kimlik bilgilerinize ulaşabilir.

EK 2

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın Adı : MİGRASYON-SEDİMENTASYON YÖNTEMİNİN SEMEN HAZIRLAMADAKİ ETKİNLİĞİNİN SANTRİFÜGASYON KULLANILAN YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 3 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. **Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.**

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI - SOYADI		
ADRESİ		
TEL. - FAKS		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI - SOYADI		
ADRESİ		
TEL. - FAKS		
TARİH		

AÇIKLAMALARI YAPAN ARAŞTIRICININ		İMZASI
ADI - SOYADI		
TARİH		

AÇIKLAMALARI YAPAN ARAŞTIRICININ		İMZASI
ADI - SOYADI		
TARİH		