



T.C.

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KOŞULLARDA MUHAFAZA EDİLEN SPERM ÖRNEKLERİNDE
SICAKLIK ve SEMİNAL PLAZMANIN ROLÜ

HÜSEYİN AYKUT ÖZCAN

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ MERYEM ALAGÖZ

İSTANBUL
2019



T.C.

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KOŞULLARDA MUHAFAZA EDİLEN SPERM ÖRNEKLERİNDE
SICAKLIK ve SEMİNAL PLAZMANIN ROLÜ

HÜSEYİN AYKUT ÖZCAN

TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ MERYEM ALAGÖZ

TEZ İKİNCİ DANIŞMANI: PROF. DR. TÜLAY İREZ

İSTANBUL
2019

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Program Adı: Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Öğrencinin Adı Soyadı: Hüseyin Aykut ÖZCAN

Danışman: Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Hüseyin Aykut ÖZCAN tarafından hazırlanan "Farklı Koşullarda Muhafaza Edilen Sperm Örneklerinde Sıcaklık ve Seminal Plazmanın Rolü" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:21/06/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Meryem ALAGÖZ

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Süreyya BOZKURT

İstinye Üniversitesi

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez 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 olmadığını beyan ederim.

H. AYKUT ÖZCAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden tezimi sonlandırıncaya kadar bilgi ve görüşüne ihtiyaç duyduğum her an yardımlarını esirgemeyen ve karşılaştığım sorunları çözüme kavuşturmamda yol gösterici olan çok değerli hocam **Prof. Dr. TÜLAY İREZ'e** ve danışman hocam sayın **Dr. Öğr. Üyesi Meryem ALAGÖZ'e**, yüksek lisans eğitimime gerek başlamadan önce gerekse başladıktan sonra bana değerli vaktini ayıran ve destek olan rektör hocam sayın **Prof. Dr. Adnan YÜKSEL'e**, çalışma hayatına başladığım günlerde bana yardımcı olan, derin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli klinik hocam **Prof. Dr. Bülent TIRAŞ'a**, yüksek lisans eğitimime başladığımda tanıştığım, bana iş hayatının kapısını aralamam konusunda yardımcı olan **Emb. Barışhan ÖZDEMİR'e**, tezime başladıktan sonra planlama ve çalışmalarımı yürütme konusunda destek olan lisans arkadaşım **Ecem ASLAN'a** çok teşekkür ederim. Tez hazırlama sürecinde çalışmalarına katkılarından dolayı **Dr. Öğr. Üyesi Emre SALABAŞ'a** ayrıca teşekkür ederim.

Tezimin düzenlenmesi ve bütünlüğü konusunda yardımlarını esirgemeyen, emeği geçen abim **Özgür KARACA'ya** teşekkür ederim.

Yaşantım boyunca her konuda güvenini ve anlayışını arkamda hissettiğim; beni hayata hazırlayan, bugünlere getiren ve tez aşamasında manevi destekleriyle yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
TABLolar LİSTESİ.....	XI
GRAFİKLER LİSTESİ.....	XII
RESİMLER LİSTESİ.....	XIII
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1-GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2- GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Erkek üreme sistemi ve sperm oluşum süreci.....	7
2.1.1. Spermin oluşum basamakları.....	8
2.1.2. Spermin farklılaşması (Spermiyogenez).....	9
2.2 Spermin yapısı.....	11
2.3. Semen analizi.....	12
2.3.1 Sperm konsantrasyonunun belirlenmesi.....	13
2.3.2. Sperm morfolojisinin belirlenmesi.....	13
2.3.3. Sperm hazırlık yöntemleri.....	15
2.4. Spermin dondurulması.....	16
2.5 Sıcaklığın sperm hücreleri üzerindeki etkisi.....	18
2.6. Ortam sıvısının sperm hücreleri üzerindeki etkisi.....	18
2.7. Spermde DNA hasarının belirlenmesi.....	19
2.7.1. Akridin oranj (AO) boyama yöntemi.....	19
2.8. Spermde canlılığın belirlenmesi.....	19
2.9. Spermde ölü hücrelerin tespiti.....	20

2.9.1. Propidyum İyodür (PI) boyama yöntemi	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Çalışmaya alınan gruplar ve özellikleri.....	21
3.2. Çalışmada kullanılan yöntemler	22
3.2.1. Semen analizi uygulaması.....	22
3.2.2. Gradient yöntemi.....	23
3.2.3. DNA fragmantasyonunun Akridin Oranj boyası ile tespiti.....	24
3.2.4. Ölü hücrelerin Propidyum İyodür boyası ile gösterilmesi.....	25
3.3. Kullanılan malzemeler	26
3.4 Çalışmanın tasarımı	26
3.5. Çalışmada kullanılan istatistiksel yöntemler	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	42
7. KAYNAKÇA.....	44
8. EKLER.....	52
EK 1	52
GÖNÜLLÜ ONAM FORMU	52
EK 2.....	566
9. ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER / KISALTMALAR LİSTESİ

µl.....: Mikrolitre

WHO.....:Dünya Sağlık Örgütü

%.....:Yüzde

°C.....:Santigrat Derece

ml.....:Mililitre

DNA.....:Deoksiribonükleik asit

RNA.....: Ribonükleik asit

PI.....:Propidyum İyodür boyası

AO.....:Akridin Orange boyası

PGC's.....: Premordiyal Germ Hücreleri

FSH.....:Folikül uyarıcı hormon

LH.....:Lütein yapıcı hormon

IVF.....: İn-vitro fertilizasyon

ICSI.....: İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu

SSC.....: Spermatogonyal kök hücreler

x.....:Oküler büyütme oranı, katı

pH.....:Power of Hydrogen / Asitlik-bazlık derecesi

YÜT.....:Yardımcı üreme teknikleri

µm.....:Mikrometre

rpm.....:Santrifüjün dakikada dönme sayısı birimi

HEPES....:4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit / Dengeleyici tuz çözeltisi

DFI.....: DNA fragmantasyon oranı

OAT.....: Oligoastenoteratozoospermi

TUNEL..:Terminal Uridine Nick- End Labeling

SCD.....:Sperm Chromatin Dispersion

SCSA.....:Sperm Chromatin Structure Assay

RT.....: Oda sıcaklığı

SP.....: Seminal plazma örneği

GS.....: Gradient işlemleri sonrası sperm örneği

O/N.....: Overnight / Gece boyunca

ART.....: Yardımcı Üreme Teknikleri

DGC.....: Density-gradient centrifugation

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL 1. Testis yapısı ve spermatogenezin oluşum süreci.	7
ŞEKİL 2. Olgun spermin oluşum basamakları şekilde gösterilmektedir.....	8
ŞEKİL 3. Spermiyogenez aşamalarının şematik gösterimi.	10
ŞEKİL 4. Spermin yapısını oluşturan kısımların şematik gösterimi	11
ŞEKİL 5. Kruger kriterlerine göre spermin morfolojik görünüşleri	15



TABLolar LİSTESİ

TABLO 1. Kruger strict kriterlerine göre normal sperm parametreleri.....	14
TABLO 2. Çalışmaya dahil edilen semen örneklerinin özellikleri.....	29
TABLO 3. Spermilerin hareketliliğinde oluşan istatistiksel değişim.....	31
TABLO 4. Sperm hareketliliğinin farklı sıcaklıklardaki karşılaştırılması.....	32
TABLO 5. Spermilerin DNA fragmantasyonunda oluşan değişim	33
TABLO 6. DNA hasarının farklı sıcaklıklardaki karşılaştırılması	33
TABLO 7. Spermilerin koşullara göre ölü hücre oranında oluşan değişim	35
TABLO 8. Spermde ölü hücre oranının karşılaştırılması.....	35
TABLO 9. Tüm sıcaklıklardaki parametrelerin ayrıntılı karşılaştırılması.....	37

GRAFİKLER LİSTESİ

- GRAFİK 1. 24 saat bekletilen spermilerin hareketlerindeki değişim.....30
- GRAFİK 2. Spermilerin sıcaklık değerlerine göre DNA hasarı oranı.....32
- GRAFİK 3. Spermilerin sıcaklık değerlerine göre ölü hücre oranı.....34



RESİMLER LİSTESİ

RESİM 1. Makler sayım kamarası.....	13
RESİM 2. Normal morfolojiye sahip sperm yapısı.....	14
RESİM 3. Spermin dondurulması esnasında kullanılan gereçler	17
RESİM 4. Dondurulmuş sperm örneklerinin saklandığı sıvı azot tankı	17
RESİM 5. Eosin-Y testi sonucu gözlenen canlı ve ölü sperm hücreleri.....	20
RESİM 6. Kruger kriterlerine göre normal morfolojili spermatozoolar.....	22
RESİM 7. Kırık boyun, mitokondriyal kayıp ve normal sperm	23
RESİM 8. Boyun dropletleri, iğnebaş sperm ve dag defekti	23
RESİM 9. <i>Akridin Oranj</i> boyama sonrası floresan mikroskop görüntüsü.....	24
RESİM 10. Ölü hücrelerin <i>Propidyum İyodür</i> boyama ile gösterilmesi.....	25
RESİM 11. PI boyama sonrası spermilerin floresan mikroskop görüntüsü....	25

ÖZET

ÖZCAN H.A. Farklı koşullarda muhafaza edilen sperm örneklerinde sıcaklık ve seminal plazmanın rolü. T.C Biruni Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul 2019.

Amaç: Spermilerin ortam sıcaklığına ve ortam sıvısına bağlı olarak sperm kalitesinde (canlı hücre sayısı, hareketlilik, DNA yapısı) değişimler gözlenmektedir. Sperm kalitesini korumak için semen örnekleri ideal ortamda saklanmalıdır. Klinik merkezlerde spermilerin 24 saat gibi kısa süreli saklanması genellikle dondurma solüsyonu kullanılmaktadır. Saklama işlemi için kullanılan ortam (dondurma solüsyonu, sıvı azot tankı vs.) maliyetli bir süreç olduğu için sürecin gerekliliği tartışılmakta ve alternatif çözümler aranmaktadır. Semen örneklerinin maruz kalabileceği üç farklı sıcaklık değeri ile iki farklı ortam sıvısında spermilerin 24 saat muhafaza edilmesinin sonuçlarının tamamını içeren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmada Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre sayı, hareket ve morfolojik olarak *normal* sperm kabul edilen örnekler üç farklı sıcaklık değeri ile iki farklı ortam sıvısında 24 saat muhafaza edildikten sonra sperm kalitesindeki (canlı hücre sayısı, hareketlilik, DNA yapısı) değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve metot: Tez çalışmasına normal sperm kalitesinde 25 adet semen örneği dahil edildi. Semen örneklerinin ilk analizleri sonrasında iki gruba ayrılan örneklerden birinci grup hiçbir işlem yapılmadan seminal plazma sıvısında muhafaza edildi ve diğer grup ise gradient işlemi gerçekleştirildikten sonra saklandı. İki çalışma grubu da 4 °C / oda sıcaklığı ve 37°C'de 24 saat bekletildi ve sperm kalitesi (hareketlilik, ölü hücre sayısının oranı ve DNA fragmentasyonundaki değişim oranı) değerlendirildi. İstatistiksel analiz için Student's t testi, D'AgostinoPearson testi, One Way ANOVA ve Tukey testi kullanıldı.

Bulgular: Sperm örnekleri ilk analiz sonrası sperm sayısı (sayı/ml), hareketlilik, ölü hücre ve DNA fragmentasyon oranı (%) sırasıyla 25,6±4,9, 67,2±11,1, 21,3±9,1 ve 23,1±9,9 olarak ölçüldü. Gradient işleminden sonra bu değerler 43,5±20,7, 77,1±9,7,

12,7±6,9 ve 15,0±7,3 olarak ölçüldü ve iki farklı saklama koşulu arasındaki değerler istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). 24 saat süre ile oda sıcaklığı, 4 °C ve 37°C’de saklanan örneklerde hareketlilik, ölü hücre ve DNA fragmentasyon oranı (%) değerlendirildi ve normal semen örneklerinde hareketlilik 51,2±11,3, 15,1±7,3, 6,7±4,4; ölü hücre oranı 28,2±9,0, 38,7±11,4, 56,2±13,3 ve DNA fragmentasyon oranı 29,8±10,3, 39,6±11,6, 56,7±11,8 olarak ölçüldü ve farklı ortamdaki değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). 24 saat süre ile oda sıcaklığı, 4 °C ve 37°C’de saklanan gradient örneklerinde hareketlilik, ölü hücre ve DNA fragmentasyon oranı (%) değerlendirildi ve hareketlilik 62,8±10,9, 22,8±9,1, 11,4±4,8; ölü hücre oranı 20,2±7,6, 30,2±9,0, 48,3±12,4 ve DNA fragmentasyon oranı 21,4±7,0, 31,3±8,4, 47,6±9,6 olarak ölçüldü ve farklı ortamdaki değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

Sonuç: Yapılan çalışma sonucunda spermilerin bulunduğu ortam şartlarına bağlı olarak hareketlik, DNA fragmentasyonu ve ölü hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görüldü. Gradient işlemi uygulanan örneklerin kalitesinin normal örneklere göre daha iyi sonuçlar verdiği gösterildi. Üç farklı sıcaklık değeri karşılaştırıldığında en uygun ortamın oda sıcaklığı olduğu gösterildi.

Tartışma: Klinik merkezlerde spermilerin 37 °C sıcaklığındaki etüv ve laminar flow kabin sistemleri içerisinde bekletildiği göz önüne alındığında; güncel olarak uygulanan bu süreçlerin yararı ve spermier üzerindeki oluşturacağı etkiyi tartışmalı hale getirmektedir.

Anahtar kelimeler: Seminal plazma, gradient, DNA fragmentasyonu, semen analizi

ABSTRACT

OZCAN H.A. A role of temperature and seminal plasm in different condition of the conserved semen sample. TC Birnui University Medical Sciences Institute, Clinical Embryology Program. Master's Thesis. Istanbul. 2019.

Introduction: Changes in sperm quality (number of live cells, mobility, DNA structure) are observed depending on the ambient temperature of the sperm and the media. Semen samples are stored in the ideal conditions to maintain sperm quality. In clinical centers, the freezing solution is usually used for the storage of sperm for a short period of time of 24 hours. Since the medium used for the storage process (freezing solution, liquid nitrogen tank etc.) is a costly process, the necessity of the process is discussed and alternative solutions are sought. There are no studies in the literature that contain the results of maintaining the sperm for 24 hours in two different media with three different temperature values that the semen samples could be exposed to. In this study, it is aimed to examine the changes of examples of normal sperm (according to World Health Organization (WHO) data (numbers, motions and morphologically)) in sperm quality (live cell number, mobility, DNA structure) after 24 hours in two different media with three different temperature values.

Material and Method: 25 semen samples were included in our study in normal sperm quality. Semen samples were stored in seminal plasma without any procedure after the first analysis and the other group was stored after the gradient procedure. Two study groups were incubated at 4 ° C / room temperature / 37 ° C for 24 hours and the quality of sperm (mobility, rate of dead cell count and rate of change in DNA fragmentation) were evaluated. Student's t, D'Agostino-Pearson, One Way ANOVA and Tukey tests were used for statistical analysis.

Results: The number of sperm counts (number/ml), mobility, dead cell and DNA fragmentation rate after sperm analysis (%) were measured as 25,6±4,9, 67,2±11,1, 21,3±9,1 and 23.1±9.9, respectively. After the gradient procedure, these values were measured as 43,5±20,7, 77,1±9,7, 12,7±6,9 and 15,0±7,3, respectively and the values between two different storage conditions were statistically significant (p <0.05). Mobility, dead cell and DNA fragmentation rate (%) were evaluated in samples

stored 24 hours at room temperature, 4 ° C and 37 ° C and mobility in normal semen samples was measured as 51.2 ± 11.3 , 15.1 ± 7.3 , 6.7 ± 4.4 , respectively; the ratio of dead cells was measured as 28.2 ± 9.0 , 38.7 ± 11.4 , 56.2 ± 13.3 , respectively and DNA fragmentation rate was measured as 29.8 ± 10.3 , 39.6 ± 11.6 , 56.7 ± 11.8 , respectively. The difference between the values of different media was statistically significant ($p < 0.05$). Mobility, dead cell and DNA fragmentation rate (%) were evaluated for 24 hours room temperature, 4 ° C and 37 ° C, and mobility was measured as 62.8 ± 10.9 , 22.8 ± 9.1 , 11.4 ± 4.8 , respectively; the ratio of dead cells was measured as 20.2 ± 7.6 , 30.2 ± 9.0 , 48.3 ± 12.4 , respectively, and DNA fragmentation rate was measured as 21.4 ± 7.0 , 31.3 ± 8.4 , 47.6 ± 9.6 , respectively. The difference between the values of different media was statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion: As a result of the study, there were statistically significant differences in mobility, DNA fragmentation and dead cell count due to the environmental conditions of the sperm. Gradient treated samples were shown to be better than the normal samples. When compared to 3 different temperatures, it was shown that optimal temperature was the room temperature.

Discussion: Considering that the spermatozoa are kept in 37 °C drying oven and laminar flow cabin systems in clinical centers. The benefits of these current processes and the impact on the sperm make it controversial.

Key words: Seminal plasma, gradient, DNA fragmentation, semen analysis

1-GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite tanımı; çocuk sahibi olmak isteyen ancak doğal yollar denenerek tüm şartlar oluşturulmasına karşın yine de başarıya ulaşamayan çiftler için kullanılmaktadır. Eğer sorun kadın kaynaklı ise *kadın infertilitesi*, erkek kaynaklı ise *erkek infertilitesi* olarak adlandırılmaktadır (Chandra, 2010). En az 1 yıl süre ile korunmasız şekilde ilişki yaşayan ve buna rağmen çocuk sahibi olamayan çiftler tüp bebek merkezlerine başvurarak tedavi sürecine başlamaktadır. Kadın, uzman bir hekim tarafından muayene edilirken; erkek hastadan ise semen analizi istenmektedir. Semen analizi testi ile birçok klinikte standart olarak spermlerin sayı, hareket ve morfoloji parametrelerine bakılmakta ve bu işlem genellikle manuel olarak yapılmaktadır. Bu parametreler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine uygun olarak hesaplanmaktadır (Franken and Oehninger, 2012). WHO verilerine göre bir sperm *normal* sayılabilmesi için; sperm sayısının minimum 15 milyon, sperm hareketliliğinin (ileri yöne doğru doğrusal hareket ve ileri yöne doğru doğrusal olmayan hareketli spermlerin toplam değeri) minimum %40 ve sperm morfolojik değerlendirmesi sonucundaki değer minimum %4 olması gerekmektedir. Eğer bir semen; referans değerinin altında bir sayıya sahipse *oligospermi*, referans değerinin altında bir hareketliliğe sahipse *astenospermi*, referans değerinin altında bir morfolojik yapıya sahipse *teratozoospermi* adını almaktadır. Eğer bu üç parametrede de düşüklük varsa *oligoastenoteratozoospermi* terimi kullanılmaktadır (WHO manual, 2010).

Klinik merkezlerde ihtiyaç duyulması halinde sperm dondurma işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Tedavi süresi ve izlenecek yola bağlı olarak genellikle uzun süreli sperm saklama işlemi yapılmasına rağmen, kimi zaman da 24 saat ve daha az zamanda işleme girecek olan örneklerin saklanmasına gerek duyulmaktadır (Nijs and Ombelet, 2001). Sperm ortam sıcaklığına ve ortam sıvısına bağlı olarak canlı hücre sayısında, hareketliliğinde değişimler olmaktadır (Nijs and Ombelet, 2001; Desai et al., 2012). Spermlerin ideal sıcaklık ve ortam sıvısında saklandığında bu parametrelerdeki kaybın en aza indirilmesi beklenmektedir. Tez çalışmasındaki deney düzeneği bu amaçla oluşturulmuştur. Spermler gönüllü bireylerden alındıktan sonra likefaksiyon süresi beklenerek ilk sayım ve morfolojik değerlendirme

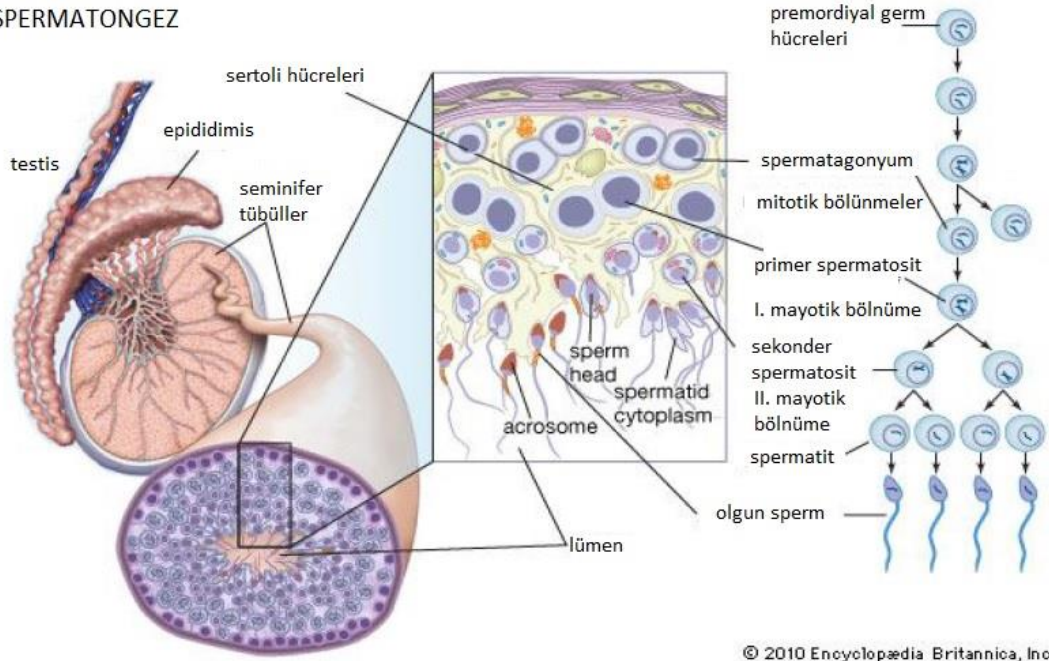
gerçekleştirilip; sonrasında aynı sperm örneğinden ortam sıvısına göre iki farklı grup oluşturulmuştur. Her iki grup örnek için saklama öncesi 0. saat olarak kabul edildikten sonra kontrol grubu oluşturulmuştur. Birinci grupta semen örneği öncelikle yıkama işlemine tabi tutulup sonrasında üç farklı sıcaklıkta bekletilmek üzere eppendorf tüplere aktarılmış; diğer grup örnek ise yıkama işlemi gerçekleştirilmeden seminal plazma ile eppendorflara alınmıştır. Sonrasında her iki grubun semen örnekleri +4 °C, oda sıcaklığında (22-24°C) ve 37 °C' de 24 saat süre ile inkübe edilip ertesi günü yine aynı saatte ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölü hücre sayısı ve DNA fragmantasyonunu tespit etmek amacıyla saklama öncesi kontrol grubunda ve 24 saat sonrasında *Propidyum iyodür* (PI) ve *Acridine Orange* (AO) boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olan 0. saatteki hareketlilik ve son durumdaki hareketlilikler birbiri ile kıyaslanmıştır. Her iki grup üç farklı parametrelerin sonuçlarıyla kıyaslandıktan sonra sonuçlara göre en ideal sıcaklık ve ortam sıvısı belirlenerek klinik alanda yol göstermek amacıyla anlamlı ifadelerle yorumlanarak tez çalışması tamamlanmıştır. Çalışmada Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre sayı, hareketlilik ve morfolojik anlamda normospermik değerlere sahip spermler kullanılmış olup; Biruni Üniversitesi bünyesindeki 25 adet gönüllüden semen örnekleri temin edilmiştir.

2- GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek üreme sistemi ve sperm oluşum süreci

Erkeklerde üreme sisteminin temel yapısını testisler oluşturmaktadır. Skrotum içerisine yerleşmiş olan testisler; gametler ve erkek cinsiyet hormonu olan androjenin üretildiği kısımdır (Gerhard et al., 2010). Androjenler ise erkeklik hormonu olarak bilinen testosteronun üretiminden sorumludur. Beynin alt bölümüne yerleşmiş olan hipofiz bezi; FSH ve LH hormonlarının üretildiği yerdir. Sperm üretimi için gerekli olan bu iki hormon birbirleriyle uyumlu olarak çalışmaktadır. FSH sperm üretiminden sorumluyken; LH ise testosteron üretimini uyarmakla görevlidir (Iacqua et al., 2017). Testosteron hormonu ise spermün üretilmesi ve ikincil karakterlerin oluşumu için gereklidir. Spermün asıl üretim yeri, testisler içerisinde bulunan seminifer tübüllerdir. Seminifer tübüller arasına yerleşmiş olan sertoli hücreleri üzerinde bulunan premordiyal germ hücreleri (PGC's) sperm oluşumunu başlamakta, spermün gelişim aşamalarını oluşturan spermatogenez ve fonksiyon kazanımı olan spermiyogenez sonucu olgun sperm meydana gelmektedir (Holstein et al., 2003; Magnuedottir and Surani, 1987). Testisin enine kesit görüntüsü, seminifer tübül yapısı, sperm oluşum basamakları *Şekil 1.* de gösterilmiştir.

SPERMATONGEZ

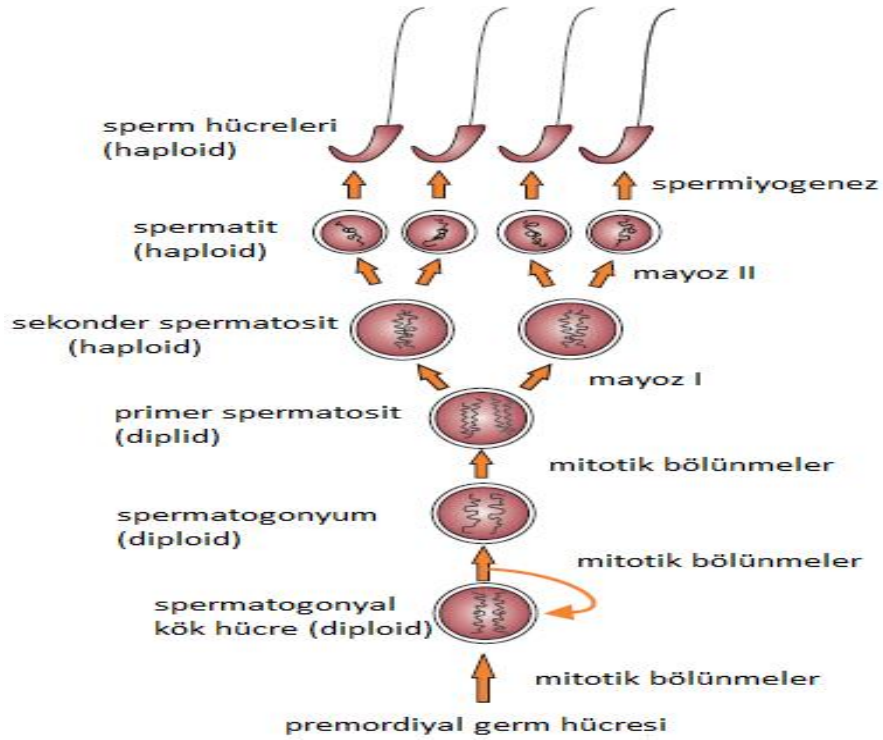


Şekil 1. Testis yapısı ve spermatogenezin oluşum süreci. (Enclopedia Britannica, inc 2010)

2.1.1. Spermin oluşum basamakları

Premordiyal germ hücreleri (PGC) diőide yumurta, erkekte ise sperm hücrelerinin oluşumuna öncülük eden fazlasıyla özelleőmiő olan hücrelerdir. PGC'ler; yeni organizmalarının oluşumunda ve yeni jenerasyonların ortaya çıkmasında, genetik ve epigenetik bilgilerin gelecek kuşaklara aktarılması hususunda programlanmiő oluşumlardır (Magnuedottir and Surani, 1987). Gebeliğin 6. haftasında PGC'ler vitellüs kesesinin duvarından testislere ulaşımını tamamlarlar ve ergenliğe kadar dormans halde kalırlar. Ergenlik döneminde (erkek için 12-14 yaş arası) uyku halinde beklemekte olan bu hücreler bir seri bölünmeler geğirerek olgun sperm oluşurmaktadır (Bart and Gassei, 2010).

Spermatogonyal kök hücreler (SSC) doğum sonrası testis içerisinde PGC orijinli olarak gelişim göstermektedir. Bu esnada özelleşme üzerinde etkili olan iki gen grubu vardır. Bunlar; ekstraembriyonik ektoderm üzerinden ifade edilen BMP4 ve BMP8b genleridir. Mitotik göç sonrası bu hücrelerin etrafı sertoli hücreleri ile sarılarak koruma kalkanı oluşturmaktadır (Magnuedottir and Surani, 1987; Bart and Gassei, 2010). Ergenlik başlangıcından sonra premordiyal germ hücreleri mitotik bölünmeler sonucunda spermatogonyal kök hücrelere dönüşmektedir. Yine mitoz bölünme geğiren hücreler spermatogonyumları oluşturmaktadır.



Şekil 2. Olgun sperm oluşum basamakları şekilde gösterilmiştir.

Sonrasında tekrar mitoz bölünmeler sonucu primer (birincil) spermatoisitler meydana gelmektedir. SSC ve spermatogonyum ve spermatoisitler 46 kromozoma sahip olan diploid hücrelerdir. Bu aşamadan sonra mayoz bölünmeler başlamakta ve kromozom sayılarının yarıya düştüğü haploid hücreler oluşmaktadır. (Şekil 2.) Öncelikle mayoz I sonucu sekonder (ikincil) spermatoisit oluşmakta ve sonrasında mayoz II meydana gelerek spermatitleri oluşturmaktadır (Cheng and Dolores, 2010). Primer spermatoisitler 46 çift kromozom ve 4N yapıdayken; mayoz bölünmeler sonucu oluşan spermatitler 23 tek kromozom ve N yapıdadır. Spermatitler henüz özelleşmemiş ve hareket yeteneği kazanmamış haldeyken spermiyogenez meydana gelerek spermiler hareket yeteneği kazanmakta ve haploid yapıda olan olgun spermilerin oluşum süreci tamamlanmaktadır (Holstein et al., 2003; Cheng and Dolores, 2010).

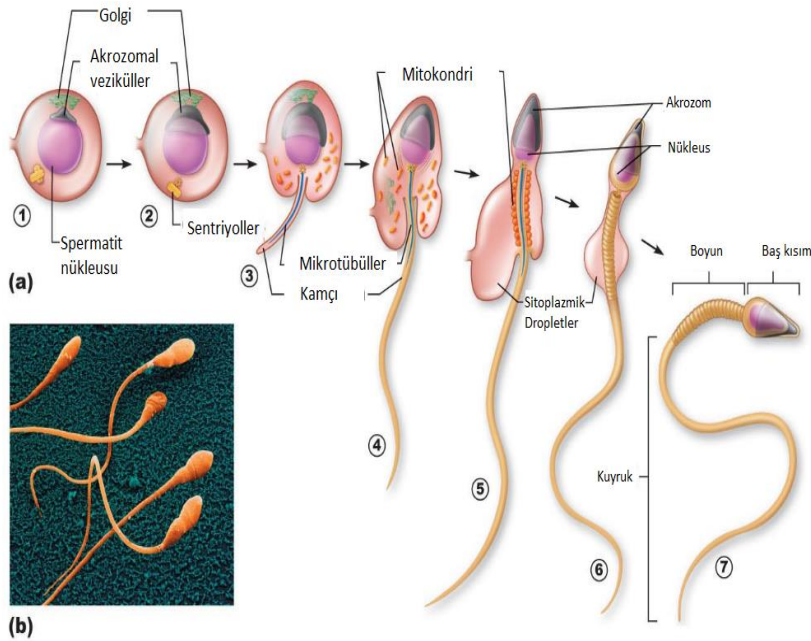
2.1.2. Spermin farklılaşması (Spermiyogenez)

Mitoz ve mayoz bölünmeler geçirip spermatit halini almış olan sperm hücresi henüz dölleme yeteneğine sahip değildir ve olgun sperm olarak değerlendirilmemektedir. Olgun bir spermde bahsedebilmek için spermiyogenez adı verilen farklılaşma sürecinden geçmiş olması gerekmektedir (Esponoda, 1985). Spermiyogenez üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; akrozom oluşumu, kuyruk oluşumu ve kapasitasyondur (Holstein et al., 2003).

1. Akrozom oluşumu ve görevi: Akrozom enziminin fertilizasyonda önemli bir etkisi bulunmaktadır. Spermatidin granüler endoplazmik retikulumunda üretilen hidrolitik enzimler golgiye taşandıktan sonra farklı formasyonda golginin trans yüzeyinden tomurcuklanarak nükleer membrana salınmaktadır (Şekil 3). Sonrasında salınımı gerçekleşmiş olan yapılar nükleer yüzeyde bariyer şeklini alarak akrozom bütünü oluşturmakta ve spermiyogenezin ilk aşaması tamamlanmaktadır (Donnel, 2014). Yumurta hücresinin yüzeyinde bulunan zona pellucidadan salınan hidrolitik enzimler sayesinde spermin rahim içerisindeki yolculuğunda gideceği yönü bulmasında kolaylık sağlamakla beraber; spermin yumurta yüzeyine penetre olmasında da (tutunması) fazlasıyla yararlı olmaktadır. Akrozom spermin baş kısmının üzerini kaplayan bir enzim kümesidir. Sperm yumurta birleşimi gerçekleştikten sonra zona pellucidanın eritilmesi aşamasında görevlidir (Cheng and Dolores, 2010)

2. Kuyruk oluşumu: Mayoz bölünmelerin sonunda oluşan yuvarlak spermde merkezi mikrotübüller kuyruk veya kamçı adı verilen yapıyı oluşturmaktadır. Kuyruğun oluşumu; hareket yeteneği olan birçok silin bir araya gelmesi ve aksonem yapısını oluşturacak genlerin kodlanması ile ortaya çıkmaktadır. Aksonem yapısı merkezi çift bir mikrotübül ve bu yapının etrafını saran dokuz adet mikrotübül yapının bütünü ile oluşmaktadır. 9+2 olarak adlandırılan ve dinein motorlar ile birlikte dalgalı hareketler meydana getirerek sperme hareket yeteneği kazandıran bu yapı; boyun kısmında bulunan ve aksonemi sarmış olan mitokondriyal bölge ile bağlantı kurmakta ve rahim içerisinde yumurtaya ulaşana kadar geçen sürede işlev görmektedir (Lincket al., 2016). Kuyruk oluşumu tamamlanan spermelerde baş ve boyun bölgesini çevreleyen stoplazmik oluşumlar apoptozis ile parçalanır ve spermin seminifer tübüle atılımı gerçekleşir. Sonrasında ductus epididimise gelen spermeler burada çeşitli salgılara maruz kalırlar ve hareket yeteneği kazanırlar (Donnel, 2014).

3. Kapasitasyon: Sperm kapasitasyonu dişi üreme sistemi üzerinde gerçekleşmektedir (Battistone, 2013). Ejaküle halde erkekte ayrılmış olan semen; yumurtayı döllenmeden önce dişi genital bölgesinde bir süre beklemektedir. Servikal mukus ile karşılaşan spermeler bir dizi kimyasal oluşum yardımıyla bu aşamada ejakülattan ayrılmaktadır. Spermin tamamen yıkanması ve yumurtaya başarılı şekilde tutunacak aşamalardan geçmesi bu esnada meydana gelmektedir (Ickowicz et al., 2012).



Copyright © 2010 Pearson Education, Inc.

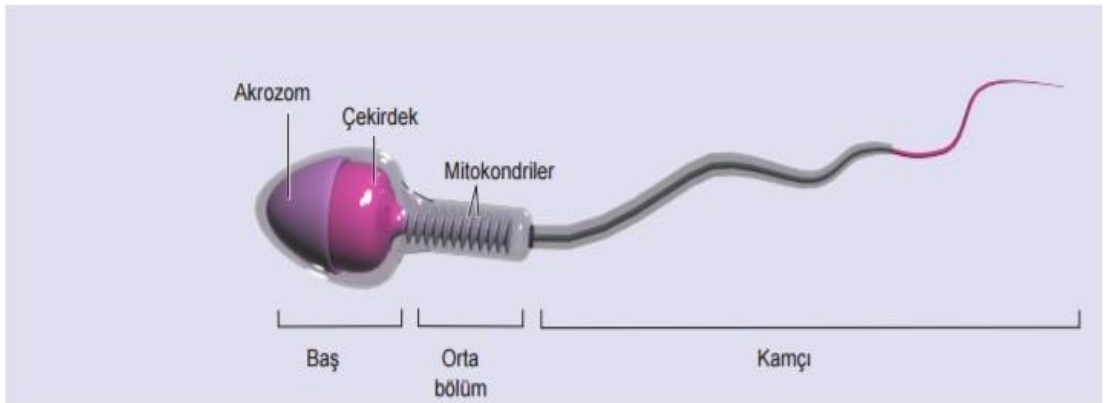
Şekil 3. Spermijenez aşamalarının şematik gösterimi. (Pearson education, 2010)

2.2 Spermin yapısı

Olgun bir sperm hücresi üç kısımdan oluşmaktadır. Bunlar baş kısım, boyun ve kuyruk kısım (Chemes and Alvarez, 2012). Spermin baş bölgesinde nükleus bulunmaktadır. Nükleus içerisinde kalıtsal bilgileri gelecek nesillere aktarma görevi olan DNA bulunmaktadır. Buna ek olarak baş kısımda ayrıca içerisinde çeşitli enzimleri barındıran akrozom bölgesi mevcuttur (Ickowicz et al., 2012; Balhorn, 1982). Akrozomu oluşturan enzimler döllenme aşamasında etkili olmaktadır. Akrozin ve proteaz enzimleri spermin yumurta hücresiyle bulunduğu esnada yumurta hücresini çevreleyen zar ve protein türevli yapıların eritilmesinde yardımcı olmaktadır. Hyaluronidaz enzimi ise; spermin rahim içerisinde yumurta hücresini kemotaksis yoluyla bulmasında kolaylık sağladığı ve yumurta hücresine tutunmasında etkili olduğu bilinmektedir (Stern, 2006).

Sperm hücresinin orta kısmında boyun yapısı yer almaktadır. Boyun bölgesini sarmış olan mitokondri kılıfı hücrenin enerji deposunu oluşturmaktadır. Kuyruk ile baş bölgesini birbirine bağlamaktadır (Chemes and Alvarez, 2012).

Kuyruk kısım ise spermin hareketini sağlayan sil yapısındaki mikrotübüllerden oluşmaktadır. Kamçı hareketleri gerçekleştirerek yön tayinini belirler. Spermin bu kısmında yaşanacak olan anomali durumları, doğal yoldan gebeliğin oluşmasında engel teşkil etmekte ve infertiliteye sebebiyet vermektedir. Ancak bu durum baş kısımda oluşacak anomalinin etkilerine göre klinik anlamda daha kompanse edilebilir durumdadır (Karabulut ve ark. 2018; Chemes, 2003).



Şekil 4. Spermin yapısını oluşturan kısımların şematik gösterimi.

2.3. Semen analizi

Semen analizi; hastanelerin üroloji veya tüp bebek bölümlerinde bu işlemleri yapabilme yetkisine sahip kişiler tarafından gerçekleştirilen ve spermin sayı, hareketlilik ve morfolojik anlamda değerlendirilmesinin bütünüdür. Kişi hekim talebiyle bu işlemi gerçekleştirebileceği gibi; aynı zamanda kendi isteği ile de hastane veya özel bir laboratuvara başvurarak analiz yaptırabilmektedir (Stern, 2006). Erkek bireylerde cinsel sağlık açısından kişinin herhangi bir sorunla karşılaşmadan önce de bu testleri düzenli aralıklarla yaptırması ve takibini sağlaması hekimlerce tavsiye edilmektedir. Çünkü olası bir erken teşhis, diğer sağlık sorunlarında olduğu gibi cinsel sağlık alanında da önlem alınmasını kolaylaştırmaktadır (Dolores, 2010). İleri yaş ve sperm sayısının ciddi anlamda düşüşü sonrasında doğal yoldan gebelik elde edilme şansı bazen hiç kalmamaktadır. Bazı hastalarda ise semeninde hiç sperm bulunmadığı tespit edildikten sonra kişiye uygun tedavi yöntemi planlanmaktadır (Karabulut ve ark., 2018). Bu açıdan bakıldığında semen analizi; gerek tüp bebek tedavisinde gerekse doğal yoldan gebelik isteyen çiftlerin yaşantısında ciddi anlamda önemli yer tutmaktadır. Semen analizi yaptırmak isteyen kişinin, başvurduğu kurumca adına bir dosya açılmakta veya hasta numarası atanmaktadır. Sonrasında üzerinde barkod sistemi ile adı-soyadı-hasta numarası-tarih ve kimlik numarası yapılandırılmış olan semen kabı teslim edilmekte ve hasta semen verme odasına alınmaktadır (Kadıoğlu ve ark. WHO el kitabı, 2010). Mastürbasyon yoluyla elde edilen semen; öncelikle 20-40 dakika aralığında değişen likefaksiyon süresince 37°C sıcaklıkta bulunan etüv veya laminar kabin içerisinde bekletilmektedir. Böylelikle katı parçacıklar halinde bulunan semen sıvısı ergime göstererek homojen bir sıvı haline gelmekte ve spermlerin tamamı bağımsız halde hareket özgürlüğüne kavuşmaktadır (WHO, 2010). Eğer bu süreye riayet edilmez ise; sperm hücreleri tam olarak hareketlilik kazanamamış durumda kalabilmektedir. Aynı zamanda hem sayısal anlamda yanlış veri elde edilme durumu yaşanabilir, hareketlilik doğru saptanamamış olabilir hem de morfolojik yayma ve analiz işleminin sağlıklı bir şekilde devam ettirilmesi olanaksız hale gelebilmektedir. Her üç parametrede de gözlemsel olarak analiz gerçekleştirilmektedir (Eliasson, 1978). Yapılan işlemler kaliteli bir elden çıkmaz ise çok farklı sonuçlar ortaya çıkabilmekle birlikte; iyi gözlem ve analiz yapan iki kişi arasında birbirine çok yakın değerler elde edilmektedir. Bu anlamda işlemleri gerçekleştiren kişinin deneyim ve el becerisi önem kazanmaktadır.

2.3.1 Sperm konsantrasyonunun belirlenmesi

Likefaksiyon süresi tamamlanan sperm örneğinden 10 µl alınarak makler adı verilen sayım kamarasının (Resim 1.) tabla kısmına bırakılır. Hava boşluğu kalmayacak şekilde cam kapağı üstünden kapatılır. Işık mikroskopunda 20x objektif ile bakılarak gözlenen 100 kare içerisinde herhangi 10 kare sayılır ve sonuç milyon sperm olacak şekilde yazılır (Molecular Biology book, 2012). Spermde hareketliliğin belirlenmesi için ileri yönde doğrusal hareket yapan spermelerin sayısı, doğrusal hareket yapmayan spermelerin sayısı, yerinde hareketli spermelerin sayısı ve hareketsiz spermelerin sayısı belirlenerek ve toplam sperm sayısı ile ayrı ayrı oran-orantı yapılarak yüzdelik olarak hareket değerleri hesaplanmaktadır (Barrat et al, 2011).



Resim 1. Makler sayım kamarası

2.3.2. Sperm morfolojisinin belirlenmesi

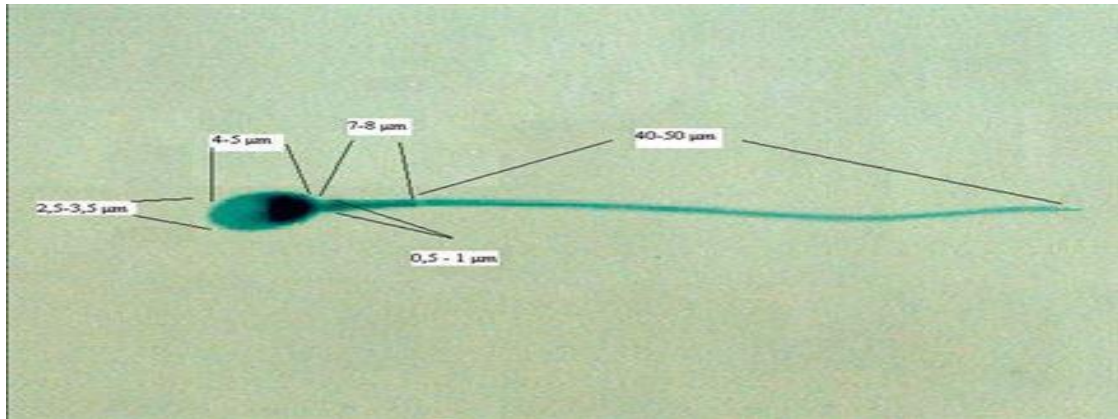
Sperm morfolojik olarak değerlendirilirken Dünya Sağlık Örgütü verileri ve Kruger Strict kriterleri göz önüne alınarak hesaplama yapılmaktadır (WHO, 2010). Sayım işlemi gerçekleştirilen semen örneğinden yaklaşık 5-10 µl alınarak lam üzerine ince bir şerit oluşturacak şekilde bırakılır. Lamel yardımıyla 45 derecelik açı oluşturularak lam boyunca sürüntü ve yayma işlemi yapılır (Guzick et al., 2001). Sırasıyla fiksatif ve sperm boyama kaplarında bekletilen lam; son olarak sürüntü olmayan kısmından yıkanarak kurumaya alınır. Kuruma işleminden sonra ışık mikroskopunun 100x objektifinde immersiyon yağı damlatılarak ve yaklaşık 100 sperm sayılarak gözlenen baş, boyun ve kuyruk defektleri tablo halinde not edilerek

yüzdeler olarak anomaliler belirlenmektedir (Franken and Oehninger, 2011). WHO verilerine göre semende %4 ve üzerinde normal sperm morfolojisi bulunan örnekler normal olarak kabul edilmektedir (Tablo 1.).

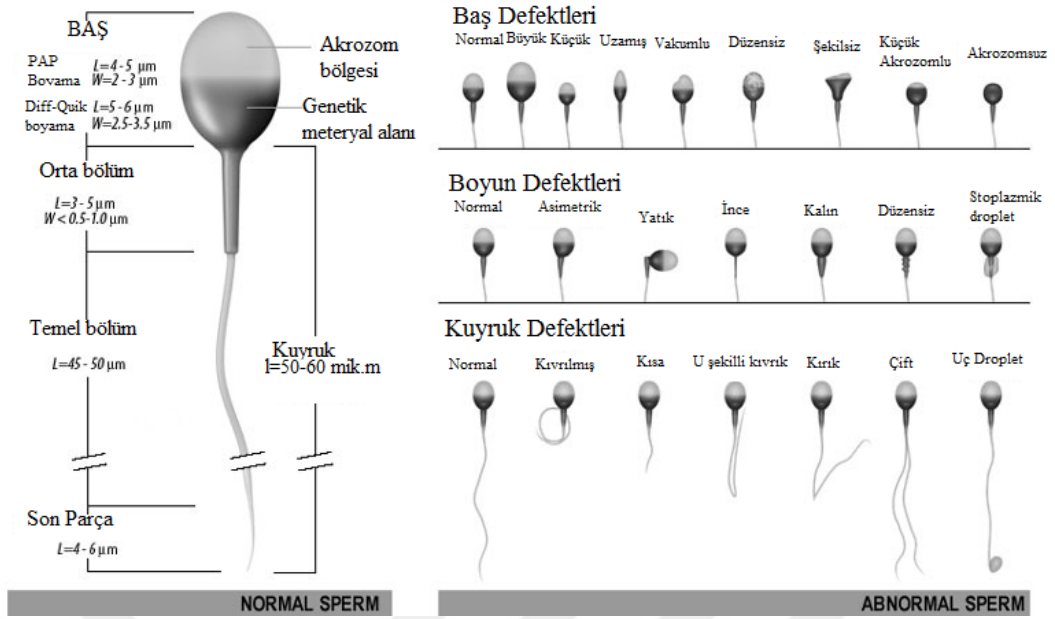
Parametre	En düşük Referans
Semen miktarı (ml)	1.5
Sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$ /ml)	15
Toplam sperm sayısı ($\times 10^6$ /ejakülat)	39
İleri hareketli sperm sayısı (%)	32
Toplam hareketlilik (%)	40
Canlılık (canlı spermler, %)	58
Sperm morfolojisi (%)	4
pH	≥ 7.2
Lökosit (10^6 /ml)	< 1

Tablo1. Semen Analizi Kruger kriterlerine göre normal sperm parametreleri, Dünya sağlık örgütü (WHO 2010)

Spermin boyandıktan sonra akrozom/nukleus oranı %40-60 arasında olmalıdır. Oval şeklinde düzgün bir baş görüntüsü, 1 μ m kalınlıkta ve 7-8 μ m uzunlukta bir boyuna sahip ve yaklaşık 40-50 μ m uzunlukta düzgün yapıda bir kuyruğa sahip sperm normal morfolojili kabul edilmektedir (Menkveld et al, 2011.) (Resim 2).



Resim 2. Normal morfolojiye sahip sperm yapısı



Şekil 5. Kruger değerlendirmesine göre sperm morfolojik görünüşleri (www.ineskumedika.com/normozoospermia-sperma)

Baş bölgesinde meydana gelen anomaliler sperm yumurtayı bulması ve delmesinde sorunlar oluştururken; boyun ve kuyruk mekanizmasında görülen anomaliler sperm hareket yeteneğinin azalması veya kaybolmasına neden olmaktadır (Chemes and Alvarez, 2012) (Şekil 5).

2.3.3. Sperm hazırlık yöntemleri

Sayımı gerçekleştirilen ve morfolojik değerlendirilmesi tamamlanan sperm örneklerinin tüp bebek işlemlerine girmeden önce bir dizi işlemde geçirilmesi gerekmektedir. Bunlar gradient solüsyonu ile ayrıştırma yöntemi ve yıkama-yüzdürme (swim-up) metodudur (Oguz ve ark. 2018).

1. Yoğunluk farkı ile ayrıştırma (gradient) yöntemi:

Spermeler üretildikten sonra beslenme ve koruyucu amaçla testiste beklediği süre boyunca semen adı verilen sıvı içerisinde muhafaza edilmektedir. Spermeler işleme girmeden önce semenden ayıklanması gerekmektedir. Bunun için yoğunluk farkı oluşturularak %50-%90 veya %50-70-90'lık olacak şekilde hazır olarak satılan gradient solüsyonları ile tabakalar oluşturulmaktadır. Sonrasında sperm en üstten bırakılarak 1800 rpm hızda 20 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra üst fazlar atılarak en altta kalan kısımdaki sperm sıvısı toplanmaktadır (Weinbauer et al. 2010).

Bu kısımdaki spermier toplanıp ¼zerine yıkama sol¼syonu eklenerek tekrar santrif¼jden ge¼irilmekte ve b¼ylelikle gradient y¼ntemi tamamlanmış olmaktadır. Bu spermier ile direkt işlem yapılabileceği gibi; ikinci bir y¼ntem olan yıkama-y¼zd¼rme işlemine de tabi tutulmaktadırlar.

2. Yıkama-y¼zd¼rme (swim-up) y¼ntemi:

Semen ¼rneęi ¼zerine direkt uygulanan sperm yıkama sol¼syonu ile homojenize edilir ve santrif¼j ile 1800 rpm'de 10 dakika s¼reyle uygulanmaktadır. İşlem bittikten sonra tekrarlanmakta ve sonrasında ¼st faz alınarak pellet kısmının ¼zerine 45 derecelik a¼ı olacak şekilde tutularak yavaşça yıkama sol¼syonu eklenmektedir. 30 dakika-1 saat sonrasında ¼st faza doğru y¼zm¼ř olan spermier toplanarak işlemlerde kullanılmaktadır (Volpes et al., 2016).

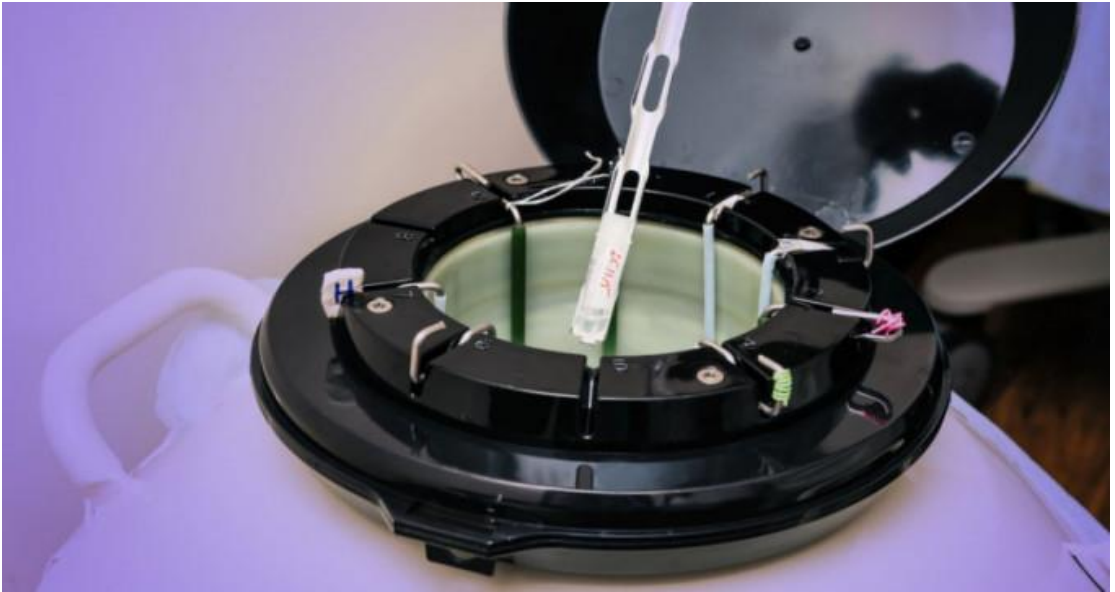
2.4. Spermier dondurulması

Spermier o an i¼in kullanılmayacaksa dondurma-saklama işlemi ile birlikte uzun yıllar boyunca muhafaza edilebilmektedir. Spermierin uzun s¼reli saklanmalarında ¼zel koruyucu sol¼syon kullanılmasının yanında, saklama ortamı da oluşturulmaktadır (Oberoi et al., 2016). Spermier yıkama işleminden ge¼irildikten sonra veya yıkama yapılmaksızın semeniyle birlikte ¼zel olarak hazırlanmış olan sperm dondurma sol¼syonundan 1:1 oranında spermier ¼zerine eklenmesiyle birlikte işlem ger¼ekleřtirilmektedir. Sperm dondurma sol¼syonu (freezing medium) eklenirken ins¼lin iğnesi ile damla damla olacak şekilde spermier ¼zerine bırakılmalıdır. Hızlı muamele g¼rmesi durumunda toksik etki oluşturabileceğinden sperm sayı ve hareketliliğinde azalma meydana gelebilmektedir (Oberoi et al., 2016; Ozkavukcu ve ark., 2008). 2-3 dakika s¼rede karıştırma işlemi tamamlandığında oda sıcaklığında aynı s¼re bekletildikten sonra; doğrudan azot sıvısına dokundurulmadan azot buharına maruz kalacak şekilde 10-15 dakika s¼resince bekletilmeli ve donma işlemi g¼zle g¼r¼ld¼kten sonra azot sıvısı i¼erisine batırılabilir. Azot sıvısı -196 °C olup sıvı haldeyken bile buharlaşma g¼sterebilmektedir (Resim 3). Sperm dondurma sol¼syonu bu sıcaklıkta spermier saklanmasına yardımcı ve dayanıklı olarak ¼retilmektedir.



Resim 3. Spermin dondurulması esnasında kullanılan sıvı azot ve koruyucu kryovial kap. (aydinilgin.com/dondurma-teknikleri)

Dondurulmuş spermilerin saklandığı tankların (Resim 4.) içerisinde bulunan sıvı azot seviyesi her zaman belirli bir düzeyde tutulmalıdır. Eğer sınırdaki bulunan seviyenin altına düşerse spermde çözünme meydana gelebilir ve saklama işlemi sağlıklı şekilde yürütülemez (Di Santo et al., 2011). Tanklardaki azot sıvısı miktarı gün aşırı kontrol edilmelidir.



Resim 4. Dondurulmuş sperm örneklerinin saklandığı sıvı azot tankı.

Dikkat edilmesi gereken diğer bir önemli nokta da; kryovial üzerine kodlanmış olan isim-soy isim-doğum tarihi-işlem tarihi etiketinin silinmeyecek bir şekilde kodlanmış olduğunun mutlaka kontrol edilmesidir (Rozati et al., 2017).

2.5 Sıcaklığın sperm hücreleri üzerindeki etkisi

Ortam sıcaklığının hücre tipleri üzerindeki etkileri değişkenlik göstermektedir. Bazı hücreler vücut sıcaklığında uzun süre yaşantısını sürdürebilirken; sperm hücreleri vücut ısısı olan 36,5 °C'den daha serin ortamda hayata tutunabilmektedir. Nitekim erkek bireylerdeki vücut yapısı da bu şekilde bir özelleşme göstererek skrotumu meydana getirmiştir. Skrotumun temel görevi spermleri vücut ısısından daha serin bir ortamda tutarak yaşamalarına elverişli ortam hazırlamaktır. Skrotum içerisindeki ısı vücut ısısı olan 36,5 °C'den yaklaşık 2 °C daha düşüktür (Waseem et al.,2011). Modifikasyon yeteneği olan bu yapı eğer ortam ve vücut ısısı yükselmeye başladıysa kendini uzaklaştırarak sarkık bir hale gelmekte; tam tersi bir soğuk hava ve vücut ısısına maruz kaldığında ise büzüşmekte ve ideal ısısını korumak istemektedir (Ilacqua et al. 2017; Waseem et al.,2011).

Testis ortamı yüksek ısılarla maruz kalmış olan erkeklerin üreme fizyolojisinde ve sperm kapasitede bozukluklar yaşanmaktadır. Doktorların dizüstü bilgisayarını kullanırken dizlerinin üzerinde tutmayın uyarısı da bu gibi sorunların yaşanmasına önlem olarak söylenmektedir. Yüksek sıcaklık spermlerde hareket yeteneğindeki düşüşü ve morfolojik bozuklukları da beraberinde getirmektedir. DNA yapısında bozulmalar ve sperm hücrelerinin ölümüyle sonuçlanan etkileri gözlenmektedir (Rex and Aagard, 2016).

2.6. Ortam sıvısının sperm hücreleri üzerindeki etkisi

Spermin içerisinde bulunduğu ortam sıvısının faydaları olduğu gibi bazen de zararlı ve toksik etkileri görülebilmektedir (Ozkavukcu ve ark., 2008). Uzun süreli aynı sıvı içerisinde bekletilen spermin hareketinde değişim gözlenmekte ve DNA yapısında bozukluklar oluşabilmektedir. Semen plazmasında sülfür, potasyum, kalsiyum, titanyum, demir, nikel, çinko, brom, rubidyum gibi elementler bulunmaktadır (Kasten, 1967). Spermin üretiminden vücut dışındaki ortama maruz kaldığı sürece kadar koruyucu ve besleyici bir görev üstlenen semen sıvısı, dış ortamda uzun süreli spermlere maruz bırakıldığında içerdiği bileşenlerden dolayı zarar verici etkiler ortaya çıkarabilmektedir (Hsien-Ming et al., 2012). Hatta üretiminden sonra testis içerisinde uzun süreli bekletilmiş olan sperm hücrelerinin hareketliliğinin, vücuttan atıldığı zaman incelendiğinde ciddi oranda düşüş gösterdiği; bazen de tamamının

hareketsiz durumda kalmasıyla sonuçlanan örnekler yapılan klinik çalışmalarda gözlenmiştir (Sikka and Hellstrom, 2016). Sperm yıkama solüsyonu (gradient) ile muamele görmüş olan spermelerin hareketliliğinde artış gözlenmektedir. Bazı hareketsiz ve hareket yeteneği düşük spermeler elemine edilerek; hareketliliği iyi olan spermeler elde edilmekte ve daha dengeli ve uzun süre yaşayabileceği uygun ortam şartları oluşturulmaktadır. İçeriğinde HEPES adı verilen dengeleyici tuz çözeltisine sahiptir. Spermî semen içeriğinden ayırma görevi üstlenen yıkama solüsyonu ile semen içeriğine göre daha az yoğun ortam elde edilmektedir. Böylelikle spermin hareket kapasitesinde pozitif yönelim gözlemlenmektedir (Zhou et al., 2015).

2.7. Spermde DNA hasarının belirlenmesi

DNA yapısı itibariye çift sarmal iplikten oluşmaktadır. Ortam koşullarının değişmesi sonucunda DNA yapısında hasarlar ve kırıklıklar meydana gelmektedir (Zini et al, 2006). Bu hasarların tespit edilmesinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Sperm kromatin yapısı analizi, terminal transferaz yöntemi, asidik anilin mavisi boyama, kromomisin A3 boyama, toluidin mavisi boyama, akridin oranj boyama bunlardan bazılarıdır. Bu tez çalışmasında DNA hasar tespiti için akridin oranj boyama yöntemi seçilmiştir (Zini et al,2006; Belloc et al., 2009).

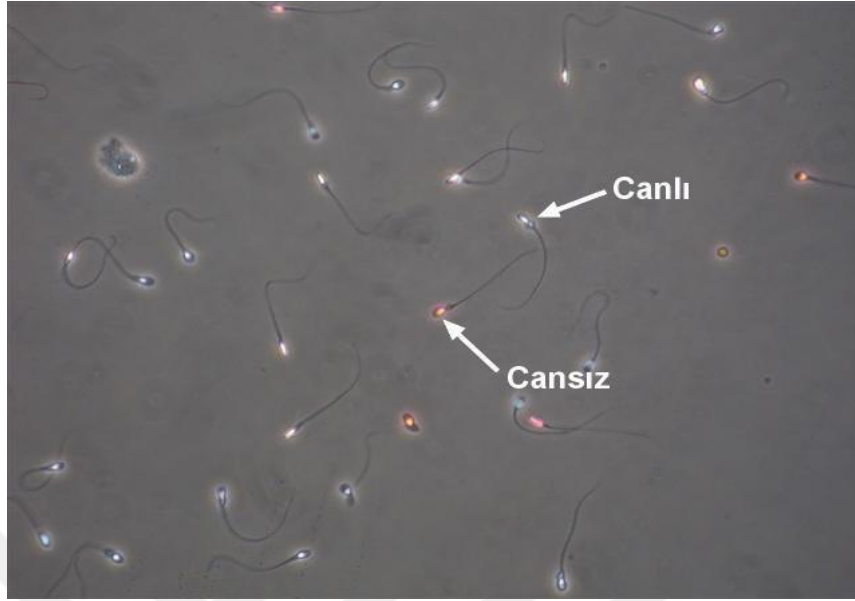
2.7.1. Akridin oranj (AO) boyama yöntemi

Akridin turuncusu, bakterilerin nükleik asitlerine ve diğer hücrelere bağlanan florokromatik bir boyadır. UV ışığı altında, akridin turuncusu RNA ve tek şeritli DNA'yı turuncu renkte boyar; çift şeritli DNA yeşil görünür (Kasten, 1967). Böylelikle nükleik asit hasarı gerçekleşmiş olan spermeler ile normal spermeler ayırt edilebilmektedir.

2.8. Spermde canlılığın belirlenmesi

Sperm çalışmalarında hücre canlılığının tespit edilmesinde Eosin-Y testi uygulanmaktadır. Canlı hücreler baş kısımda boyayı içeri almazken; ölü hücrelerde Eosin boyası spermin baş bölgesine difüzyonla geçiş yapar ve ışık mikroskobu altında kırmızı renkte görünüm sağlar. Böylelikle içerisinde boya bulunmayan ve

beyaz renkte gözlenen spermler sayılarak yüzdelik olarak hücre canlılığı tespit edilmektedir (Lingappa, 2015).



Resim 5. Eosin-Y testi sonucu gözlenen canlı (beyaz) ve ölü (kırmızı) sperm hücreleri.

2.9. Spermde ölü hücrelerin tespiti

Ölü hücrelerin tespit edilmesinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Işık mikroskobu altında gözlenebilen (hematoksilen-eosin, giemsa) boyama yöntemleri olduğu gibi floresan mikroskopla tespiti yapılan DAPI, PI, hoechst gibi boyalar da mevcuttur. (Sperctor et al, 1998; Tesarik et al., 1998). Ayrıca faz-kontrast mikroskobu, western blotlama ve flow-sitometri yöntemlerini de kullanarak ölü hücrelerin oranı belirlenebilmektedir (Güleş ve Eren, 2008).

2.9.1. Propidyum İyodür (PI) boyama yöntemi

PI; membran bütünlüğü tamamen bozulmuş, nekrotik ve geç apoptotik yolla ölen hücrelerin tespit edildiği floresan mikroskop ışığı altında kırmızı renkte ışımaya yapan bir boyama yöntemidir. Erken apoptotik evredeki hücreler veya normal yapıdaki hücreler üzerinde boyama gerçekleştirilmemektedir (Overbeeke, 1998; Tesarik et al., 1998). Floresan yöntemler dışında flow (akış) sitometrisi yöntemi ile de hücrelerin ölü / canlı oranını PI boyama ile tespit etmek mümkündür.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmaya alınan gruplar ve özellikleri

Bu çalışma; Ocak 2019 ile Haziran 2019 tarihleri arasında Biruni Üniversite Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan ve Biruni Üniversitesi bünyesinde farkındalık oluşturmak amacı ile yapılmış olan ‘Genç erkeklerde üreme sağlığı farkındalığı ve semen analizi’ adlı seminer sonrasında katılım gösteren erkek öğrenci grubundan gönüllülük esasına dayanarak toplanmış olan semen örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubu 25 kişiden oluşmaktadır ve Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre *normal* kabul edilen sperm örnekleri ile işlemler gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada planlanan yaş aralığı 18-35 olup; herhangi bir kalıtsal hastalığa sahip olan, testis bölgesinde ameliyat geçmişi bulunan, spermi OAT yapıda olan ve cinsel perhiz süresi 2 ila 7 gün aralığında olmayan kişiler gruptan dışlanmıştır.

Tez çalışmasında spermler için kritik değere sahip olduğu öngörülen üç farklı sıcaklık değeri seçilmiştir. Bunlar 4 °C, oda sıcaklığı (RT) ve 37 °C’dir. Aynı kişilerden alınmış olan örnekler iki farklı ortam sıvısında 24 saat süre ile muamele edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

1.Grup: Dünya Sağlık Örgütünün kabul ettiği normospermik özelliklere sahip semen örneklerinin herhangi bir ayırıştırma işleminden geçmeksizin doğrudan plazma sıvısı ile 24 saat süresince bekletilerek sonuçlarının değerlendirildiği 25 kişiden oluşmaktadır (PS=Plazmik semen örneği).

2.Grup: Dünya Sağlık Örgütünün kabul ettiği normospermik özelliklere sahip semen örneklerinin gradient solüsyonu ile ayırıştırılarak 24 saat süresince bekletildiği ve sonuçlarının değerlendirildiği aynı 25 kişiden oluşmaktadır (GS=Gradient sonrası sperm örneği).

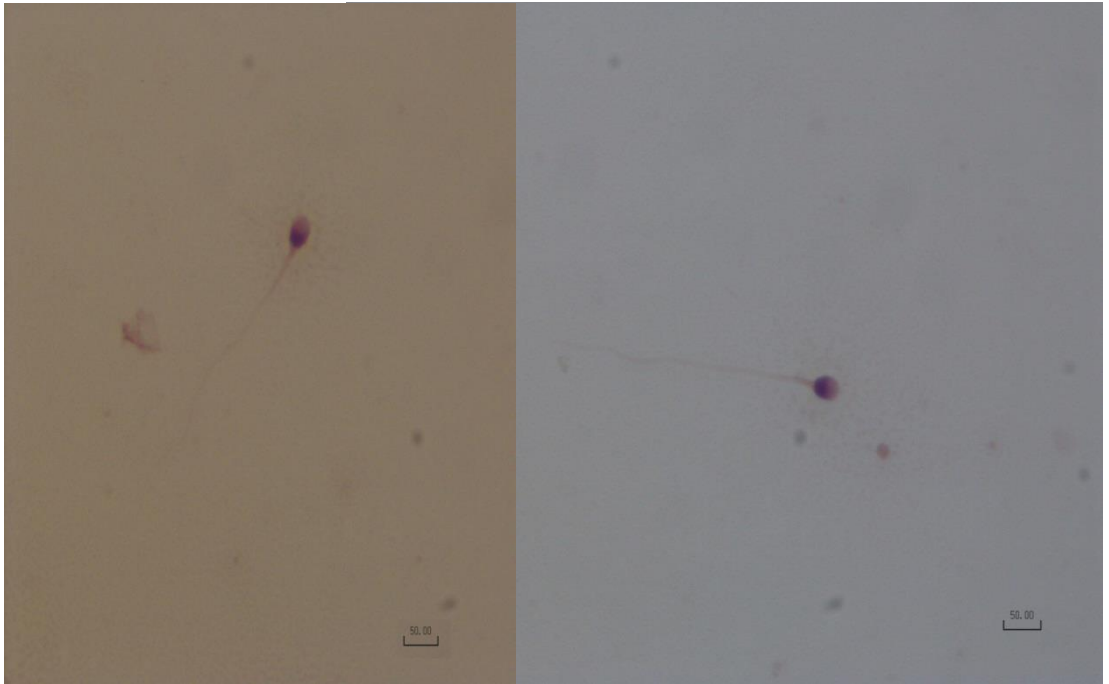
Çalışma sonuçlarını belirlemek amacıyla iki farklı boyama yöntemi kullanılmıştır. Boyalardan bir tanesi ölü hücrelerin tespit edilmesini sağlayan Propidyum İyodür (PI), diğeri ise DNA fragmantasyonunun belirlenmesinde rol alan Akridin Turuncusu (Akridin orange =AO)’dur. Her iki boyama yönteminde de 100 sperm sayılarak sonuçlar yüzdelik olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışma Acıbadem Üniversitesi'nin 21.03.2019 tarih ve 2019/6 sayılı Atadek toplantısında görüşülmüş olup tıbbi etik yönden onaylanmıştır.

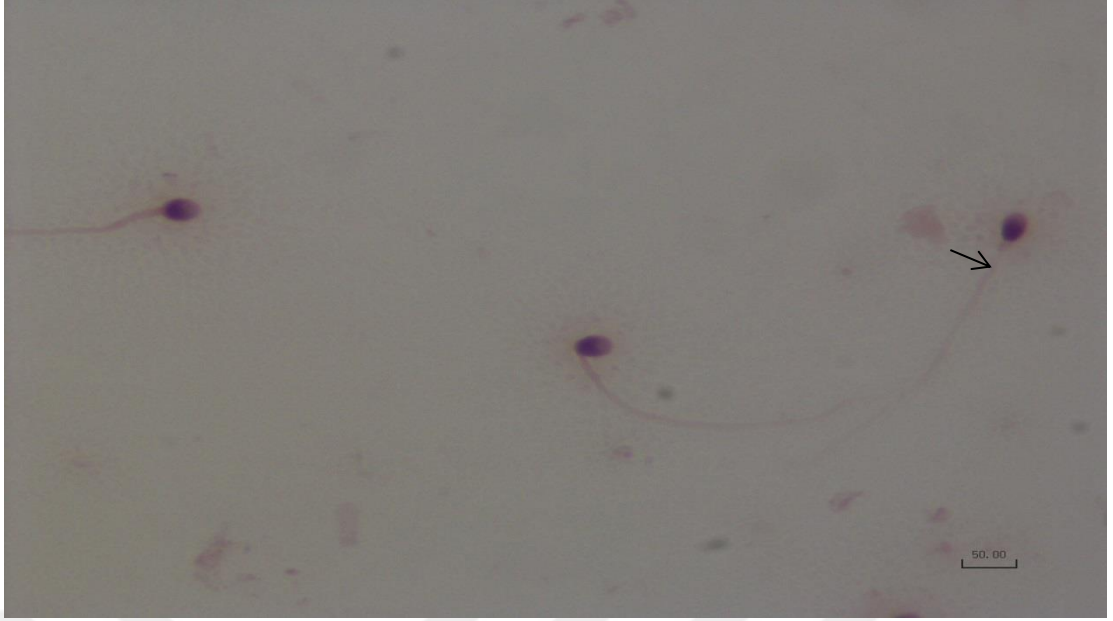
3.2. Çalışmada kullanılan yöntemler

3.2.1. Semen analizi uygulaması

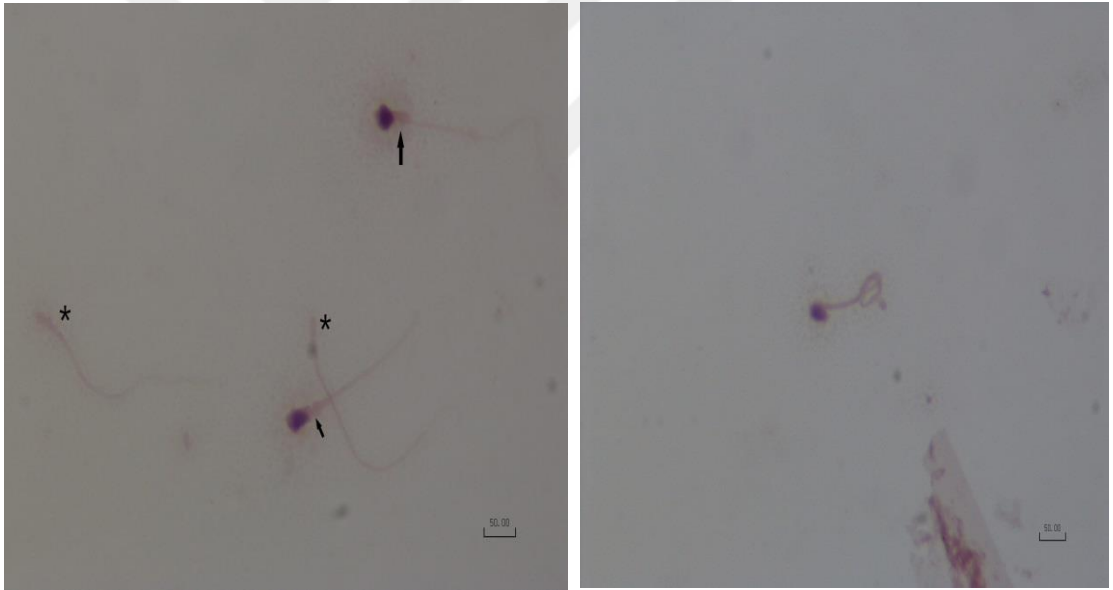
Laboratuvara ulaşan semen örneklerinin likefiye olma süresi beklendikten sonra pH ölçümü gerçekleştirildi. Sonrasında volüm, sperm sayısı, viskozite, lökosit sayısı (varsa) değerlendirildi. Son olarak morfolojik değerlendirme için semen örneği lam üzerine damlatılarak lamel ile 45°'lik açı oluşturacak şekilde sürüntü alındı ve önce fiksatifte bekletildi daha sonra hematoksin ile boyama işlemi gerçekleştirildi. İmmersiyon yağı yardımıyla ışık mikroskobu altında 100x kat büyütme ile Kruger strict kriterleri üzerinden morfoloji incelemesi gerçekleştirildi. 100 adet sperm ile değerlendirme yapılarak yüzdelerik sonuçlar elde edildi. Normal morfolojiye sahip (Resim 6.) spermlerden minimum %4 değere sahip olan semen örnekleri ile tez çalışması gerçekleştirildi.



Resim 6. *Kruger strict* kriterlerine göre normal morfolojik yapıya sahip olan spermatozoolar.



Resim 7. Kırık boyun defekti (ortada), mitokondriyal kayıp (sağda, siyah ok), normal sperm (solda).



Resim 8. Boyun dropletleri (siyah oklar), iğne baş sperm (* ile belirtilen), dag defekti (sağda)

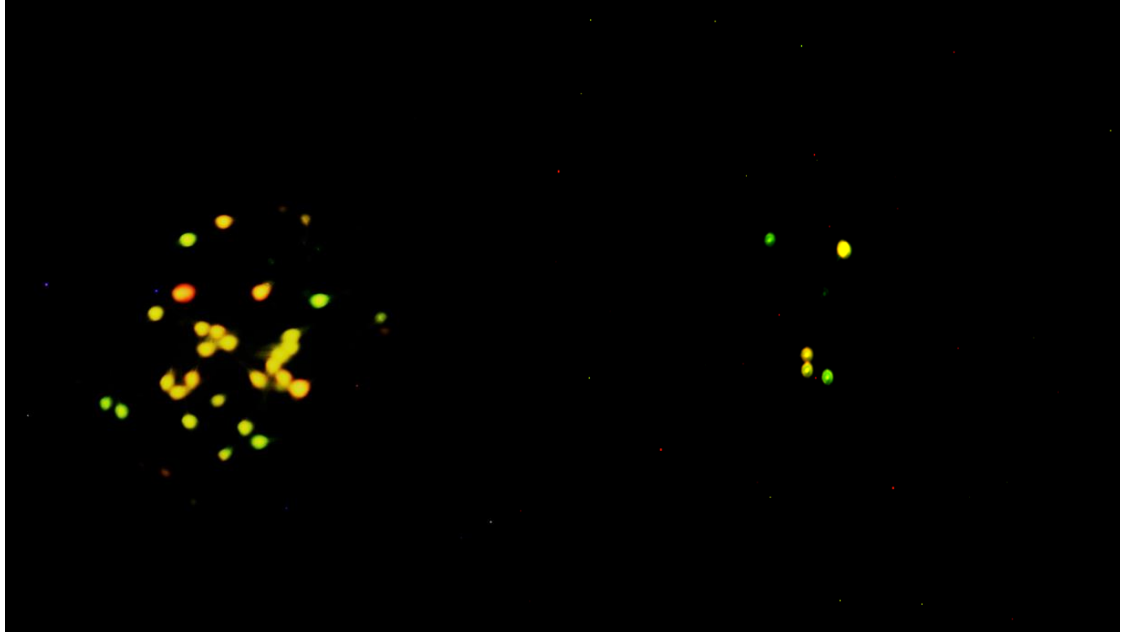
3.2.2. Gradient yöntemi

Sayım işlemi ve morfolojik değerlendirmesi tamamlanan sperm örnekleri gradient yöntemi ile yıkama işleminden geçirildi. Buradaki amaç spermin semen plazmasından ayrıştırılarak farklı bir ortam oluşturulmasıdır. All grad (*Life global*) solüsyonu ile tek faz oluşturacak şekilde %100'lük gradient çalışması 15'lik falkon tüpte hazırlandı. 45°'lik açı ile tutularak yavaş bir şekilde üzerine 1 ml semen örneği

eklendi. 1800 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek fazlar elde edildi. Üst kısımda kalan semen örneği ile gradient solüsyonu pipet yardımıyla çekilerek pellet bırakıldı. Pellet üzerine 1 ml HTF solüsyonu eklendi ve 1200 rpm'de 10 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. Supernatan kısım atılarak pellet üzerine 1 ml DMEM eklendi ve üç farklı sıcaklık değeri için eppendorf tüplere eşit şekilde paylaştırıldı. Gradient işlemi sonrası tekrar sayım işlemi gerçekleştirildi, hareketlilik oranları belirlendi ve not edildi.

3.2.3. DNA fragmentasyonunun Akridin Oranj boyası ile tespit edilmesi

Semen örnekleri yayma preparat şeklinde hazırlandıktan sonra Cannoy solüsyonu ile 3 saat fikse edildi. Sonrasında akridin oranj boyası ile 5 dakika süreyle muamele edildi. Lam, preparatın ters tarafından su ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakıldı. Floresan mikroskobu altında 200x kat büyütme ile görüntüler alındı (Resim 9.) Yeşil renkte görüntü veren sperm hücrelerinin DNA'sı hasara uğramamışken; turuncu ve kırmızı renkte parlama gösteren spermelerde DNA hasarı olduğu gözlemlendi. 100 adet sperm sayıldıktan sonra Turuncu renk / Turuncu+Yeşil renk sperm oranı ile fragmentasyon oranı belirlendi (DFI%).

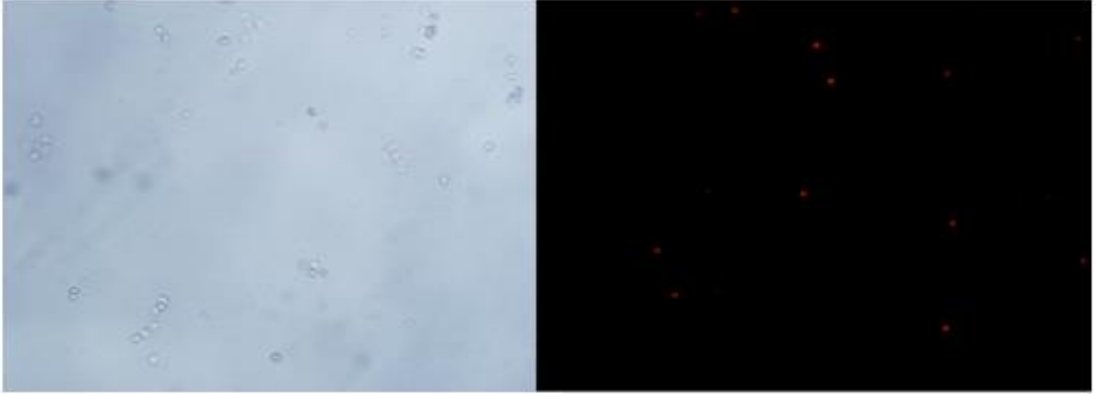


Resim 9. Spermilerin *Akridin Oranj* boyama sonrası floresan mikroskobu altındaki görüntüsü (200x). Yeşil renkler DNA hasarının olmadığı normal spermeleri, turuncu ve kırmızı renkler ise DNA hasarlı spermeleri göstermektedir.

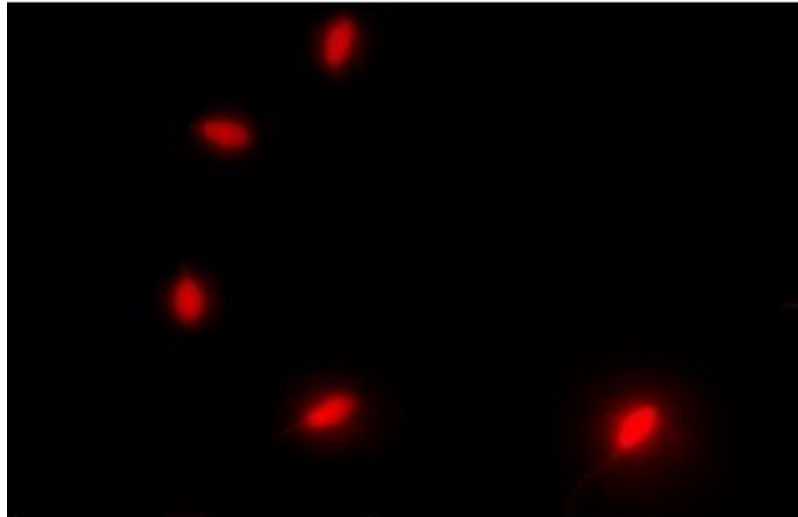
3.2.4. Ölü hücrelerin Propidyum İyodür boyası ile gösterilmesi

PI boyama; ölü hücreleri tespit etmede kullanılan bir yöntemdir. Hücre membranı normalde PI boya için geçirgen değildir; ancak hücre ölümü gerçekleştiğinde ve membran yapısı bozduğunda boya hücre içine alınmakta ve floresan mikroskop altında kırmızı yansıma yapmaktadır. Kırmızı noktalar (Resim 10.) ölü sperm hücrelerini göstermektedir.

Stok boyadan 1 µg alınarak 1 ml PBS tampon solüsyonu içerisinde çözdürüldü. Sonrasında bu çözeltilerden 10 µl alındı ve 990 µl PBS içerisinde çözüldü. Boyama işlemi için lam üzerinde 1:2 oranında boya-semen örneği damlatılarak 10 dakika süreyle bekletildi ve yayma işlemi gerçekleştirildi. Son olarak floresan mikroskopunda mavi ışık altında 100 adet sperm sayımı işlemi gerçekleştirildi ve ölü hücrelerin tüm hücre sayısına bölünmesi ile yüzdelik ölü sperm sayısı elde edildi.



Resim 10. Ölü sperm hücrelerinin *Propidyum İyodür* boyama ile görüntülenmesi (10x10 büyütme). Sol tarafta ışık mikroskobu görüntüsü yer alırken sağ tarafta aynı alanın floresan mikroskobu görüntüsü yer almaktadır. Kırmızı renkteki spermler ölü hücreleri göstermektedir.



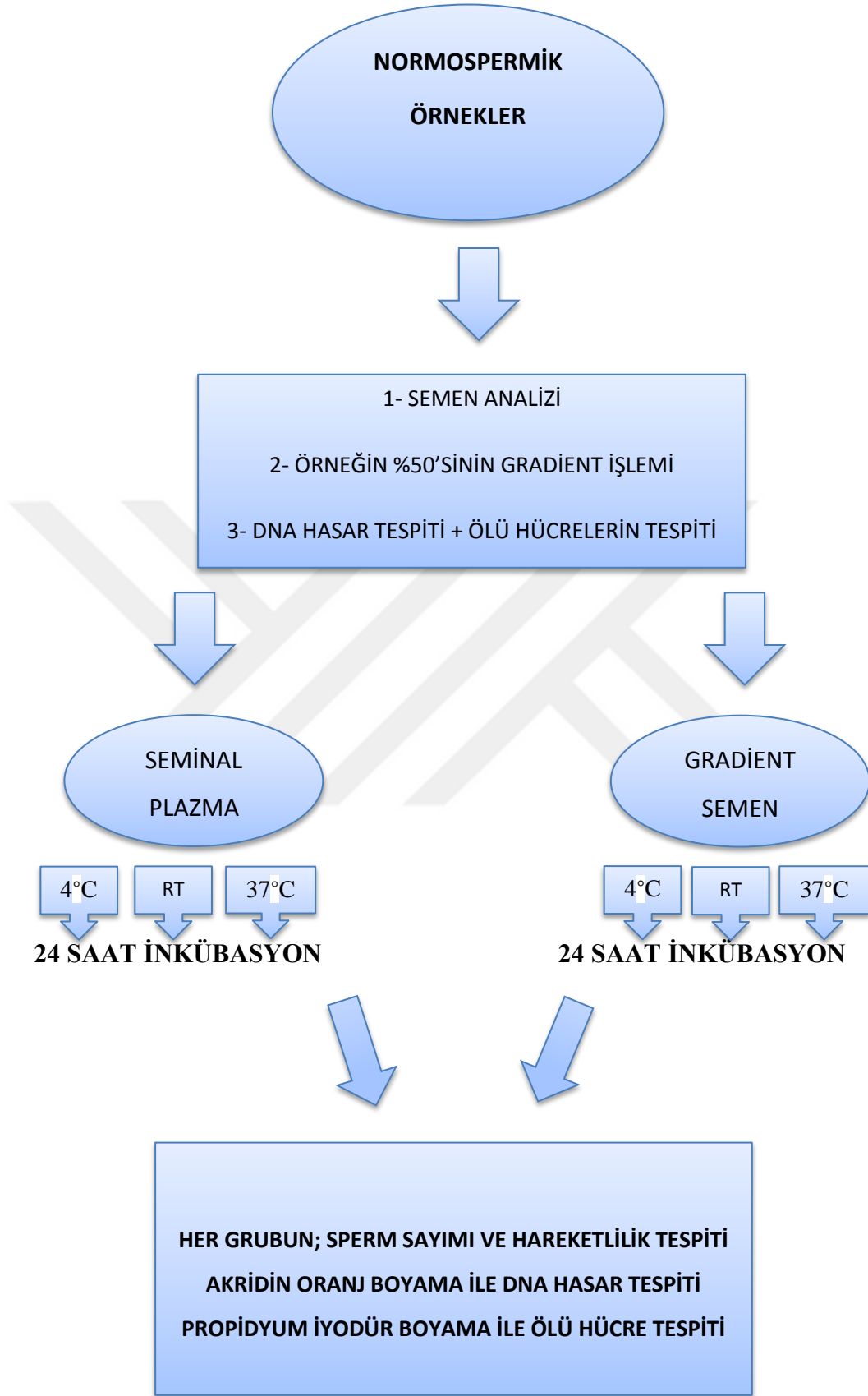
Resim 11. Spermlerin PI boyama sonrası floresan mikroskop görüntüsü (100x10 büyütme)

3.3. Kullanılan malzemeler

1	Falkon grubu pipetler ve tüpler	B.D.Bionsciences	AMERİKA
2	Steril sperm toplama kabı	Fırat Med	TÜRKİYE
3	Eppendorflar	Eppendorf Gmbh	ALMANYA
4	Laminar flow	K systems	VİETNAM
5	Mikroskop	Nikon	JAPONYA
6	İnkübatör	Nüve	TÜRKİYE
7	Santrifüj	Eppendorf	ALMANYA
8	Pastör pipeti	Heinz Herenz Medical	ALMANYA
9	Sperm yıkama solüsyonu	IrvineScientific	AMERİKA
10	Pure sperm	Life Global	AMERİKA
11	200 mikrolitre pipetör	EppendorfGmbh	ALMANYA
12	Hepes solüsyonu	IrvineScientific	AMERİKA
13	10 mikrolitre pipetör	EppendorfGmbh	ALMANYA
14	Makler kamarası	SefiMedical	ISRAİL
15	Steril eldiven	Beybi Plastik	TÜRKİYE
16	Propidyüm iyodür boyası	Stemcell Technologies	KANADA
17	Akridin Orange boyası	Biotium Technologies	AMERİKA
18	Floresan mikroskobu	Olympus	JAPONYA
19	Lam	Isolab	HOLLANDA
20	Lamel	Isolab	HOLLANDA

3.4 Çalışmanın tasarımı

Bu çalışma; spermelerin uygun sıcaklık ve uygun saklanma ortamında muamele edilerek 24 saat süre ile muhafaza edilmesi şeklinde planlanmıştır. Sıcaklık değeri olarak 4°C-RT-37°C seçilmiş ve ortam sıvısı olarak işlemde geçmemiş olan *saf semen* örneği ile gradient işlemi sonrası oluşan ortam sıvısı belirlenmiştir. Normospermik özellikteki 25 adet gönüllünün semen örnekleri ile çalışma gerçekleştirilmiştir.



3.5. Çalışmada kullanılan istatistiksel yöntemler

Tez çalışmasında değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Veriler *GraphPad Prism 6.01* programı kullanılarak değerlendirildi. Grupların normal dağılıma uygunluğu D'Agostino-Pearson testi ile değerlendirildi. İkili grup karşılaştırmalarında parametrik Student's t testi, üç veya daha fazla grup karşılaştırılmalarında ise One Way ANOVA testi kullanıldı. Çoklu değerlendirmelerde Tukey testi kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farkın anlamlılık derecesi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Tez çalışması için Biruni Üniversite Hastanesi üroloji polikliniğinde bu çalışmaya katılmayı kabul eden ve aydınlatılmış onam formunu imzalayan 25 gönüllüden semen örneği alınmıştır. Alınan semen örnekleri laboratuvar ortamında değerlendirilmiş ve analiz sonuçları Tablo 2. de verilmiştir.

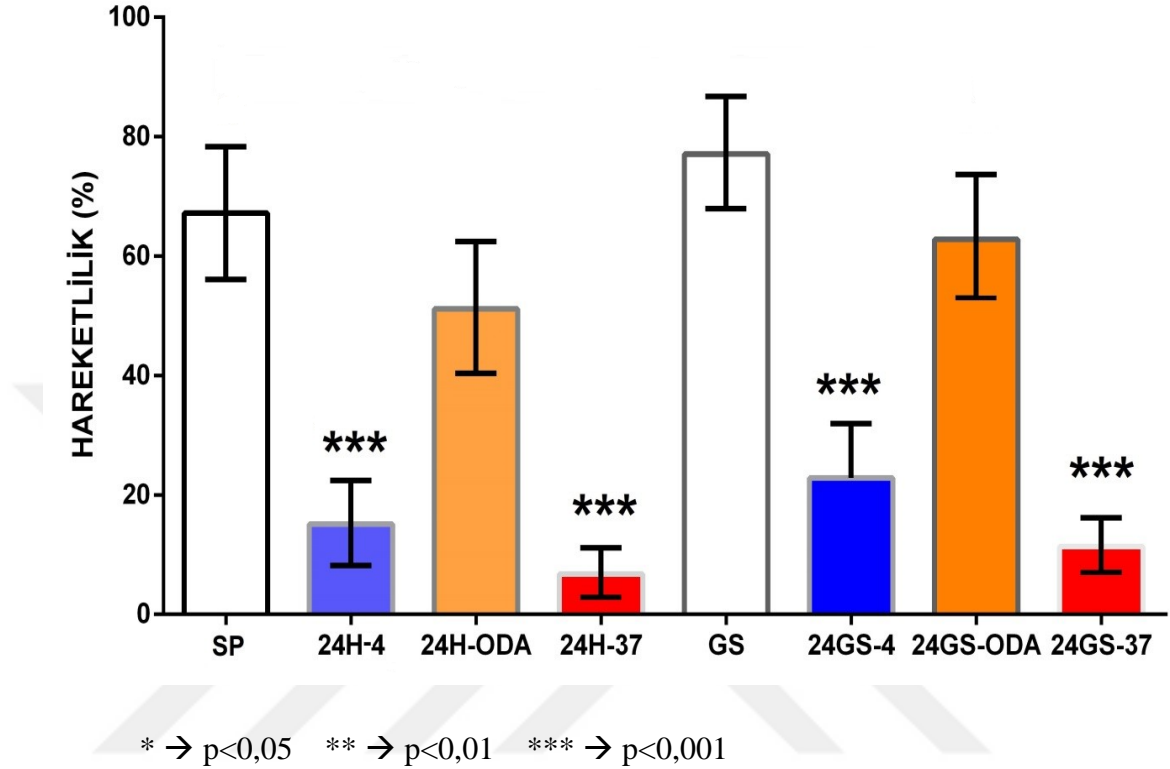
Tablo 2. Çalışmaya dahil edilen semen örneklerinin özellikleri (n=25)

	Ort.± Standart Sapma	MİN.	MAKS.
YAŞ (yıl)	25,6 ± 4,9	18	34
SEMEN HACMİ (ml)	3,5 ± 1,3	2	6
KONSANTRASYON (sayı/ml)	60,2 ± 25,4	25	120
TOPLAM SPERM SAYISI (milyon)	192,5 ± 67,2	78	360
TOPLAM HAREKETLİLİK (%)	67,2 ± 11,1	44	88
İLERİ HIZ (%)	56,5 ± 11,9	38	79
YERİNDE HAREKET (%)	10,7 ± 5,1	4	26
HAREKETSİZ (%)	32,8 ± 11,1	12	56
MORFOLOJİ (%)	5,3 ± 1,3	4	8

Çalışma grubunun ilk analiz sonuçlarına göre yaş ortalaması 25,6±4,9, semen hacmi 3,5±1,3 sperm konsantrasyonu 60,2±25,4, hareketlilik 67,2±11,1 ve morfolojisi 5,3±1,3 olarak değerlendirildi. Toplam hareketlilik %40'tan büyük bir değere sahiptir ve kontrol grubu oluşturmak için WHO verilerine göre yeterli düzeydedir. Morfolojik değerlendirme açısından bakılacak olursa, minimum %4 olması gereken değerden büyük veya eşit yüzdeye sahip örnekler ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

Kontrol grubu ve gradient işlemi gerçekleştirilmiş örneklerin 24 saat üç farklı sıcaklıkta saklandığı sonuçlar Grafik 1'de gösterildi. Kontrol grubunda hareketlilik oranı normal semen örneklerinde 51,2±11,3, 15,1±7,3, 6,7±4,4 olarak ölçüldü. Gradient grubunda ise hareketlilik oranı 62,8±10,9, 22,8±9,1, 11,4±4,8 olarak ölçüldü. Dört farklı koşulda da gradient solüsyonu ile işlem görmüş olan sperm örneklerinin, işlem görmeden semen plazması ile ortam sıvısı oluşturulanlara göre hareketliliğinin daha yüksek olduğu anlamlı sonuçlara dayanarak söylenebilmektedir (p<0,05).

Grafik 1. Seminal plazma ve gradient işlemleri sonrası sıvılarda 24 saat süre ile bekletilen spermelerin sıcaklık değerlerine göre hareketliliğinde değişim gözlenmiştir.



Tüm grafiklerde;

SP 0. Saat = İlk sayım sonrası ölçülen semen plazmasındaki toplam oran

GS 0. Saat = Gradient işlemi sonrası ölçülen ilk oran

4 °C/24=4 °C’de saklanan semen plazması örneğinin 24 saat sonraki oranı

RT/24 = Oda sıcaklığında saklanan semen plazması örneğinin 24 saat sonraki oranı

37°C/24 = 37°C’de saklanan semen plazması örneğinin 24 saat sonraki oranı

GS 4°C/24 = 4 °C’de saklanan gradient sperm örneğinin 24 saat sonraki oranı

GS RT/24 = Oda sıcaklığında saklanan gradient sperm örneğinin 24 saat sonraki oranı

GS 37°C/24 = 37°C’de saklanan gradient sperm örneğinin 24 saat sonraki oranı göstermektedir.

Beyaz sütun kontrol grubunu, Mavi sütun 4 °C’yi, Sarı sütun oda sıcaklığını (RT), Kırmızı sütun 37°C’yi temsil etmektedir.

Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında farklı sıcaklık ortamındaki hareketlilik oranı farkı her iki grupta da anlamlıydı (p<0,0001, Tablo 3; çoklu karşılaştırma tablosu).

Tüm gruplarda 24 saat sonrasında hareketlilik oranında düşüş gözlenmekle birlikte en anlamlı düşüş oranı spermilerin 37°C’de semen plazması içerisinde saklanması sonucu gerçekleşmiştir (Grafik 1).

Hareketliliğin sıcaklık değerleri değişiminden en az etkilendiği grup, oda sıcaklığında (RT) dansite gradient işlemi sonrası saklanan spermeler üzerinde gözlenmiştir.

Tablo 3. Spermilerin saklanma koşullarına göre hareketliliğinde oluşan değişim istatistiksel anlamlılık düzeyinde tablo halinde gösterilmiştir.

HAREKETLİLİK	Ortalama ± SS	MİN.	MAKS.	p değeri
Seminal plazma (Kont)	67,2 ± 11,2	44	88	
Gradient sperm (Kont)	77,8 ± 9,7	60	95	
24 saat 4 °C (SP)	15,12 ± 7,3	5	32	p < 0,001
24 saat RT (SP)	51,16 ± 11,3	28	72	p > 0,05
24 saat 37 °C (SP)	6,76 ± 4,4	1	18	p < 0,001
24 saat 4 °C (GS)	22,84 ± 9,1	10	45	p < 0,001
24 saat RT (GS)	62,8 ± 10,9 #	39	83	p > 0,05
24 saat 37 °C (GS)	11,36 ± 4,8	5	22	p < 0,001

: İstatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmeyen grup.

Tüm gruplar incelendiğinde sperm hareketliliğinin ortam sıcaklığına göre en az değişimin gözlemlendiği grup oda sıcaklığında saklanan spermelerde gerçekleşmiştir. Her iki ortam sıvısında da oda sıcaklığında saklanan örnekler en az hareketlilik kaybına uğrayan gruplar olmuştur. Ortam sıvıları kendi aralarında değerlendirildiğinde, gradient işleminden geçirilmiş olan spermelerdeki hareketlilik artışının anlamlı derecede fark oluşturduğu gözlenmiştir (p<0,05). Artışın en fazla görüldüğü grup; hem oda sıcaklığında saklanmış hem de gradient işleminden geçirilmiş olan örneklerdir.

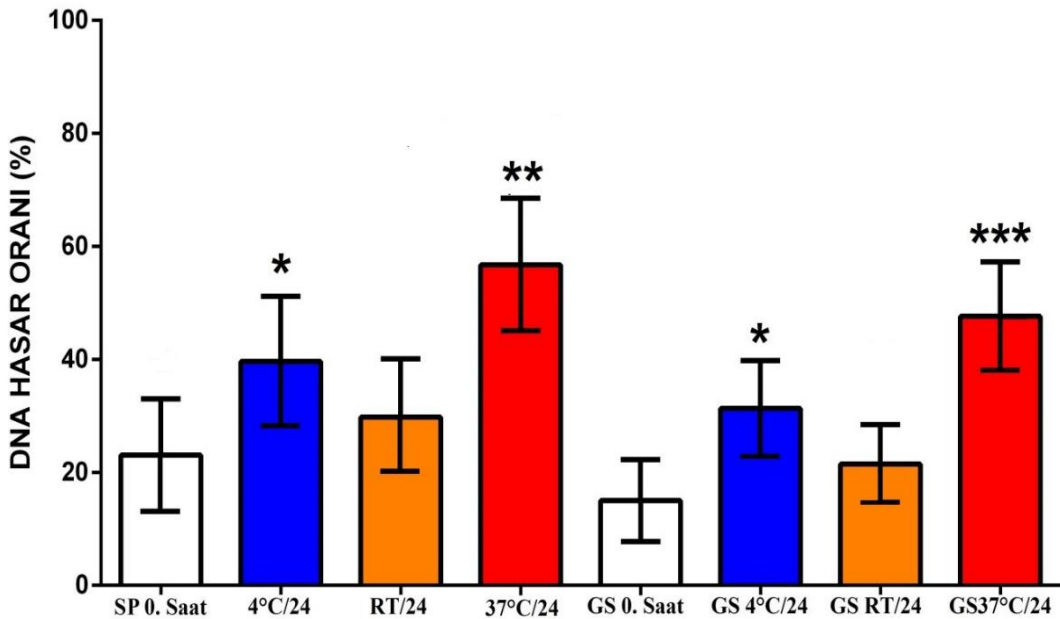
Tablo 4. Sperm hareketlilik oranının farklı sıcaklık değerlerindeki farklarının karşılaştırılması.

Tukey's testi (kontrol grubu)	Ortalama farkı	95% CI'nin farkı	p
SP 0. Saat vs. 4 °C/24	52.08	47.43 to 56.73	<0,05
SP 0. Saat vs. RT/24	16.04	12.39 to 19.69	<0,05
SP 0. Saat vs. 37°C/24	60.44	55.46 to 65.42	<0,05
4 °C/24vs. RT/24	-36.04	-40.59 to -31.49	<0,05
4 °C/24vs. 24H-37	8.360	6.346 to 10.37	<0,05
RT/24vs. 37°C/24	44.40	39.51 to 49.29	<0,05

Tukey's testi (gradient grubu)	Ortalama farkı	95% CI'nin farkı	p
GS 0. Saat vs. GS 4°C/24	54.24	47.65 to 60.83	<0,05
GS 0. Saat vs. GS RT/24	14.28	7.688 to 20.87	<0,05
GS 0. Saat vs. GS 37°C/24	65.72	59.13 to 72.31	<0,05
GS 4°C/24 vs. GS RT/24	-39.96	-46.55 to -33.37	<0,05
GS 4°C/24 vs. GS 37°C/24	11.48	4.888 to 18.07	<0,05
GS RT/24 vs. GS 37°C/24	51.44	44.85 to 58.03	<0,05

Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında farklı sıcaklık ortamındaki hareketlilik oranı farkı her iki grupta da anlamlıydı (p<0,001, Tablo 4; çoklu karşılaştırma tablosu).

Grafik 2. Seminal plazma ve gradient işlemi sonrası sıvılarda 24 saat süre ile bekletilen spermlerin sıcaklık değerlerine göre DNA fragmentasyonunda farklılıklar gözlenmiştir.



Seminal plazma grubu ve gradient işlemi gerçekleştirilmiş semen örnekleri 24 saat süre ile 4 °C, oda sıcaklığı ve 37°C'de bekletildi ve DNA hasar oranlarındaki değişim Grafik 2'de gösterildi. Seminal plazma grubunda DNA hasar oranı 29,8±10,3, 39,6±11,6, 56,7±11,8 olarak ölçüldü. Gradient grubunda ise DNA hasar oranı 21,4±7,0, 31,3±8,4, 47,6±9,6 olarak ölçüldü (Tablo 5). Dört farklı koşulda da gradient solüsyonu ile işlem görmüş olan sperm örneklerinin, işlem görmeden semen plazması ile ortam sıvısı oluşturulanlara göre DNA hasar oranının daha düşük olduğu gösterildi (p<0,05).

Tablo 5. Spermilerin saklanma koşullarına göre DNA fragmentasyonunda oluşan değişim istatistiksel anlamlılık düzeyinde tablo halinde gösterilmiştir.

DNA HASARI	Ortalama ± SS	MİN.	MAKS.	p değeri
Seminal plazma (Kont)	23,8 ± 9,9	10	42	
Gradient sperm (Kont)	15 ± 7,3	6	35	
24 saat 4 °C (SP)	39,6 ± 11,6	22	66	p < 0,05
24 saat RT (SP)	29,8 ± 10,3	13	48	p > 0,05
24 saat 37 °C (SP)	56,72 ± 11,8	35	79	p < 0,01
24 saat 4 °C (GS)	31,32 ± 8,4	16	51	p < 0,05
24 saat RT (GS)	21,44 ± 7,1 #	11	32	p > 0,05
24 saat 37 °C (GS)	47,6 ± 9,6	30	65	p < 0,001

: İstatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmeyen grup.

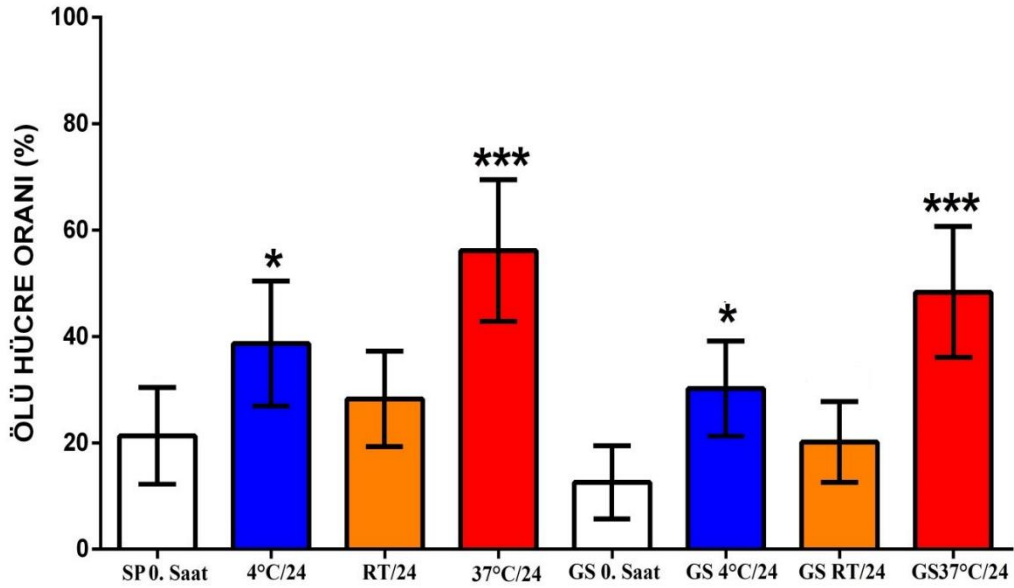
Tablo 6. Sperm DNA hasar oranının farklı sıcaklık değerlerindeki farklarının karşılaştırılması.

Tukey's testi (seminal plazma)	Ortalama farkı	95% CI'nin farkı	p
SP 0. Saat vs. 4 °C/24	-6.720	-8.309 to -5.131	<0,05
SP 0. Saat vs. RT/24	-33.64	-38.27 to -29.01	<0,05
SP 0. Saat vs. 37°C/24	8.080	5.862 to 10.30	<0,05
4 °C/24vs. RT/24	-26.92	-30.67 to -23.17	<0,05
4 °C/24vs. 24H-37	14.80	12.18 to 17.42	<0,05
RT/24vs. 37°C/24	41.72	36.82 to 46.62	<0,05

Tukey's testi (gradient grubu)	Ortalama farkı	95% CI'nin farkı	p
GS 0. Saat vs. GS 4°C/24	8.280	5.202 to 11.36	<0,05
GS 0. Saat vs. GS RT/24	18.16	14.00 to 22.32	<0,05
GS 0. Saat vs. GS 37°C/24	-8.000	-11.51 to -4.489	<0,05
GS 4°C/24 vs. GS RT/24	9.880	8.069 to 11.69	<0,05
GS 4°C/24 vs. GS 37°C/24	-16.28	-18.90 to -13.66	<0,05
GS RT/24 vs. GS 37°C/24	-26.16	-29.49 to -22.83	<0,05

Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında farklı sıcaklık ortamındaki DNA hasar oranı farkı her iki grupta da anlamlıydı ($p < 0,001$, Tablo 6; çoklu karşılaştırma tablosu).

Grafik 3. Seminal plazma ve gradient işlemi sonrası sıvılarda 24 saat süre ile bekletilen spermilerin sıcaklık değerlerine göre ölü hücre oranında farklılıklar gözlenmiştir.



Grafik 3.'teki sonuçlara göre sıcaklık grupları kendi aralarında kıyaslandığında gradient işleminden geçirilmiş ortamda muhafaza edilen spermlerdeki ölü hücre oranları seminal plazma sıvısında bekletilen örneklerle göre daha düşüktür. Gradient işlemlerinin gerçekleştirilmesi; ölü hücre sayısında oluşabilecek artış oranını düşürdüğü grafikten anlaşılmaktadır.

Seminal plazma grubu ve gradient işlemi gerçekleştirilmiş semen örneklerin 24 saat süre ile 4 °C, oda sıcaklığı ve 37°C’de bekletildi ve ölü hücre oranlarındaki değişim Grafik 3’de gösterildi. Seminal plazma grubunda ölü hücre oranı 28,2±9,0, 38,7±11,4, 56,2±13,3 olarak ölçüldü. Gradient grubunda ise ölü hücre oranı 20,2±7,6, 30,2±9,0, 48,3±12,4 olarak ölçüldü (Tablo 7). Dört farklı koşulda da gradient solüsyonu ile işlem görmüş olan sperm örneklerinin, işlem görmeden semen plazması ile ortam sıvısı oluşturulanlara göre ölü hücre oranının daha düşük olduğu gösterildi (p<0,05).

Tablo 7. Spermilerin saklanma koşullarına göre ölü hücre oranında oluşan değişim istatistiksel anlamlılık düzeyinde tablo halinde gösterilmiştir.

ÖLÜ HÜCRE ORANI	Ortalama ± SS	MİN.	MAKS.	p değeri
Seminal plazma (Kont)	21,32 ± 9,1	8	41	
Gradient sperm (Kont)	12,56 ± 6,9	3	28	
24 saat 4 °C (SP)	38,68 ± 11,7	20	64	p < 0,05
24 saat RT (SP)	28,24 ± 9,0	16	49	p > 0,05
24 saat 37 °C (SP)	56,16 ± 13,31	36	80	p < 0,001
24 saat 4 °C (GS)	30,2 ± 8,9	18	56	p < 0,05
24 saat RT (GS)	20,16 ± 7,6 #	10	38	p > 0,05
24 saat 37 °C (GS)	48,28 ± 12,4	28	75	p < 0,001

: İstatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmeyen grup.

Tablo 8. Spermde ölü hücre oranının farklı sıcaklık değerlerindeki farklarının karşılaştırılması.

Tukey's testi (Seminal plazma)	Ortalama farkı	95% CI'nin farkı	p
SP 0. Saat vs. 4 °C/24	-6.920	-8.396 to -5.444	<0,05
SP 0. Saat vs. RT/24	-34.84	-39.82 to -29.86	<0,05
SP 0. Saat vs. 37°C/24	8.760	7.057 to 10.46	<0,05
4 °C/24vs. RT/24	-27.92	-32.40 to -23.44	<0,05
4 °C/24vs. 24H-37	15.68	14.18 to 17.18	<0,05
RT/24vs. 37°C/24	43.60	38.57 to 48.63	<0,05

Tukey's testi (gradient grubu)	Ortalama farkı	95% CI'nin farkı	p
GS 0. Saat vs. GS 4°C/24	-17.64	-20.70 to -14.58	<0,05
GS 0. Saat vs. GS RT/24	-7.600	-9.841 to -5.359	<0,05
GS 0. Saat vs. GS 37°C/24	-35.72	-40.49 to -30.95	<0,05
GS 4°C/24 vs. GS RT/24	10.04	7.494 to 12.59	<0,05
GS 4°C/24 vs. GS 37°C/24	-18.08	-21.87 to -14.29	<0,05
GS RT/24 vs. GS 37°C/24	-28.12	-32.78 to -23.46	<0,05

Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında farklı sıcaklık ortamındaki ölü hücre oranı farkı her iki grupta da anlamlıydı ($p < 0,001$, Tablo 8; çoklu karşılaştırma tablosu).

24 saat sonraki sonuçlar değerlendirildiğinde; seminal plazma ile oluşturulan gruplardaki en yüksek ölü hücre oranı %56,16 ile 37°C'de saklanan sperm örneklerinde gözlenmiştir. Yine aynı gruplar içerisinde en düşük ölü hücre oranının gözlemlendiği sperm örnekleri oda sıcaklığında muhafaza edilen grup içerisinde (20,16%) tespit edilmiştir.

Tüm gruplar incelendiğinde; 4°C'de saklanan örneklerin 37°C'de bekletilen örneklere göre daha az ölü hücre barındırdığı gözlenmiştir (Tablo 6).

Anlamsal farklılığın en yüksek seviyede tespit edildiği grup 37 °C'de bekletilen örneklerde gözlenmiştir. Sıcaklığa bağlı olarak ölü hücre sayısında artışın görüldüğü, her üç grup kendi arasında kıyaslandığında ortaya çıkmaktadır. Yine her üç sıcaklık ortamı incelendiğinde; sıcaklığın düşük olduğu ortamda bulunan sperm örnekleri; yüksek sıcaklığa maruz kalmış olan sperm örneklerinden daha çok hayatta kalma olasılığı olduğu anlaşılmaktadır.

Ölü hücre sayısının en az olduğu ve canlılık oranının en yüksek seviyeye çıktığı, saklama koşulları bakımından en ideal grup oda sıcaklığı (RT) olarak tespit edilmiştir.

24 saat sonra analiz edilen semen örneklerinin sonuçları ayrıntılı olarak Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Farklı sıcaklıklarda bekletilen semen örneklerinin hareketlilik, ölü hücre ve DNA hasar oranları

Tüm Gruplar		ORTALAMA	S.SAPMA	MİN	MAKS	
24 saat sonra seminal plazma analizi	Hareketlilik oranı (%)	4 °C	15.12	7.321885	5	32
		Oda sıcaklığı	51.16	11.29779	28	72
		37°C	6.76	4.380639	1	18
	Ölü hücre oranı (%)	4 °C	38.68	11.7428	20	64
		Oda sıcaklığı	28.24	8.992034	16	49
		37°C	56.16	13.31565	36	80
	DNA hasar oranı (%)	4 °C	39.6	11.55783	22	66
		Oda sıcaklığı	29.8	10.27943	13	48
		37°C	56.72	11.80932	35	78
24 saat sonra gradient semen analizi	Hareketlilik oranı (%)	4 °C	22.84	9.113543	10	45
		Oda sıcaklığı	62.8	10.87045	39	83
		37°C	11.36	4.803471	5	22
	Ölü hücre oranı (%)	4 °C	30.2	8.953584	18	56
		Oda sıcaklığı	20.16	7.619493	10	38
		37°C	48.28	12.41142	28	75
	DNA hasar oranı (%)	4 °C	31.32	8.439589	16	48
		Oda sıcaklığı	21.44	6.988562	11	32
		37°C	47.6	9.643651	30	62

5. TARTIŞMA

Günümüzde yardımcı üreme tekniklerine (ART) duyulan ihtiyaç gün geçtikçe artış göstermektedir. Yılda ortalama %7 civarı doğum ART kullanılarak gerçekleşmektedir (Hochschild et al., 2002). Bu nedenden dolayı spermilerin kaliteli bir şekilde seçilmesi, hazırlık sürecinden geçirilmesi, iyi kalitede saklama koşullarında tutulması ve en önemlisi yüksek kalitede embriyo elde edilmesi büyük önem taşımaktadır. DNA bütünlüğünün ortadan kalkması ve hasarların oluşması fertilizasyonu olumsuz anlamda etkilemekle birlikte; embriyo gelişiminin duraksaması, olumsuz gebelik süreci, düşüklerin oluşması ve çeşitli hastalıklar barındıran bireylerin dünyaya gelmesi gibi durumlara sebebiyet vermektedir (Tavalaee et al., 2009).

İyi kalitede spermilerin elde edilebilmesi için; semen örneğinin özellikleri, sperm hazırlık yöntemleri, sperm saklanma süresi ile ortamın sıcaklığı ve sperm hazırlık süspansiyonlarının kalitesi gibi koşullar önem arz etmektedir. Doğru bir hazırlık sürecinden geçirilmiş olan spermelerde; hareketliliği ve morfolojisi yüksek kalitede olan spermeler seçilebilir ancak; DNA bütünlüğüne sahip olan spermelerin belirlenmesi için, TUNEL, SSCA, SCD gibi farklı teknikler kullanılmaktadır (Zhang et al, 2011; Larson KL. et al., 2000). Bunun nedeni DNA yapısının nitel gözlemlerle tespit edilememesidir. Sperm DNA'sı kompakt bir haldedir ve histon-protamin yapısı ile DNA'nın stabilizasyonu sağlanmaktadır. Bu sayede dış etkenler sonucu oluşacak tehlikelere karşı önleyici bir etki oluşturmaktadır. Eğer oluşacak bu hasar yüksek derecede gerçekleşirse; tekrar onarım sağlanamamakta ve sonucunda infertiliteye sebebiyet verebilecek sorunlar ortaya çıkmaktadır (Agarwal et al., 2014). DNA hasarlarının oluşmasında ortam sıcaklığının değeri önemli bir yer tutmaktadır. Spermilerin üretim yeri olan testis ortamında sıcaklığın vücut sıcaklığından 2-3 °C daha düşük olduğu çok iyi bilinen bir gerçektir. Bu durumun spermeler için üretimi, canlılığı ve hareketliliği anlamında önem arz ettiği söylenebilir. IVF merkezlerinde güncel olarak uygulanan pratik çalışmalarda hazırlık aşamasının spermeler açısından olumsuz sıcaklık değeri aralığında gerçekleştirildiği gözlenmiştir (Thijssen et al., 2014).

Thijssen ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu bir çalışmada spermlerin hazırlık süreci DGC (density-gradient centrifugation) ve Swim up yöntemleri ile oluşturulmuş ve oda sıcaklığı (RT) ile testis ortamı sıcaklığı kabul edilen 35 °C'de 24 saat süreyle spermlerin bekletilmesi sonucu hareketlilik, morfoloji, hücre canlılığı ve hücrelerin apoptoza uğramasındaki değişim oranı gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre hareketlilik, morfoloji ve hücre canlılığı 35 °C sıcaklık ortamında RT'de bekletilen örneklerden daha düşük çıkmıştır. Bunun yanı sıra apoptoz sonucunda ölüme giden hücre oranı ise daha yüksek bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında oda sıcaklığı ve 37 °C'de bekletilen sperm örneklerinin sonuçları incelendiğinde Thijssen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya benzer sonuçlar elde edilmiştir. Oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerin, 37 °C ortamına göre hem DGC hem de semen plazması içeriğinde daha yüksek bir hareketlilik ve canlı hücre yoğunluğu gözlenmiştir. Ayrıca ölüm yolağına katılan hücre oranında ise düşüklük tespit edilmiştir. Yani ortam sıcaklığının artış göstermesinin, belirli bir sıcaklık değerinden sonra spermler için olumsuz koşullar oluşturmasına neden olduğu yapılan çalışmalarca ispat edilmiştir. Spermler için özellikle 35 °C ve üzeri sıcaklık değerlerinin spermdeki canlılığın düşüşüne, DNA hasarının ortaya çıkmasına ve bilhassa infertilite ile karşılaşılacak olan durumların yaşanmasına sebebiyet verdiği anlaşılmıştır. Spermlerin semen plazması içerisinde bekletilmesinden, DGC yöntemi ile semeninden ayrıldıktan sonra bekleme sürecinin başlatılmasının faydalı olacağı yapılmış olan bu tez çalışmasındaki sonuçlara dayanarak söylenebilmektedir. Yine Schuffner ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış olduğu bir çalışmanın sonrasında, 37 °C'de inkübasyonu gerçekleştiren spermlerin hareketliliğinde anlamlı şekilde düşüş gözlendiği ve apoptozise uğrayan spermlerin insidansında artış olduğu yönünde tespitleri olmuştur (Schuffner et al., 2002).

Thijssen (2014), çalışması sonrasında düşük sıcaklıklarda bulunan spermlerin ortama adapte olduğu, dinlenme haline geçmiş olabileceği ve mevcut enerjisini muhafaza etme yoluna gittiği hipotezini öne sürmüştür. Bu hipotezden yola çıkarak, spermlerin yapısal olarak yumurtayı dölleyene kadarki sahip olduğu enerjisi ve zaman kaybına uğramadan hedefine hızlıca ilerlemek istemesi göz önüne alındığında; yükselen ortam sıcaklığı ile birlikte (örneğin vücut içerisindeki uterus ortamında) spermler belirli bir noktaya kadar hiperaktivasyon durumunu yaşamakta ve sonrasında

spermilerin aynı ortam şartlarına çok fazla maruz kalması sebebi ile öncelikle sperm hızının düşüşü, sonrasında DNA hasarının ortaya çıkması ve en son aşamada ise apoptoz veya nekroz ile hücre ölümünün tetiklenmesi gerçekleşiyor olabilir.

Yüksek sıcaklıkta tutulan spermelerde morfolojik açıdan bozukluklar ortaya çıkmaktadır. 37 °C'de iki saatten fazla süre ile bekletilmiş olan spermeler ile 21°C'de bekletilen spermeler karşılaştırıldığında; yüksek sıcaklıkta bekletilen spermeler üzerinde büyük nükleer vakuollerin ortaya çıkmasında artış gözlenmiştir (Thijssen et al., 2014; Peer, 2007). Bu durum birçok IVF merkezinde hatalı uygulamalar sonucunda negatif etki gösteren durumların yaşanmasına sebebiyet verebilmektedir. Genellikle sonraki gün işlem görmesi gereken bir hastanın spermi dondurulup çözülmekte (freezing/thawing) veya 37°C sıcaklığa sahip inkübatörlerde bekletilmektedir. Bu uygulamanın yanlış olduğunu Peer ve arkadaşları yapmış oldukları çalışma ile göstermişlerdir. Tez çalışmamızda spermeler 4 °C, RT ve 37°C'de 24 saat bekletilmiş ve bu değer aralıklarında spermelerde meydana gelen hareketlilik, canlı hücre sayısı ve DNA yapısındaki bozunmaların oranı karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir. Bunun yanında ortam sıvısının uygunluğu açısından DGC (gradient yöntemi) ve Seminal plazma sıvısı (SP) içerisinde bekletilen sperm örneklerdeki farklılıklar ortaya konulmuş ve DGC yöntemi ile yapılan çalışmalarda yaşanacak olan olumsuzlukların daha az olacağı anlatılmak istenmiştir.

Spermelere dondurma işleminin uygulanması genellikle uzun süreli saklamalar için yapılmaktadır. Ancak; dondurma/çözme işlemleri esnasında spermelerde çeşitli hasarlar oluşabilmektedir. Spermin hızında anlamlı derecede düşüş gözlenmekte ve spermin yaşam süresi kısalmaktadır. Hatta uygulanan bu işlemler nedeniyle fertilizasyon aşamasında çeşitli olumsuzluklar yaşanmaktadır. (Watson,1995). Ayrıca bu spermelerin saklanması ve bir yerden başka bir yere nakledilmesi için çeşitli ekipmanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Sıvı azotun sürekli kullanılacak olması ise işlem maliyetini artıran bir başka etkidir (Curry, 2000). Spermeler için kısa süreli saklamaların gerekli olduğu durumlarda dondurma protokolünün negatif etkilerinin azaltılması adına yapmış olduğumuz bu çalışma örnek teşkil etmektedir. Yapılan literatür taraması sonucunda seçmiş olduğumuz sıcaklık değerlerinden +4°C ile daha

nce insan spermleri üzerinde gerçekleştirilmiş olan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda, çalışmamızdan elde edilen verilerin yapılacak olan sonraki çalışmalara ışık tutmasını umuyoruz.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Semen henüz hiçbir işlemde geçirilmemişken sperm sayısı ilk semen analizi sonuçlarına göre ortalama 60 milyon/ml civarındadır. Semen örneği gradient solüsyonu ile ayıklama işlemine tabi tutulduğunda konsantrasyonu 40 milyon/ml civarına düşmektedir. Ancak bu sonuçlara tam tersi orantılı olacak şekilde sperm hareketliliğinde ise gradient işlemi sonrasında kesin bir artış gözlemlendi. Bu durum iki sebeple açıklanabilir. Ya içerisinde ölü hücreler barındıran saf semen örneğindeki bu hücreler ayıklanmıştır veya semen örneğinin içerisinde bulunan bazı partiküller, lökosit varlığı, viskozite gibi durumlardan kaynaklı sperm hareket yeteneği kısıtlanmaları ortadan kalkmıştır. Ayrıca her iki durum da aynı anda gerçekleşmiş olabilir.

Ölü hücre sayısındaki düşüşün sebebi; gradient işleminin farklı yoğunluk sıralamalarında oluşturulup bir nevi elek görevi üstlenmesi ve normal sperm ile morfolojisi, hareketliliği çok kötü olan spermleri birbirinden ayırmış olmasındandır. Eğer gradient ve yıkama işlemleri düzgün şekilde hazırlanıp uygulanmazsa ayırma tam olarak gerçekleşmez ve pellet kısmında ölü hücre ve kötü morfoloji varlığına rastlanabilir. Ölü hücrelerin gradient işlemi ile azalışı spermdeki hareketlilik oranını doğrudan etkilemekte ve artışını sağlamaktadır. Çünkü tüm hücreler sayılırken gradient işlemi sonrası ayrıştırılmış olan hücreler dışlanacaktır ve hareketlilik ilk sayım sonuçlarına göre daha yüksek çıkacaktır.

Spermlerin gradient solüsyonu ile muamelesi fiziksel bir işlemdir. Dolayısı ile DNA fragmentasyonunu doğrudan etkilemesi mümkün görünmemektedir. Ancak ölü hücre sayısındaki hesaplama yöntemlerinde olduğu gibi; kötü morfolojili spermler ayıklanırken DNA hasarı mevcut spermlerin de dansite gradient yöntemi ile başarılı şekilde ayrıştırıldığı, dolayısı ile oranında düşüş yaşandığı düşünülmektedir.

Tüm gruplar incelendiğinde sperm hareketliliğinin ortam sıcaklığına göre en az değişim gösterdiği aralık oda sıcaklığında saklanan sıvılarda gözlemlenmiştir. Her iki ortam sıvısında da RT'de saklanan örnekler en az hareketlilik kaybına uğramıştır. Ortam sıvıları kendi aralarında değerlendirildiğinde, gradient işleminden geçirilmiş olan spermlerdeki hareketlilik artışının anlamlı derecede farklılık oluşturduğu

gözlenmiştir ($p<0,05$). Artışın en fazla görüldüğü grup; hem oda sıcaklığında saklanmış hem de gradient işleminden geçirilmiş olan örnektir.

Yapılan bu çalışmada sıcaklık değer aralıkları ve kullanılan ortam sıvıları klinik merkezlerdeki birçok kişinin günlük kullanımında yer alan ve önem teşkil eden değerlerden seçilmiştir. Bu çalışmanın ışığında; yapılması planlanan başka araştırmalar olduğu zaman, sıcaklık değerlerinin 10-15-20-30 °C gibi aralıklar ile seçilmesi ve ortam sıvısına swim up yöntemi uygulanarak seçilmiş olan spermelerin de eklenmesini, ayrıca spermelerin bekletildiği süreye ek olarak 12-36-48-60-72 saatleri de eklenerek çalışmanın yapılmasının literatüre katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

Ayrıca klinik merkezlerde yapılan çalışmalarda sıcaklık değer aralıklarının optimizasyonu için bu çalışmanın yararlı olacağını düşünüyoruz.

7. KAYNAKÇA

Agarwal A. *et al.*, Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa, *Reproductive BioMedicine Online* (2014) 28, 436

Balhorn R., A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Bio.* 1982; 93: 298–305.

Barratt CL, Bjorndahl L, Menkveld R, Mortimer D (2011) ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Human reproduction* Oxford, England 26:3207–3212

Battistone M.A., Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases, *Mol Hum Reprod.* 2013 Sep; 19(9): 570–580. Published online 2013 Apr 29. doi: 10.1093/molehr/gat033

Belloc S., Benkhalifa, M.; Junca, A.M.; Dumont, M.; Bacrie, P.C.; Ménézo, Y. Paternal age and sperm DNA decay: Discrepancy between chromomycin and aniline blue staining. *Reprod. Biomed. Online* 2009, 19, 264–269.

Chandra A., *Journal of Advanced Pharmaceutical Tecnology and Research*, 2010 Sep, Pmid:22247873

Chemes H.E. and Sedo C.E., Tales of the Tail and Sperm Head Aches Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail, *Asian Journal of Andrology* (2012) 14–23

Chemes H.E., Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 405–28.

Cheng C.Y. and Mruk D.D., The biology of spermatogenesis: the past, present and future *Phil. Trans. R. Soc. B* (2010) 365, 1459–1463

Curry M. R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.* 5: 46–52.

Desai N., Goldberg J., Austin C., Sabanegh E., Falcone T., Cryopreservation of individually selected sperm: methodology and case report of a clinical pregnancy, *J Assist Reprod Genet*, 2012

Di Santo M. et al, Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART, *Adv Urol.* 2012; 2012: 854837 published online 2011 Dec 13. doi: 10.1155/2012/854837

Eliasson R., Semen Analysis, *Environmental Health Perspectives* Vol. 24, pp. 81-85, 1978

Esponda P., Spermiogenesis and spermatozoa in mammals, *Revis Biol Celular.* 1985; 6:1-99.

Franken D.R. and Oehninger S., Semen analysis and sperm function testing, *Asian J Androl.* 2012 Jan; 14(1): 6–13. Published online 2011 Dec 19. doi: 10.1038/aja.2011.58

Franken RD and Oehninger S, Semen analysis and sperm function testing, Asian Journal of Andrology 2012, AJA, SIMM & SJTU

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med. 2001;345:1388–93.

Güles Ö. ve Eren U., Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008 (2) 73-78 ISSN 1017-8422; e-ISSN: 1308-3651

Holstein A.F. *et al.* Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment Reproductive Biology and Endocrinology 2003, 1:107

Hsien-Ming W. et al., Lead level in seminal plasma may affect semen quality for men without occupational exposure to lead, Reprod Biol Endocrinol. 2012; 10: 91. PMID: 23137356

Ickowicz D. et al. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome

Ilacqua A. et al. The Physiology of the Testis, , Researchgate Chapter January 2017 doi: 10.1007/978-3-319

International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, et al. World collaborative report on assisted reproductive technology, 2002. Hum Reprod 2009;24:2310-20.

Kadioglu A. ve ark. WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi Beşinci baskı, ISBN: 978-975-00112-4-5

Karabulut S. et ve ark. Male infertility, azoospermia and cryptozoospermia incidence among three infertility clinics in Turkey, Turk J Urol 2018; 44(2): 109-13 doi: 10.5152

Kasten F.H., 1967. Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. *Internat. Rev. Cytol.* 21:141-202.

Lamb D.J., Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing, *Asian J Androl.* 2010 Jan; 12(1): 64–70.

Larson K.L., DeJonge C.J., Barnes A.M., Jost L.K., Evenson D.P., Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:1717-22.

Linck R.W. et al., The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility, *J Assist Reprod Genet.* 2016 Feb; 33(2): 141–156. published online 2016 Jan 29. doi: 10.1007/s10815-016-0652-1

Lingappa H.A., Quest for An Ideal, Simple and Cost-Effective Stain for Morphological Assessment of Sperms, *J Clin Diagn Res.* 2015 Oct; 9(10): EC01–EC04., PMID: 26557524

Magnúsdóttir E. And Surani M.A., How to make a primordial germ cell, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1987 June ; 66(6): 529–538.

Malvezzi H. et al, Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial, *Reprod Biol Endocrinol.* 2014; 12: 12 1. published online 2014 Dec 2. doi: 10.1186 -12-121

Menkveld R., Cas AG Holleboom, and Johann PT Rhemrev, Measurement and significance of sperm morphology, *Asian J Androl.* 2011 Jan; 13(1): 59–68. published online 2010 Nov 15. doi: 10.1038/aja.2010.67

Nijs M. and Ombelet W., Cryopreservation of human sperm, Genk Institute For Fertility Technology, 2001

O'Donnell L., Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed, 2014 Taylor & Francis Group, LLC

Oberoi B. et al, Study of human sperm motility post cryopreservation, Study of human sperm motility post cryopreservation, doi: 10. 1016/j.mjafi

Oguz Y. ve ark. The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid fragmentation in subfertile patients, *J Assist Reprod Genet.* 2018 Jun;35(6):1083-1089. doi: 10.1007/s10815-018-1163-z. Epub 2018 Mar 23.

Osman M.W. et al., A study of the effect of the FertilMate scrotum cooling patch on male fertility. SCOP trial (scrotal cooling patch) - study protocol for a randomised controlled trial, *Trials.* 2012; 13: 47., PMC 3404923 PMID: 22540417

Overbeeke R., Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. (1998): Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3:115.

Ozkavukcu S. ve ark., Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa, *J Assist Reprod Genet.* 2008 Aug; 25(8): 403–411. doi: 10. 1007/s10815

Part of the Methods in Molecular Biology book series, Methods for Sperm Concentration Determination, Spermatogenesis pp 3-12, August 2012

Peer S., Eltes, F., Berkovitz, A., Yehuda, R., Itsykson, P., Bartoov, B., 2007. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in-vitro incubation at 37 degrees C? *Fertil. Steril.* 88, 1589–1594.

Phillips B.T. and Gassei K. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis, *Phil. Trans. R. Soc. B* (2010) 365, 1663–1678 doi:10.1098 / rstb.2010.0026 reaction: role of protein kinases, *Asian Journal of Andrology* (2012) 14, 816–821

Rex S. and Aagaard J., DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review, *Nov.* 2016, doi: 10.1111/andr.1238

Rozati H., Thomas Handley, and Channa Jayasena, Process and Pitfalls of Sperm Cryopreservation, *J Clin Med.* 2017 Sep; 6(9): 89., doi: 10.3390/6090089

Schuffner, A., Morshedi, M., Vaamonde, D., Duran, E.H., Oehninger, S., 2002. Effect of different incubation conditions on phosphatidylserine externalization and motion parameters of purified fractions of highly motile human spermatozoa. *J. Androl.* 23, 194–201.

Sikka S.C. and Wayne J.G., Hellstrom, Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure, *Asian J Androl.* 2016 May-Jun; 18(3): 392–401., PMID: PMC4854088

Spector D.L., Goldman R D, Leinwand L A (1998): Culture and Biochemical Analysis of Cells (in) Cells: A Laboratory Manual. DL Spector (Editor), 15.1-15.24, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Stern R., The Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action, Chem Rev. 2006 Mar; 106(3): 818–839. doi: 10.1021 /cr 050

Tavalaee M., Razavi S., Nasr-Esfahani M.H.. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril 2009;91:1119-26.

Tesarik J., Greco E., Cohen-Bacrie P., Mendoza C. (1998): Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. Mol. Hum. Reprod., 4: 757.

Thijssen A. et al., Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa, Reproductive BioMedicine Online (2014) 28, 436– 442

Volpes A. et al. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures, J Assist Reprod Genet. 2016 Jun; 33(6): 765–770. published online 2016 Mar 16.

Watson P. F., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev. 7: 871–891.

Weinbauer G.F. *et al.* Physiology of Testicular Function, Researchgate Chapter · January 2010, 225960629

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5 th ed., 2010, ISBN: 978 92 4 154778 9

World Health Organization , (2010) , ‘WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction 5th Edition’ Cambridge, Cambridge University Press

Zhang X.D., Chen M.Y., Gao Y., Han W., Liu D.Y., Huang G.N., The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. *Hum Fertil (Camb)* 2011;14:187-91.

Zhou J. et al., The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation, *PLoS One*. 2015; 10(7): e0132974. published online 2015 Jul 14. doi: 10.1371

Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with health couples. *J Androl* 2000; 21: 145–53.

Zini A. and Libman J., Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction, 2006 Aug 29; 175(5): 495–500. doi: 10.1503/cmaj.060218

8. EKLER

EK 1

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Araştırma Projesinin Adı: FARKLI KOŞULLARDA MUHAFAZA EDİLEN SPERM ÖRNEKLERİNDE SICAKLIK ve SEMİNAL PLAZMANIN ROLÜ

Sizi **Hüseyin Aykut Özcan** tarafından yürütülen ‘Farklı koşullarda muhafaza edilen sperm örneklerinde sıcaklık ve seminal plazmanın rolü’ başlıklı bir araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz lütfen bize sorunuz. Bu anket çalışmasına katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama hakkına sahipsiniz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Tülay İREZ

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Farklı sperm hazırlama yöntemleri kullanılarak farklı sıcaklıklarda 24 saat süre ile muhafaza edilecek normospermik vakalarda; bu olgular sonucunda hangi sıcaklık ve saklama ortamının uygun olacağını belirlenmesidir. Çalışmaya siz dahil yaklaşık 25 kişinin daha katılması planlanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmamalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, vermiş olduğunuz sperm örneğinin analiziyle ilgili süreç rutin olarak devam edecek ve işlem sonucunuzu yine planlanan tarihte almış olabileceksiniz. Kısacası bu çalışmaya katılıp katılmamanız analiz sürecini pozitif ya da negatif herhangi bir şekilde etkilemeyecektir.

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?

Bu çalışmaya katılmanız halinde herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Araştırma sorumlusu, kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde yalnızca bu araştırmada olmak üzere tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Hüseyin Aykut ÖZCAN

GÖREVİ : Biyolog

TELEFON :05072841107

Biruni Üniversitesi'nde Biyolog Hüseyin Aykut ÖZCAN tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim*). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sorun ile karşılaştığımda; Bio. Hüseyin Aykut ÖZCAN'ı 05072841107 no.lu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:



EK 2.

ETİK KURUL ONAYI



SAYI: ATADEK-2019/6
KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr. Tülay İREZ, Doç. Dr. Meriç KARACAN, Bio. Hüseyin Aykut ÖZCAN,

Sorumluluğunu yürüttüğünüz **“FARKLI KOŞULLARDA MUHAFAZA EDİLEN SPERM ÖRNEKLERİNDE SICAKLIK ve SEMİNAL PLAZMANIN ROLÜ”** başlıklı proje 21.03.2019 tarih 2019/6 Sayılı Atadek Toplantısında görüşülmüş olup 2019-6/27 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.



Prof.Dr. İsmail Hakkı Ulus
ATADEK Başkanı

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU (ATADEK)

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın başlığı:

FARKLI KOŞULLARDA MUHAFAZA EDİLEN SPERM ÖRNEKLERİNDE SICAKLIK ve SEMİNAL PLAZMANIN ROLÜ

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın yürütücüsü (sorumlusu):

Prof. Dr. Tülay İREZ, Doç. Dr. Meriç KARACAN, Bio. Hüseyin Aykut ÖZCAN

Karar:

Kabul (Etik olarak uygun) (X) Revizyon ()* Etik olarak uygun değil ()**

Toplantı Tarihi:21.03.2019

Karar Numarası: 2019-06/27

Kurul Üyesi-Unvan Ad-Soyad	İmza	Karara	
		Katılıyorum	Katılmıyorum***
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus (Başkan)		(X)	()
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan Yrd)		(X)	()
Prof.Dr. Mert Ülgen		(X)	()
Prof.Dr. Ükke Karabacak		(X)	()
Prof.Dr. A.Elif Eroğlu Büyüköner		()	()
Prof.Dr. Berrin Karadağ		()	()
Doç.Dr. Günseli Bozdoğan		()	()
Dr. Öğr.Üyesi Fatih Artvinli		(X)	()

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

ADI	HÜSEYİN AYKUT
SOYADI	ÖZCAN
DOĞUM YERİ	BURDUR
DOĞUM TARİHİ	07.02.1990
UYRUĞU	TC
E-mail	aykut.zcn@hotmail.com
TELEFON	05072841107

Eğitim Düzeyi

	MEZUN OLDUĞU KURUMUNU ADI	BÖLÜM ADI	MEZUNİYET YILI
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik	2014
Lise	Yalova Fen Lisesi	Sayısal	2008

İş deneyimi

GÖREVİ	KURUM ADI	YILI
Biyolog	Acıbadem Maslak Hastanesi Tüp Bebek Merkezi	Mayıs 2016- Kasım 2018

Yabancı dil

YABANCI DİLLER	Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

FARKLI KOŞULLARDA MUHAFAZA EDİLEN SPERM ÖRNEKLERİNDE SICAKLIK ve SEMİNAL PLAZMANIN ROLÜ

ORIJİNALLIK RAPORU

%**2**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**1**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**0**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.aliburan.com

İnternet Kaynağı

%**1**

2

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

3

Vu Khue Nguyen, Nathalie Leclerc, Charles-Michel Wolff, Philippe Kennel et al. "Protection of immunoreactivity of dry immobilized proteins on microtitration plates in ELISA: application for detection of autoantibodies in Myasthenia gravis", Journal of Biotechnology, 1999

Yayın

<%**1**

4

manualzz.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

Submitted to American University in Cairo

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

