



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



ALİM GANİYEV

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİMDALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023

FARKLI SPERM VİTRİFİKASYON PROTOKOLLERİNDE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN SPERM KALİTESİNE ETKİSİ

ALİM GANİYEV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2023





**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**



**FARKLI SPERM VİTRİFİKASYON PROTOKOLLERİNDE
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN SPERM KALİTESİNE
ETKİSİ**

ALİM GANİYEV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN:

Prof.Dr. Berrin AVCI

Proje no:1189 – B.U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Farklı sperm vitrifikasyon protokollerinde trombosit zengin plazmanın sperm kalitesine etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Alim GANIYEV

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

23/06/2023

Adı Soyadı : Alim GANIYEV

Anabilim Dalı:Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu : Farklı Sperm Vitrifikasyon Protokollerinde Trombositten Zengin Plazmanın Sperm Kalitesine Etkisi

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Berrin AVCI

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYANI	II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	III
İÇİNDEKİLER	IV
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.Erkek Üreme Sistemi	5
2.1.1.Testis	5
2.1.1.1.Testis Anatomisi	6
2.1.1.2.Testis Embriyolojisi	7
2.1.1.3.Testis Histolojisi	7
2.1.1.3.1.SeminiferTübüller	9
2.1.1.3.1.1.Golgi fazı.....	12
2.1.1.3.1.2.Kep fazı	12
2.1.1.3.1.3.Akrozom fazı.....	13
2.1.1.3.1.4.Olgunlaşma Fazı	13
2.1.1.3.1.5.Sperm Hücresinin Yapısı	13
2.1.1.3.1.6.Kuyruk Yapısı	14
2.1.1.3.1.7.Sertoli Hücreleri	15
2.1.1.3.2.İnterstitiyel Alan	15
2.1.1.3.3.Kan-Testis Bariyeri	16
2.1.1.3.4.İntratestiküler Kanallar.....	16
2.1.2.Ekstratestiküler Kanallar	18
2.1.2.1.DuktuliEfferentes	18
2.1.2.2.DuktusEpididimis.....	18
2.1.2.3.Duktus Deferens.....	19
2.1.2.4.Duktus Ejakulatoryus	20
2.1.3.Yardımcı Genital Bezler	20
2.1.3.1.Vesikula Seminalis.....	20
2.1.3.2.Prostat.....	20
2.1.3.3.Bulboüretal Bezler	20
2.1.4.Penis	20
2.2.Semen.....	21
2.2.1.Rutin Semen Analizi	21
2.2.2.Makroskobik Değerlendirme	22
2.2.2.1. Likefaksiyon.....	22
2.2.2.2.Viskozite	23
2.2.2.3.Semen Volümü.....	23
2.2.2.4.Semen pH Değeri	23

2.2.3.Mikroskopik İnceleme	23
2.2.3.1.Sperm Sayısı	24
2.2.3.2.Sperm Motilitesi.....	24
2.2.3.3.Sperm Vitalitesi.....	24
2.2.3.4.Spermatozoanın Agregasyonu	25
2.2.3.5.Sperm Aglutinasyonu.....	26
2.2.3.6.Morfolojik Değerlendirme	26
2.3.Akrozomal Reaksiyon.....	27
2.4.Sperm Morfolojik Anomalileri	29
2.5.WHO Parametrelerine Göre Sperm Analizi Terminolojilerinin Tanımları	29
2.6.Sperm Hazırlama Teknikleri	30
2.6.1. Dansite-Gradient Yöntemi	30
2.6.2.Basit yıkama.....	31
2.6.3.Direkt Yüzdürme Tekniği (Swim-up).....	31
2.7. Kriyoprezervasyon	32
2.7.1.Kriyohasar	33
2.8.Plateletten Zengin Plazma (PRP).....	34
2.9.Çalışmanın Amacı	37
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1.Hasta Seçimi.....	38
3.2.Semen Örneklerinin Eldesi	38
3.3.Çalışma Grupları	38
3.4. PRP Solüsyonunun Hazırlanması ve Standardizasyonu	40
3.5. Dansite- Gradient Yıkama Yöntemi ile Sperm Hazırlığı	40
3.6.Dondurma- Çözme Protokolü	41
3.7. Viabilite Değerlendirmesi	42
3.8.Morfolojik Değerlendirme	43
3.9. Akrozom Reaksiyonu Testi.....	44
3.10. İstatistiksel Değerlendirme.....	47
4.BULGULAR.....	48
4.1.Dansite-Gradient Yöntemi İle Yıkama Sperm Viabilitesini ve Motilite Oranını Arttırdı.....	50
4.2. Taze Ejakulatın PRP ile İnkübasyonu Rutin Sperm Parametrelerini Değiştirme	50
4.3. Vitrifikasyon Sperm Viabilitesini Düşürdü	51
4.4. Kriyoprotektan İçeren Solüsyon Sperm Parametrelerini Korudu	52
4.5.Kriyoprotektan İçermeyen Solüsyonlarla Vitrifikasyonda PRP Rutin Sperm Parametrelerini Değiştirmede	52
4.6.Kriyoprotektan Solüsyonuyla Vitrifikasyonda PRP Rutin Sperm Parametrelerini Değiştirmede.....	53
4.7. Akrozom Reaksiyonu Analizi Sonuçları.....	54
4.8. Vitrifikasyon Protokolünün İndüklenmiş Akrozomal Reaksiyon Potansiyeline Etkisi	63
4.9. Farklı Kriyoprezervasyon Solüsyonlarının İndüklenmiş Akrozomal Reaksiyon Potansiyeline Etkisi.....	64
4.10. Sperm Vitrifikasyonunda PRP İnkübasyonunun Akrozomal Reaksiyon Potansiyeline Etkisi.....	64
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66

6.KAYNAKLAR	74
7.SİMGELER VE KISALTMALAR	82
8.EKLER.....	83
9.TEŞEKKÜR	88
10.ÖZGEÇMİŞ.....	89

TÜRKÇE ÖZET

Çalışmada üreme potansiyelini koruma yaklaşımları kapsamında uygulanan sperm kriyoprezervasyonunda, dondurma öncesi trombosit zengin plazma (PRP) içinde inkübasyonun çözme sonrasında sperm viabilitesi, hareket kabiliyeti ve fertilizasyon potansiyeline etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Normozoospermik erkeklerden alınan ejakulat örneklerinde taze ejakulat, PRP içinde inkübe edilmiş taze ejakulat, kriyoprotektan içermeyen ve kriyoprotektan içeren iki farklı solüsyonda vitrifikasyon uygulanan gruplar olmak üzere çalışma grupları oluşturuldu. Vitrifikasyon uygulanan gruplar iki alt grupta değerlendirildi. Bir grup dondurma öncesi otolog PRP solüsyonunda inkübe edilirken, diğer gruba PRP uygulanmadı. Çözme sonrası sperm viabilitesi, motilitesi ve morfolojisi, oositi fertilize etme potansiyelini değerlendirmek için akrozomal reaksiyon analizi yapıldı.

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde; taze ejakulatın PRP ile inkübasyonunun rutin sperm parametrelerini değiştirmediği, kriyoprotektan içeren ve içermeyen kriyoprezervasyon solüsyonlarının kullanıldığı vitrifikasyon protokolünde sperm viabilitesinin ve motilitesinin düştüğü görüldü. Kriyoprotektan içermeyen solüsyonlarla ve kriyoprotektan içeren solüsyonlarla vitrifikasyon uygulamasında dondurma öncesi PRP içinde inkübasyonun rutin sperm parametrelerini değiştirmediği, akrozomal reaksiyon analiz kriteri olan ARIC skorlarının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmadığı saptandı. Akrozomal reaksiyon analizinde kriyoprotektan içermeyen solüsyonlarla vitrifiye edilen örneklerde elde edilen yüksek ARIC skorlarının klinik etkinliğinin tartışmalı olduğu, sperm vitrifikasyonunda PRP'nin klinik uygulamadaki etkinliğini göstermek için yüksek örneklemle ve farklı konsantrasyonlarda PRP uygulamalarının karşılaştırmasının yapıldığı yeni kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: PRP, Sperm, Kriyoprezervasyon, Akrozomal Reaksiyon

İNGİLİZCE ÖZET

In this study, it was aimed to determine the effect of incubation in platelet-rich plasma (PRP) before freezing on sperm viability, motility and fertilization potential after thawing in sperm cryopreservation applied within the scope of reproductive potential preservation approaches.

Study groups were formed as fresh ejaculate in ejaculate samples taken from normozoospermic men, fresh ejaculate incubated in PRP, groups that did not contain cryoprotectant and that were vitrified in two different solutions containing cryoprotectant. The groups undergoing vitrification were evaluated in two subgroups. One group was incubated in autologous PRP solution before freezing, while PRP was not applied to the other group. After thawing, acrosomal reaction analysis was performed to assess sperm viability, motility and morphology, and potential to fertilize the oocyte.

When the results of the study were evaluated, it was observed that incubation of fresh ejaculate with PRP did not change routine sperm parameters, while sperm viability and motility decreased in vitrification protocol using cryopreservation solutions with or without cryoprotectants. It was found that incubation in PRP before freezing did not change the routine sperm parameters in vitrification application with cryoprotectant-free solutions and with cryoprotectant-containing solutions, and ARIC scores, which are acrosomal reaction analysis criteria, were not significantly different between the groups.

It was concluded that the clinical efficacy of high ARIC scores obtained in vitrified samples with solutions without cryoprotectant in the acrosomal reaction analysis is controversial, and that further comprehensive studies are needed to show the effectiveness of PRP in sperm vitrification in clinical practice, comparing PRP applications with high samples and different concentrations.

Key words: PRP, Sperm, Cryopreservation, Acrosomal Reaction

1.GİRİŞ

Kriyopreservasyon, hücrelerin tuz ve düşük moleküler ağırlıklı solüsyonlar içinde, sıfırın altındaki çok düşük sıcaklıklara (-196°C) kadar dondurulup uzun süre saklandığı, ardından da normal fonksiyonlarını geri kazanmaları için çözündürülüp kullanıldığı bir prosedürdür. Üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında virtual azospermi, obstrüktif ve non-obstrüktif azospermi olgularında, sitotoksik kemoterapi, radyoterapi ve/veya cerrahi girişimler uygulanacak onkolojik hastalarda ejakulat, testiküler sperm ve testis dokusu kriyoprezervasyonu uygulanmaktadır. Sperm kriyoprezervasyonu uygulamalarının tarihine baktığımızda, Polge ve arkadaşları 1949 yılında kriyoprotektan olarak gliserol kullanımıyla spermatozoayı ilk kez donduran araştırmacılar olarak tarihe geçmiştir (Polge ve ark 1949).

Günümüzde üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde en yaygın uygulanan kriyoprezervasyon protokolü hızlı dondurma yöntemidir (vitrifikasyon). Vitrifikasyongeleneksel kriyoprezervasyonun (yavaş dondurma) ana engeli olan intrasitoplazmik buz kristallerinin oluşumu olmaksızın cama benzer şekilsiz bir katı içinde bir sıvının katılaşmasıdır (Johari ve ark., 1976; Agarwal ve ark., 2017). Pahalı bir ekipmana ihtiyaç gerektirmeyen, hızlı ve pratik bir yöntemdir. Laboratuvar çalışmasının pratik tecrübesi vitrifikasyon protokolünün başarısını belirleyen önemli bir faktördür. Vitrifikasyon protokolünün en önemli dezavantajı yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan içeren solüsyonlar kullanılmasıdır, fakat hücre-dokunun kriyoprotektana maruziyet süresi çok kısa tutulmaktadır.

İnsan spermatozoalarının dondurularak saklanması üreme tıbbında önemli bir role sahiptir, erkeğin üreme potansiyelinin uzun süre boyunca korunmasına izin verir. Bu amaçla onkolojik nedenlerle tedavi görecekt hastalarda, genetik, inflamatuvar hastalıklar veya üreme tıbbı teknikleri nedeniyle fertilitite koruma amaçlı kullanılmaktadır. Bununla birlikte, donma-çözme süreci, azalmış mitokondriyal membran potansiyeli ve bozulmuş genom stabilitesi ile kendini gösteren bazı yapısal ve işlevsel sperm hasarlarına neden olur (Gomez-Torres ve ark., 2017). Hücre hasarı kriyoprotektan amaçlı kullanılan solüsyonun içeriği ve volümü ile, hücrenin solüsyona maruziyeti ile direkt ilişkilidir. Kriyoprotektan içeren solüsyonlarla

kriyoprezervasyon intrasellüler ve ekstrasellüler buz gelişimi sonucunda fiziksel hasara, osmotik stres nedeniyle kimyasal hasara neden olmaktadır (Ozkavukcu ve ark 2008). Geleneksel kriyoprezervasyon ile karşılaştırıldığında, vitrifikasyon insan oositi ve embriyosunda başarılı olmakla birlikte, spermatozoanın küçük boyutlu hücre olması ve yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektana maruziyetinin neden olduğu olumsuz etkiler nedeniyle başarı oranı daha düşüktür. Bu nedenle spermin geleneksel kriyoprezervasyonunda ve vitrifikasyonunda seminal sıvı, kriyoprotektan içermeyen solüsyonlar ve artificial solüsyonlar kullanılarak dondurup-çözme sonrası etkinliğini değerlendiren çok sayıda çalışma mevcuttur (Isachenko ve ark., 2004; Isachenko ve ark., 2012; Agha-Rahimi ve ark., 2016; Aizpurua ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda farklı semen parametrelerine sahip hastalarda, küçük ve yüksek volümde semen örneklerinin çözme sonrası viabilite, motilite, morfoloji, hücre membran bütünlüğü, mitokondrial membran potansiyeli, DNA fragmentasyon indeksi, sperm kapasitasyonu ve akrozomal reaksiyon analizleri geleneksel yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Seminal plazmasından ayrılan spermin süktroz, trehaloz ve dekstran gibi sakkaridlerle albümin karışımından oluşan süspansiyonlarda (non-permeable kriyoprotektanlar) kriyoprezervasyonu gerçekleştirildiğinde yüksek motilite oranı elde edilmekte ve sitoskeleton yapısı korunmaktadır (Schultz ve ark., 2020). Sperm dondurup-çözme uygulamalarında etkin yöntemin bulunmasına yönelik arayışlar hala güncelliğini korumaktadır.

Son yıllarda tıbbın birçok alanında olduğu gibi infertilite tedavisinde de ek tedavi (add-on) uygulamaları kapsamında trombositler zengin plazma uygulamalarına dair deneysel ve klinik çalışmalar mevcuttur. Trombositler (plateletler) pıhtılaşmadan sorumlu küçük, çekirdek içermeyen hücrelerdir. Trombositler alfa, yoğun ve lizozomal granüller olarak tanımlanan organellere sahiptir. Alfa granüller zimojen formda büyüme faktörlerini, yoğun granüller serotonin, ADP, ATP, GDP, GTP, histamin, kalsiyum, magnezyum gibi molekülleri içerir. Granül içerikleri trombositlerin aktivasyonu ile salınır. Bu aktivasyon trombin, kollajen, ADP, tromboksanlar, serotonin ve daha birçok agonist tarafından gerçekleşir (Lopez-Vilchez ve ark., 2009; Li ve ark., 2011; Shen ve ark., 2017). *Platelet Rich plasma* (PRP) flebotomi (venden kan alma işlemi) yoluyla sitrat veya EDTA bazlı bir antikoagülan içeren tüpe alınan kandan izole edilir. Santrifüj sonrası

kırmızı kan hücreleri ile bağışıklık hücrelerinin uzaklaştırılması sonucunda plazma içinde yüksek konsantrasyonda trombosit elde edilir. Trombosit içeriğine aktivatör (trombin, kalsiyum, ADP, kollajen) ilavesi ile PRP elde edilir. Ayrıca trombosit sayısını standardize eden ticari PRP kitleri de mevcuttur. PRP rejeneratif tıpta geniş kullanım alanına sahiptir. Kas-iskelet sistemi uygulamaları (Scully ve ark., 2019) oral-maksillofasiyal uygulamaları (Xu ve ark., 2020) ve osteoartrit (Evans ve ark., 2020) üzerinde PRP'nin pozitif etkisi raporlanmıştır.

Literatürde erkek üreme sisteminde hücre-doku ve organ düzeyinde yapılan deneysel çalışmalarda PRP'nin toksisite modellerindeki iyileştirici etkisini değerlendiren ve kriyoprezervasyon öncesi PRP uygulamasına dair az sayıda çalışma mevcuttur (Dehghani ve ark., 2019; Sayed ve ark., 2021; Alcay ve ark., 2021). Busulfanla oluşturulmuş sıçan toksisite modelinde intratestiküler PRP uygulamasının etkinliğini değerlendiren bir çalışmada, sperm parametrelerinde, testis volümünde, seminifer tübüllerde Sertoli ve Leydig hücrelerinin, spermatogenik hücrelerin sayısında artış raporlanmıştır (Dehghani ve ark., 2019). Yapılan bir diğer çalışmada kemoterapotik ajan olan metotreksat vererek oluşturdukları sıçan testis toksisite modelinde selenyum ve PRP'nin proapoptotik/anti-apoptotik ve hücrel rejenerasyon aktivitelerini karşılaştırmışlar. PRP'nin metotreksat toksisitesini azalttığı, bu etkinin besin taksiyesi olarak verilen selenyumdan daha yüksek olduğu, PRP'nin iyileştirici etkisini rejeneratif genleri, antiapoptotik belirteci (Bcl-2) ve antioksidan belirteci (eNos) güçlendirerek yaptığını raporlamışlar (Sayed ve ark., 2021). İnsan sperm hücresi üzerine yapılan çalışmalarda taze (fresh) hücrelerin PRP içinde inkübasyonunun sperm motilitesini, viabilitesini artırdığı, DNA fragmentasyonunu ve vakuolizasyonu azalttığı, özellikle H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif stres ortamında PRP'nin bu parametrelerdeki iyileştirici etkisinin daha da belirgin olduğu bildirilmiştir (Bader ve ark., 2020). Yapılan çalışmalarda farklı PRP konsantrasyonları çalışılmış vefarklı sperm parametrelerine etkisi karşılaştırılmıştır. Sperm kriyoprezervasyonunda PRP içinde inkübasyonun dondurma-çözme sonrası sperm kalitesine etkisi değerlendiren az sayıda çalışma mevcuttur (Alcay ve ark., 2021). Yapılan çalışmalar kriyoprotektaniçeren solüsyonlar içerisinde yavaş dondurma veya vitrifikasyon uygulanacak olan numunelere farklı PRP konsantrasyonları içinde inkübasyon uygulamasının karşılaştırmalı olarak çözme

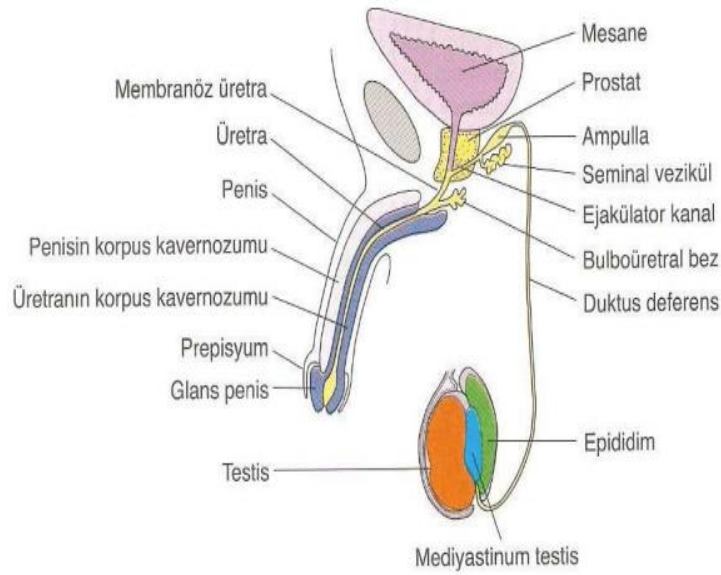
sonrası sperm parametrelerine etkisine yönelik çalışmalardır. Alcaay ve arkadaşları (2021) sığır sperminin yavaş dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyonunda kriyoprotektan içeren solüsyon kullanmışlar. Dondurma öncesi 0.5×10^7 , 1×10^7 ve 2×10^7 /ml konsantrasyonda trombosit içeren PRP içerisinde inkübasyonun sperm motilitesi, membran bütünlüğü, akrozomal bütünlük, mitokondriyal zar potansiyeli, DNA bütünlüğü ve malondialdehit konsantrasyonlarına etkisini değerlendirmişler. Çalışmalarının sonucunda 2×10^7 /ml hücre içeren PRP'nin daha etkin olduğunu raporlamışlardır. Literatürde insan sperminin vitrifikasyonunda PRP'nin iyileştirici etkisini değerlendiren tek çalışmada Yan ve arkadaşları (2021) otolog PRP uygulamasının donmuş-çözülmüş insan sperminin kalitesi üzerindeki etkisini tanımlamayı amaçlamışlar. Farklı konsantrasyonlarda PRP'nin sperm motilitesi, viabilitesi, membran bütünlüğü, DNA fragmentasyon indeksi, serbest oksijen radikalleri seviyesi ve mitokondriyal membran potansiyeline etkisini karşılaştırdıklarında %5 konsantrasyonda PRP'nin motilite, viabilite ve membran bütünlüğünü arttırdığını bildirmişlerdir. Sperm fertilizasyon kapasitesine yönelik değerlendirme yapılmamıştır. Yapılan çalışmalarda kriyoprotektan içeren solüsyonlarla dondurma-çözme protokollerinde PRP'nin etkinliği değerlendirilmiştir. Otolog PRP uygulamasında hasta faktörlü değişkenlerin dikkate alınarak, standart trombosit sayısı ile eşit sperm konsantrasyonunun karşılaştırması protokolün etkinliği açısından daha belirleyici veriler sunacaktır.

Tüm bu veriler doğrultusunda, bu çalışmada kriyoprotektan içeren ve içermeyen solüsyonlarda sperm vitrifikasyon protokolünde, dondurma aşamasından önce hücrelerin eşit konsantrasyonlarda PRP içinde inkübasyonunun rutin insan sperm parametrelerine (motilite, viabilite, morfoloji) ve oositi fertilize etme potansiyeline etkisi belirlenecek ve protokollerin karşılaştırmalı analizi değerlendirilecektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi dış ve iç genital organlar olmak üzere ikiye ayrılır(Şekil 1). İç genital organlar testis, intratestiküler boşaltıcı kanallar olan tubulirekti ve rete testis, ekstratestiküler boşaltıcı duktuslar olan duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens ve duktus ejakulatoryus, yardımcı genital bezler olan prostat, seminal kesecikler ve bulboüretral bezlerden oluşur. Dış genital organlar ise, penis ve skrotumdan oluşmaktadır(Abraham, 2002; Ross, 2003).



Şekil 1. Erkek üreme sistemi bileşenleri
(Junqueira & Carneiro 2009)

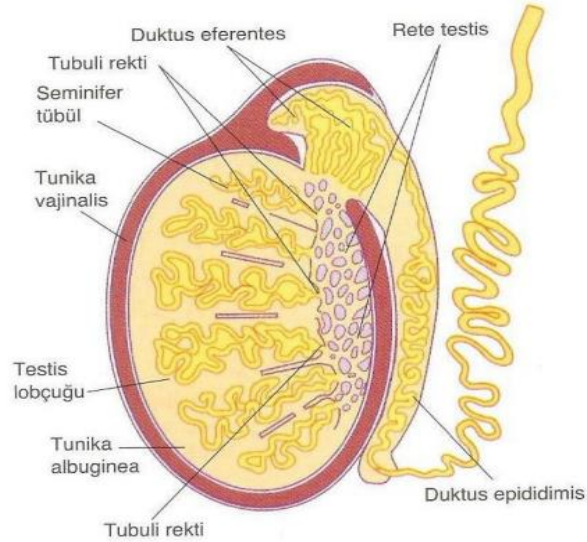
2.1.1.Testis

Yetişkin ve sağlıklı bireylerde, testis abdomen dışında skrotal kese içerisinde yerleşmiş bir çift oval şekilli organdır. Skrotum testis sıcaklığını düzenleyerek spermatogenez için gerekli olan ortam sıcaklığını sağlar. Testisler yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığında oval şekilli organlardır (Abraham, 2002).

2.1.1.1. Testis Anatomisi

Skrotum içinde yerleşen testisler, dıştan içe doğru üç tabakalı kalın bir kapsül ile çevrilidir. En dış tabaka olan **Tunika vajinalis** iki katlı periton yapısına sahiptir. Bu tabaka testisin abdomenden skrotuma inerken birlikte sürüklediği tabakadır. Tunika vajinalis mezotel ile döşeli olup, testisin anterolateral yüzeyinde bulunur. Kapsülün en belirgin ve kalın tabakası olan **Tunika albuginea** yoğun bir fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Testisin arka yüzeyinde kalınlaşan tunika albuginea **mediyastinum testis**'i oluşturur. Testis içerisine giren ve çıkan lenf damarları, genital kanallar ve kan damarları bu tabaka içerisinde seyreder.

Kapsülün en iç tabakası olan **Tunika vasküloza** damardan zengin gevşek bağ dokusu özelliğinde tunika albuginea uzantısı olan bir tabakadır. Mediyastinum testisten testis parankimasi içine doğru uzanan ince bağ dokusu uzantıları testiküler lobülleri oluşturur. Herbir testis içerisinde yaklaşık 250 adete yakın lobülvardır. Testis lobülleri, arasındaki boşlukları gevşek bağ dokusunun çevrelediği seminifer tübüllerden oluşur. Seminifer tübüller kapsülün hemen altında kör bir uç olarak başlar, mediyastinum testise doğru uzanan bol kıvrımlı tübüllerdir. Her lobülde 1-4 adet seminifer tübül bulunur (Junqueirave ark., 1998;Kuruş, 2020;Setchell, 1988) (Şekil 2).



Şekil 2. Testis'in yapısı
(Kierszenbaum ve Tres 2016; Junqueira & Carneiro 2009)

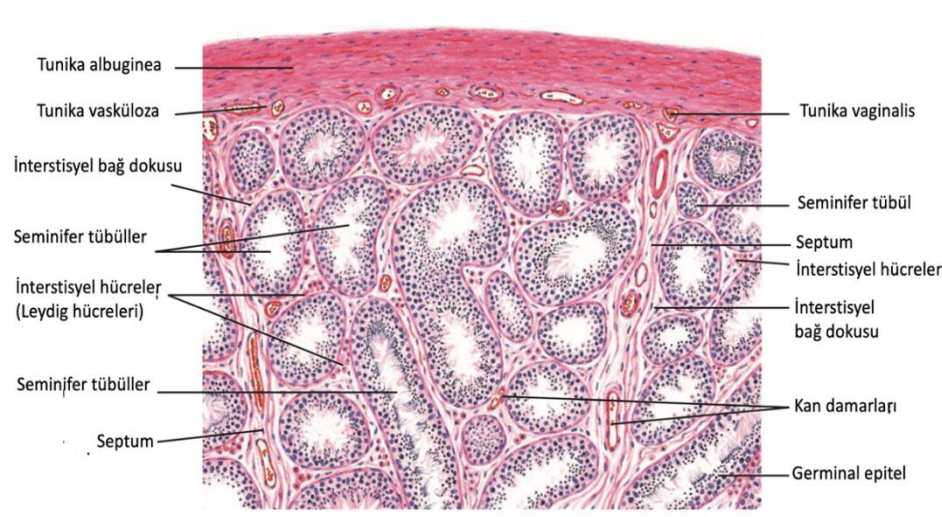
2.1.1.2.Testis Embriyolojisi

Embriyoner gelişimin 3. haftasında vitellus kesesinin endodermine komşu ekstraembriyonik mezodermde, germ hücrelerinin kökenini oluşturan primordiyal germ hücreleri görülür. Gelişimin 4.haftasında ürogenital kabartı oluşmaya başlar. Ürogenital kabartı, ürogenital sistemin gelişeceği embriyoner yapıdır. Üriner sistemin geliştiği bölüm nefrogenik kordon adını alır. Ekstraembriyonik olarak oluşan primordiyal germ hücrelerinin gelişimin 5. haftasında embriyon diskinde gonadal kabartıya göçü ile birlikte gonadların gelişimi uyarılır. Gelişimin 7.haftasından önce hem erkek hem dişi gonadlar benzer yapıdadır ve bu dönem farklılaşmamış gonad olarak adlandırılır. Gelişimin 7. haftadan sonra, embriyonun cinsiyetine göre, gonadlar erkek ya da dişi gonadları olan testis ve ovaryum özelliklerini gösterir. Y kromozomunun SRY geninin bir ürünü olan testis-belirleyici faktör farklılaşmamış gonadların medullası üzerinde etkiye sahiptir. Testis-belirleyici faktör geni (SRY) Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunmaktadır. Gelişmekte olan gonadda primitif cinsiyet kordonları bu genin etkisiyle gelişir. Puberteye kadar testis kordonlarının lümeni kapalıdır, pubertede tübüller lümen kazanarak seminifer tübülleri oluştururlar. Testis kordonları arasındaki bağ dokusu alanlarda bulunan mezenkimal hücreler Leydig hücrelerini oluşturur. Leydig hücreleri tarafından gelişimin 8. haftasında testesteron salınımı başlar. Testis kordonları puberteye kadar sadece destek hücreler olan Sertoli hücrelerini ve primordiyal germ hücrelerini içerirler (Kuruş, 2020; Ikeda ve ark.,1996; Şeftalioğlu, 1998).Sertoli hücreleri anti-mullerian hormonu (AMH) sentezler (Lee ve ark.,1993).

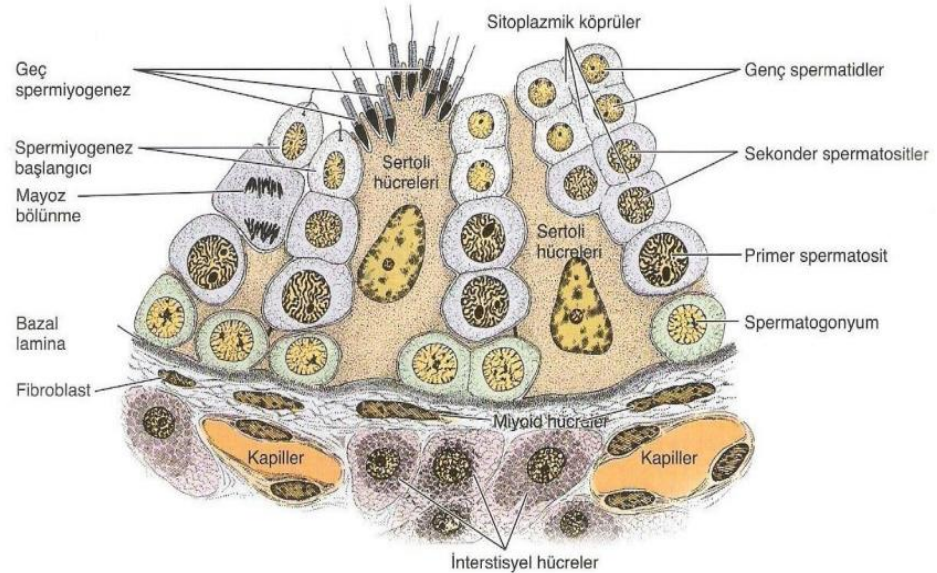
2.1.1.3.Testis Histolojisi

Testis kalın bir bağ dokusu yapısında tunika albuginea ile çevrilidir (Şekil 3). Testisin arka yüzünde kalınlaşan tunika albuginea, mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testisten içeri giren ince bir bağ dokusu yapısındaki fibröz uzantılar, organın parankimasını testiküler lobüller olarak adlandırılan yaklaşık 250 adet piramidal bölmelere ayırır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile çevrili 1-4 seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüllerin epitelini spermatojenik seri hücreler ve Sertoli

hücreleri oluşturur. Puberte öncesi primordiyal germ hücreleri spermatogonyumlara dönüşür. Mitoz aktivite ile sürekli çoğalan kök hücreler puberte ile birlikte primer spermatositlere dönüşerek mayoz bölünme sürecine geçer. Spermatogenik seri hücreleri seminifer tübülün epitelini oluşturur, hücreler bölünür, olgunlaşır ve sperme dönüşerek tübül lümenine atılır (Junqueira ve ark., 1998;Kuruş, 2020;Setchell, 1988) (Şekil 4).



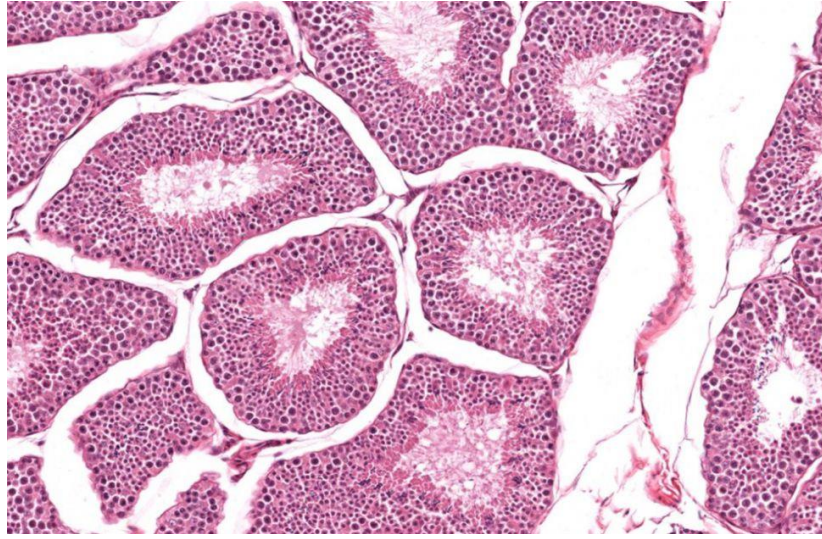
Şekil 3. Testis
(Fiore Atlas of Histology, 2008)



Şekil4.Seminifertübülepiteli
(Junqueira & Carneiro 2009)

2.1.1.3.1.SeminiferTübüller

Seminifer tübüller spermatozoonların üretildiği yapılardır. Testiste 250-1000 seminifertübül bulunmaktadır. Tübüller yaklaşık 150-250 µm çapındadır vetek bir testisteki tübülün toplam uzunluğu 250 metreyi bulmaktadır. Seminifer tübül lümeni modifiye çok katlı kübik epitelle çevrilidir. Tübüller kıvrımlı yapıya sahip ve başlangıcı kapsül altından başlayan kör uç şeklindedir. Seminifer epitelde spermatogenik seri hücreleri ve Sertoli hücreleri bulunur (Kuruş, 2020) (Şekil 4 ve Şekil 5).



Şekil 5. Seminifertübül enine kesitleri H&E Boyaması (x4)
(Robert L. Sorenson, Minnesota Minneapolis Üniversitesi, MN)

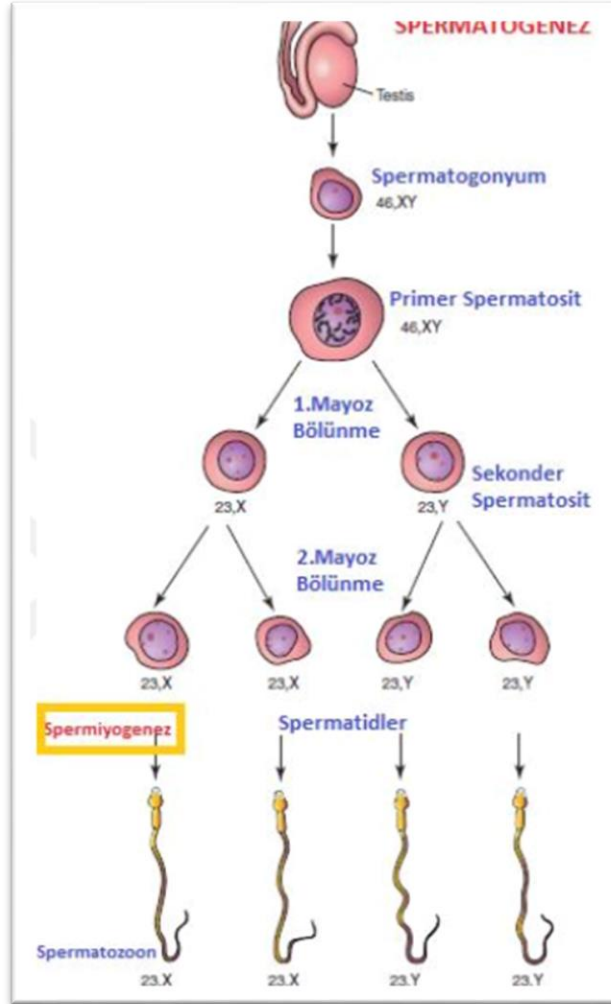
Spermatogenez süreci üç fazda gerçekleşmektedir. **Spermatogonyal faz (Spermatositogenez)**; spermatogonyumların mitoz bölünme ile sayılarının çoğaldığı evredir. Spermatogonyumlar Tip A ve Tip B spermatogonyum olarak iki gruptan oluşur. Tip A spermatogonyumlar kök hücre karakterindedir. Sürekli mitoz bölünme ile çoğalırlar. Bir grubu Tip A spermatogonyum olarak kök hücre karakterinde kalır. Bir grubu ise Tip B spermatogonyumlara dönüşür. Spermatogenik serinin diğer hücrelerine dönüşme potansiyelinde olan hücreler Tip B spermatogonyumlardır. Puberte öncesinde Tip B spermatogonyumlar primer spermatositlere dönüşür. **Spermatosit fazı**, primer spermatositlerin iki mayoz bölünme geçirerek spermatid aşamasına ulaştığı evredir. **Spermiyogenez fazı**, mayoz bölünmenin

tamamlanmasının ardından spermatidler inmorfolojik olarak farklılaşarak olgun spermli oluşturduğu evredir (Kuruş, 2020).

Spermatogenez, testisin iki ana hücre tipiyle kaplı seminifer tübüllerin epitelinde gerçekleşir. Bu hücre tipleri Sertoli hücreleri ve germ hücreleridir. Sertoli hücreleri, gelişen germ hücreleri için destek ve beslenme sağlarken, germ hücreleri spermatositlere ve sonunda olgun spermatozoaya farklılaşır. Spermatogenez süreci, folikül uyarıcı hormon (FSH), lüteinizan hormon (LH) ve testosteron hormonlarının karmaşık etkileşimi ile düzenlenir. FSH spermatogonyumların mitoz bölünme ile çoğalmasını uyarırken, LH testisin interstisyel bağ dokusu alanlarında yerleşim gösteren Leydig hücreleri tarafından testosteron üretimini uyarır. Testosteron, sperm hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması için gereklidir. Spermatogenez, seminifer tübüllerin bazal laminasının yakınında bulunan diploid karakterde hücreler olan spermatogonyumların mitoz bölünmesiyle başlar. Bu hücreler mitozla bölünerek ökromatik çekirdeğe sahip spermatogonyum tip A hücrelerini oluştururlar. Tip A spermatogonyum hücreleri koyu ve açık olmak üzere iki çeşittir. Koyu tip A spermatogonyumlar kök hücre olarak kalırken, açık tip A spermatogonyumlar mitoz bölünmeye devam ederek tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar tübülün lümenine doğru hareket eder ve mitoz bölünme geçirerek primer spermatositlere farklılaşır. Tip B spermatogonyumlar yuvarlak çekirdeğe sahiptir. Her iki tip spermatogonyumun hücrelerinin sitoplazmalarıda ışık mikroskopik değerlendirmede soluk boyanırlar.

Primer spermatositler, sekonder spermatositleri oluşturmak için mayoz I hücre bölünmesi, daha sonra haploid spermatidleri üretmek için mayoz II hücre bölünmesini geçirirler. Primer spermatositin I. mayozu tamamlamasıyla oluşan 2 adet sekonder spermatosit, bölünme öncesi DNA replikasyonu gerçekleştiği için, haploid sayıda kromozoma, fakat $2n$ DNA'ya sahip hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin II. Mayozu geçirmesiyle 4 adet spermatid oluşur. II. mayoz bölünmede DNA replikasyonu gerçekleşmediği için oluşan hücreler n sayıda DNA'ya sahip olur. Dolayısıyla II. mayoz sonrası oluşan yuvarlak yapıda spermatid hücreleri haploid sayıda kromozoma ve n sayıda DNA'ya sahiptir. Spermatidler 22 otozom kromozoma ve bir adet cinsiyet kromozomuna (X ya da Y) sahiptirler. Spermatidler daha sonra spermiyogenez olarak bilinen bir morfolojik değişim-

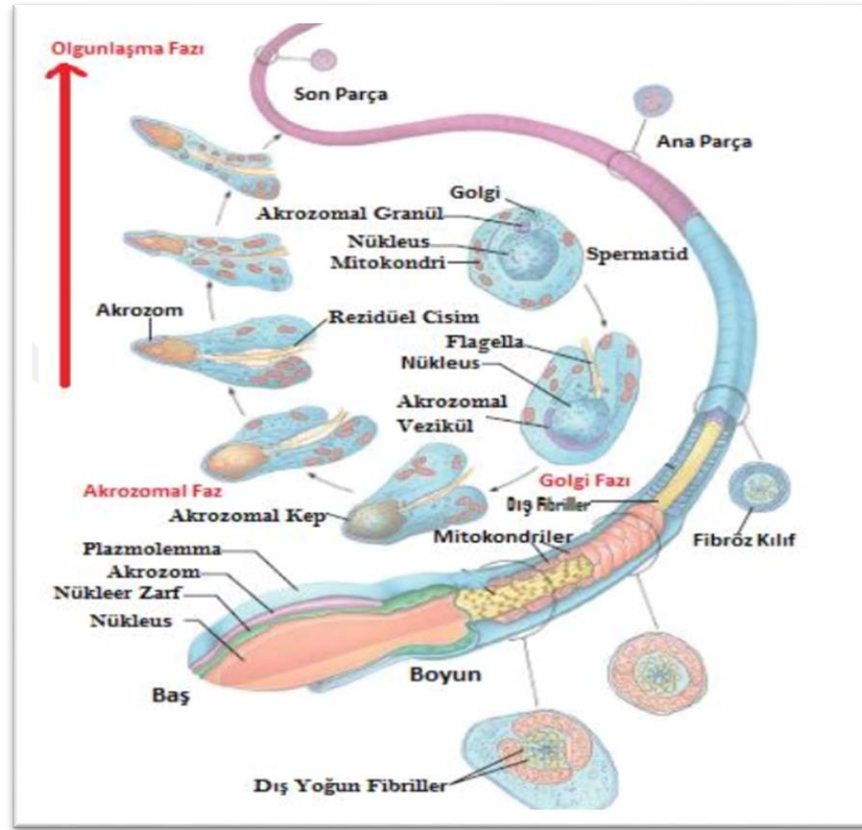
olgunlaşma sürecinden geçerler ve bu süreçte olgun spermatozoaya farklılaşırlar (Şekil 6)(Gartner,2016; Ikeda ve ark.,1996; Kuruş, 2020,Moore, 2016).



Şekil 6. Spermatogenez
(Moore ve ark., 2016)

Spermiyogenez sırasında spermatidler, olgun bir sperm hücresinin oluşumuyla sonuçlanan bir dizi yapısal değişikliğe uğrarlar. Bu süreç 4 evrede tamamlanır (Ross, 2003).

- 1- Golgi fazı
- 2- Kep fazı
- 3- Akrozom fazı
- 4- Olgunlaşma fazı



Şekil 7. Spermiyogenez
(Gartner ve Hiatt 2014)

2.1.1.3.1.1. Golgi fazı

Bu fazda spermatid içerisinde karakteristik olarak çok sayıda Golgi kolompleksinin birikmesiyle oluşan periyodik asit-Schiff (PAS +) granüllerin varlığı saptanmıştır. Bu proakrozomal granüller glikoprotein içeriği yönünden zengindir. Proakrozomal granüller nükleus membranının yakınındaki membranla sınırlandırılmış bir akrozomal vezikül ile birleşerek akrozomal granülü meydana getirirler. Spermiyumun baş kutbunu akrozomal vezikülün bulunduğu bölge belirler. Sentriyoller bu dönemde arka kutba doğru göç eder. Mikrotübüllerden başlayarak yapılanmaya başlayan sentriyoller, sperm kuyruk aksonemini oluşturur (Şekil 7)(Eşrefoğlu, 2016; Muciaccia, 2013).

2.1.1.3.1.2. Kep fazı

Bu dönemde nükleusun ön bölümünü kaplayacak şekilde genişleyen akrozomal vezikül şapka gibi bu bölümü kuşatır. Akrozom başlığı iç ve dış zarları oluşturur. Çekirdek kromatininin yoğunlaşması, akrozoma yakın olan çekirdek

zarının porlarını kaybederek kalınlaşmasının sonrasında gözlenmektedir (Şekil 7) (Demir, 2006).

2.1.1.3.1.3.Akrozom fazı

Bu dönem spermatidlerin çekirdek, sitoplazma ve kuyruğunda belirgin şekilde değişikliklerin olduğu dönemdir. Spermatidler Sertoli hücre sitoplazmalarının içine doğru gömülerek bazal lamina yönünde ilerlemeye başlar. Akrozom, lizozomun özelleşmiş bir benzeri durumundadır. Akrozom hyaluronidaz, akrozin, asit fosfataz, nöraminidaz, arilsülfataz gibi çeşitli hidrolitik enzimler içerir. Yoğunlaşmış nükleus yassılaşıp uzayarak, hücre membranına doğru ilerleyerek, koyu renkli ve armut şeklinde bir görünüm almıştır. Bu fazda flagellum gelişerek seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Flagellumun gelişimini başlatan sentriyoller, nükleusun arka yüzeyine taşınırlar. Sonrasında bu sentriyoller modifiye olarak gelişmekte olan spermin boyun bölgesini oluştururlar (Şekil 7)(Gartner, 2016; Eşrefoğlu, 2016; Karagöz, 2002).

2.1.1.3.1.4.Olgunlaşma Fazı

Morfolojik değişimin son fazında flagellanın etrafındaki fazla sitoplazma Sertoli hücrelerindeki lizozomlar aracılığıyla fagosit edilir ve spermatozoon oluşur. Bu aşamada spermatidler birbirine bağlı değildir ve Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine bırakılırlar (Ross ve ark., 2003).

Çekirdek yoğunlaşması sırasında DNA'daki histonların yerini lizinaminoasitinden zengin protaminler ve arjininler alır. Nükleozomların kaybolmasıyla birlikte bu fazda çekirdek materyalinin yoğunlaşmasında etkili düz kromatin liflerin yan yana dizildiği gözlemlenir (Şekil 7)(Gartner, 2016; Demir, 2006).

2.1.1.3.1.5.Sperm Hücresinin Yapısı

İnsan sperm hücresi yaklaşık 60 µm uzunluğunda olup baş ve kuyruktan oluşmaktadır.

Baş yapısı: Sperm başı yaklaşık 4,5 µm uzunlukta, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığında yassı ve elonge bir yapıya sahiptir. Genetik materyali taşıyan nükleusu ve nükleusun posteriyör kısmını saran akrozomal kep yapısı bulunur. Baş

hacminin %40-70'ini akrozomal kep oluşturur. Akrozomalkep'in sınırları belirgindir. İçerisinde; hyaluronidaz ve akrozin enzimleri yanında asit fosfataz, β -galaktozidazaril sülfataz, nöraminidaz, kollajenaz ve fosfolipaz C benzeri pek çok enzim bulunur. Akrozomal enzimlerin görevi sindirici özellikleri ile fertilizasyon sürecinde spermin kumulus ve korona radiata hücrelerini ve zona pellusidayı geçmesini sağlamaktır. Akrozom reaksiyonunun ilk basamağı spermin kumulus hücrelerine temasıyla hyaluronidaz enziminin salınımı ile başlar. Spermin zona pellusida ile temasıyla akrozomal enzimlerin hepsi salınır, reaksiyon tamamlanır. Bu süreç sperm penetrasyonunu ve fertilizasyonu kolaylaştırır (Şekil 8) (Ross ve ark., 2003;Kuruş, 2020).

2.1.1.3.1.6.Kuyruk Yapısı

Sperm kuyruğu boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 4 kısımda incelenir. Sperm başını ve kuyruğunu birbirine bağlayan kısım **sperm boynu** olarak adlandırılır. Yoğun fibröz yapıdan oluşan bu kısım proksimal sentriyolden meydana gelmiştir. Bu yapı sperm hareketliliği esnasında esneklik vererek bükülmeyi kolaylaştırır (Şekil 8)(Ross, 2003;Kuruş, 2020).

Mitokondriyumların bulunduğu ve spermin kuyruğunu oluşturan **orta parça** yaklaşık 7 μm uzunluğundadır. Spermin baş kısmına ortadan bağlanmış olan orta parça silindirik biçimlidir. Spermin kuyruk hareketi için gerekli olan enerjiyi orta parçada bulunan mitokondriyonlar üretir (Şekil 8)(Ross, 2003;Kuruş, 2020).

Esas parça;aksonemal kompleksi, kalın fibrillerin ve fibröz kılıfı içeren yaklaşık 40 μm uzunluğunda yapıdır. Kuyruğun bu kısmında sitoplazmik droplet gözlenmez. Giderek incelen ve uniform bir yapıya sahiptir (Şekil 8)(Ross, 2003;Kuruş, 2020).

Kuyruğun son 5 μm 'lik kısmını oluşturan **son parça** yalnızca aksonemal kompleksi içerir (Şekil 8)(Ross, 2003;Kuruş, 2020).



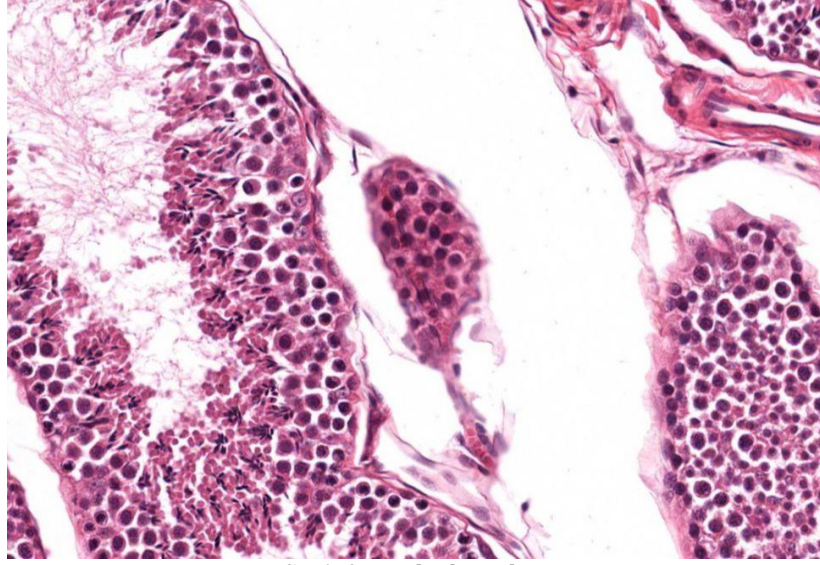
Şekil 8. Spermin Yapısı
(Junqueira & Carneiro 2009)

2.1.1.3.1.7.Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri seminifertübül membranından lümene kadar uzanan, spermiyumları destekleyen, besleyen ve koruyan prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücreleri fagosite etme yeteneğiyle olgunlaşmamış spermatogenetik hücreleri ortadan kaldırır. Bu hücrelerin bölünme yetenekleri yoktur. Heterokromatin yapıda nükleusa sahip bu hücrelerin membran sınırları düzensizdir. Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları, zengin bir hücre iskeleti yapısından ve gelişmiş bir golgi kompleksinden oluşmaktadır. Sertoli hücreleri sperm taşınması için sıvı salgılar. Hücreler arasında bulunan sıkı bağlantı kompleksleri (zonulaokludens) hücreleri sıkıca birbirine bağlayarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Seminifertübül epitelinin bazal ve adluminal kompartman olarak iki kısma ayırır. Kan testis bariyeri, bazal kompartmanda yerleşik olan spermatogonyumların spermatojenik serinin diğer hücrelerine dönüşümü ile birlikte adluminal kompartmana geçişiyle, primer ve sekonder spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan korur. Folikül uyarıcı hormon (FSH) tarafından uyarılan Sertoli hücreleri spermatogenez için uygun ortam oluştururlar(Şekil 4)(Ross ve ark.2003; Kuruş, 2020; Demir, 2006; Karagöz, 2002).

2.1.1.3.2.İnterstisyel Alan

Seminifertübüllerin arasında yer alan tunika vasküloza uzantısı olan interstisyel bağ doku, kan ve lenf damarları ve sinir liflerini içeren gevşek bağ dokusu karakterindedir. Bağ dokusu hücreleri olan fibroblastlar, makrofaj hücreleri ve mast hücrelerinin yanı sıra Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) bu alanlarda bulunur. Leydig hücreleri testesteron üreten steroid yapıda hormon sentezleyen hücre karakterinde hücrelerdir. Leydig hücreleri yuvarlak veya poligon şekilli, yuvarlak nükleuslu, asidofilik stoplazmaya sahiptir. Bu hücreler bağ dokusu içerisinde tek tek veya gruplar halinde görülürler (Ross ve ark.2003; Gartner, 1997).



Şekil 9:Leydig hücreleri
(Robert L. Sorenson, Minnesota Minneapolis Üniversitesi, MN)

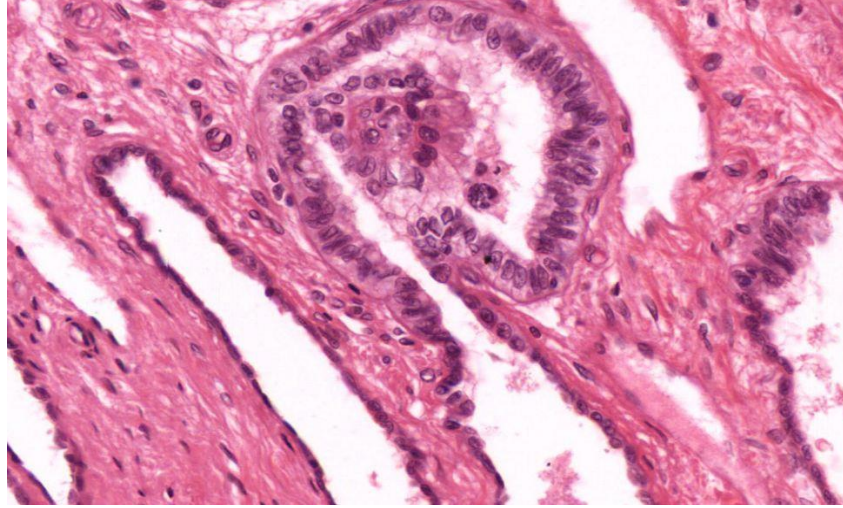
2.1.1.3.3.Kan-Testis Bariyeri

Kan-testis bariyeri, seminifer tübül epitelinde bulunan Sertoli hücreleri arasındaki farklı bağlantılar tarafından oluşturulur. Burada bulunan zonula okludensler germinal epitel bazal ve adluminal olmak üzere iki ayrı kompartmana ayırır. Kan testis bariyerini, germinal epitel iki bölüme ayıran bu kompleksler oluşturmaktadır (Borgen, 1992).

2.1.1.3.4. İntratestiküler Kanallar

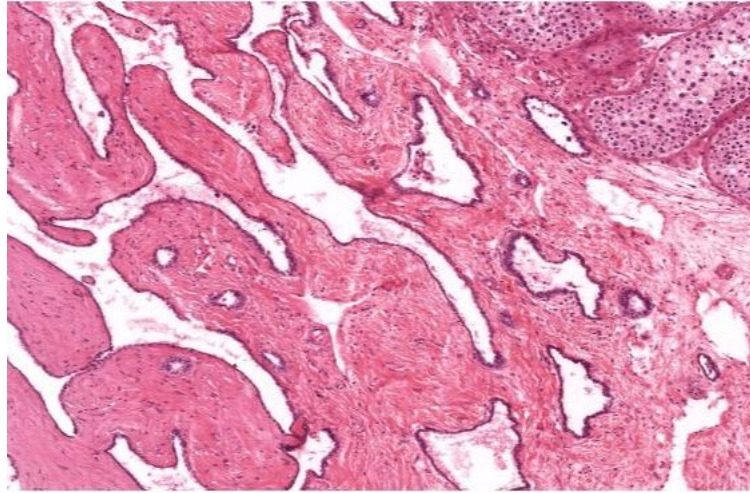
İntratestiküler kanallar, testiküler sıvı ve spermatozoanın epididimise iletilmesinde önemli rol oynar. İntratestiküler kanalları tubulirekti ve rete testis oluşturmaktadır.

Tubuli Rekti: Seminifer tübüllerin mediastinuma yaklaştıkça düzleşerek oluşturdukları kanala tubulirekti denir. Tubulirekti epitel sadece prizmatik karakterde Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır, spermatogenik seri hücreleri bulundurmazlar. Kısaldı ve daraldı bu yapılar mediastinum içinde rete testise açılırlar (Şekil 10) (Ross, 2003; Kuruş, 2020).



Şekil 10:Tübüli rekti (Düz tüpler)
(Robert L. Sorenson, Minnesota Minneapolis Üniversitesi, MN)

Rete Testis: Mediastinum testis içerisinde anastomoz yapan labirent biçimli kanalların birleşmesi ile rete testis oluşur. Rete testisler histolojik olarak alçak prizmatik epitel veya tek katlı kübik epitel ile döşelidir (Şekil11) (Ross, 2003; Kuruş, 2020; Eşrefoğlu, 2016).



Şekil 11:Rete testis
(Robert L. Sorenson, Minnesota Minneapolis Üniversitesi, MN)

2.1.2.Ekstratestiküler Kanallar

2.1.2.1.DuktuliEfferentes

Rete testisi yaklaşık 15-20 civarı küçük kanallarla duktus epididimise bağlayan kanallar duktuli efferentes olarak adlandırılır. Bu kanallar çevresi gevşek bağ dokusu ile sarılmış yalancı çok katlı silli silindirik epitel ile döşelidirler. Epitel, silli prizmatik esas hücreleri ve kübik hücreleri barındırır. Epitelin çevrelediği lümen düzensizdir. Epitel ve altındaki bağ dokusunun oluşturduğu kıvrımlarla testere dişi görünümü verir. Silli esas hücreler hareketsiz spermlerin duktus epididimise taşınmasını sağlar. Seminifer tübüllerden salınan sıvının geri emilimi duktuli efferentesteki siliasız hücreler tarafından yapılmaktadır (Batislam, 2004). Duktuli efferentesi oluşturan küçük kanallar üç tip hücre içerirler. **Silliprizmatik esas hücreler** prizmatik şekilli hücrelerdir ve esas hücre olarakda bilinmektedir. Bu hücreler bazalinde bulunan invajinasyonların ve sili yapısının yardımıyla lümende bulunan sıvının geri emilimini sağlar. Siller epididimise doğru uzanan vuruş yönüne sahiptir. Duktuli efferentes kanallarında bulunan bir diğer hücre tipi **mikrovilluslu kübik hücrelerdir**. Bu hücreler prizmatik/kübik şekle sahip alçak yapıdadırlar. Mikrovillusler fibroelastik liflerle birlikte sperm hücrelerinin taşınmasına yardım eder. Epitel dizisinin bazalinde sıkışık görümlü yuvarlak ve küçük şekilli **bazal hücreler** mitotik aktivitesi yüksek hücrelerdir. Kanaliküler invajinasyonlar ve pinositotik veziküller içerirler. Duktuli efferentes epitelinde ayırt edilen bu 3 hücre grubu dışında Halo hücreleride bulunur. Bu hücreler intra epitelial göç eden lenfositlerdir. Epitelin altında belirgin bazal membran bulunur. Lamina propriasında sirküler seyirli düz kas hücreleri bulunur. Duktuli efferentes ekstratestiküler duktuslarda düz kasın ilk görüldüğü duktuslardır. Düz kas tabakası diğer duktus sistemlerinde gitgide kalınlaşır. Düz kas hücrelerinin arasında elastik lifler bulunur. Spermin duktus epididimise taşınması duktuli efferentesteki prizmatik hücrelerde bulunan silier aktivite ve müsküler tabakanın kontraksiyonlarıyla gerçekleşir. (Ross, 2003; Kuruş, 2020).

2.1.2.2.DuktusEpididimis

Duktuli efferentes ve duktus epididimis beraber **epididimis** olarak tanımlanır. Epididimis 4-6 m uzunluğunda olup baş, gövde ve kuyruk bölümlerine ayrılır. Baş

kısmını duktuli efferentes oluştururken, gövde ve kuyruk kısmını duktus epididimis oluşturmaktadır. Testisin arka üst yüzü boyunca uzanan duktus epididimis spermiumların depolandığı yerdir. Spermiler hareket yeteneğini burada kazanır (Junqueira, 1998). Duktus epididimis epiteli sterosilyalı prizmatik esas hücreler, bazal hücreler ve Halo hücre tabakalarından oluşur. **Sterosilyalı prizmatik esas hücreler** hem duktuli efferenteste hem de duktus epididimiste yar alan prizmatik hücrelerdir. **Bazal hücreler** bazal lamina üzerinde yerleşmiş küçük yuvarlak şekilli bu hücreler, duktus epididimis ve duktuli efferentes epitelinin kök hücreleridir. **Halo hücreleri** sıkı ve berrak sitoplazmaya sahip, epididimal epitel boyunca bulunan küçük hücrelerdir. Epididimal hücreler hem salgılama hem de absorbsiyon fonksiyonuna sahiptirler. Duktuli eferentesten farklı olarak düzgün bir lümene sahiptir. Duktus epididimiste sirküler düz kas tabakasına iç ve dış longitudinal düz kas tabakası eklenir (Ross, 2003; Kuruş, 2020).

2.1.2.3.Duktus Deferens

Spermatik kordonun bir parçasını oluşturan duktus deferens, prostata girmeden önce genişleyerek ampullayı oluşturur. Seminal vesiküller ampullanın son kısmında duktusa katılır. Sonrasında prostata girerek prostatik üretraya açılır (Setchell, 1988). Duktus deferensin tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya olarak 3 epitel tabakası vardır. **Tunika mukoza** epiteline ait prizmatik hücreler uzun mikrovilluslara sahiptirler. Bazal lamina üzerinde yerleşmiş küçük yuvarlak şekilli bu hücreler, kök hücre görevini üstlenmiştir. Duktus deferensin epididimisten farklı olarak lümen yapıları düzensizdir. Elastik liflerden zengin gevşek bağ dokusu içeren laminapropriaya sahiptir. Sıkı bağ dokusu kasa yakın olan kısımda yerleşirken, gevşek bağdokusu kısmı epitele yakın olarak yerleşmiştir. Diğer bir tabaka olan **tunika muskularis** duktus deferensin en kalın ve gelişmiş tabakasıdır. Longitudinal, sirküler, longitudinal seyirli üç kas tabakasından oluşur. Duktus deferensin üçüncü tabakası olan **tunika adventisya**, elastik liflerden zengin bağ dokusu yapısına sahiptir. Tunika adventisya içinde damarlar ve sinirler bulundurulur (Ross ve ark. 2003; Kuruş, 2020).

2.1.2.4.Duktus Ejakulatoryus

Duktus ejakulatoryus, proksimalde basit silindirik, distale doğruyalancı çok katlı silindirik epitel ve distalde transizyonel epitel ile döşelidir. Kas tabakası ampullada kaybolur, epitel prostatın fibromüsküler bağ dokusu ile çevrilidir. Duktus ejakulatoryus prostatik üretraya açılır. Üretranın bubölümünde çift fonksiyona sahip olan duktusejakulatoryus, idrar ve ejakulat iletiminden sorumludur (Batislam, 2004).

2.1.3.Yardımcı Genital Bezler

2.1.3.1.Vesikula Seminalis

Seminal vezikül çifti, toplam seminal sıvı hacminin %70'ini salgılar. Her vezikülün lümeni oldukça düzensizdir ve histolojik kesitlerde düşük büyütmede bal peteği görünümüne sahiptir. Seminal vezikül salgısında spermelerin temel besin kaynağı olan fruktoz bulunmaktadır. Seminal vezikül salgısında fruktoz dışında sitrik asit, fibrinojen ve prostaglandin bulunmaktadır ve spermatozoaların aktive edilmesinde görev alırlar (Ross, 2003; Kuruş, 2020; Gartner, 1997).

2.1.3.2.Prostat

Erkek üreme sisteminin en büyük yardımcı genital bezi olan prostat,düz kas lifleri ve bağ dokusundan zengindir. Birincil görevi, seminal sıvının içeriğine katılması için şeffaf, hafif alkali sıvı salgılamaktır. Prostatik salgı ejakulatın bir kısmını oluşturmaktadır (Ross, 2003; Kuruş, 2020; Gartner, 1997).

2.1.3.3.Bulboüretal Bezler

Preseminal sıvıyı salgılayan bulboüretal bezler, penis kökünün başlangıcında yerleşmiş bir çift birleşik tübüloalveolar yapıda bezlerdir. Preseminal sıvının içeriği yüksek miktarda galaktoz, galaktozamin, sialik asit, galakturonik asit ve metilpenaz içerir. Seksüel uyarım ile salgılanır ve penilüretrayı kayganlaştırarak ejakulatın geçişini kolaylaştırır (Ross, 2003; Kuruş, 2020; Gartner, 1997).

2.1.4.Penis

Penis, dorsalde yerleşen bir çift korpuskavernozum penis ve ventralde yerleşen bir adet korpuspongiyozum penis olarak tanımlanan üç kavernöz yapıdan oluşmaktadır. Erkek genital organ olarak ejakulatın ve boşaltım organı olarak idrarın

atılmasını sağlar. Bu üç erektile doku elastik liflerden zengin bağ dokusu, damarlar ve düz kas yapıları yer alır ve en dıştan deri ile çevrilidir. Korpuspongiozumun ortasında yer alan penilürethra, pseudostratifiye silindirik epitelyum ile döşelidir. Litre bezleri olarak bilinen epitelin bağ dokusu çıkıntıları ejakulasyon öncesi mukus salgısını oluşturur (Ross, 2003; Kuruş, 2020; Ovalle ve ark, 2009).

2.2.Semen

Ejakulat (semen), içerisinde testisin ekzokrin salgı ürünü olan spermilerin bulunduğu, aksesuar bezlerin ve boşaltım kanallarının ekzokrinsalgı ürünlerini bulunduran opak sıvıdır. Ortalama hacmi 3-4 ml olan semen içerisinde yaklaşık 200-500 milyon sperm vardır. Ejakülatın %10'dan azını sperm hücreleri oluştururken, geri kalan kısmını ise seminal plazma oluşturmaktadır. Ejakulat sıvısını prostattan ve seminal bezlerden salgılanan sıvılar oluşturur. Ejakülatın %3-5'ini bulboüretal bezlerden ve üretranın litre bezlerinden salgılanan sıvı oluşturur. Bu salgı üretrayı kayganlaştırarak ejakulat sıvısının ilerlemesini kolaylaştırır. Prostat bezi salgısı ejakülatın %15-20'sini oluşturmaktadır. Prostat salgısı üretranın asiditesini azaltır ve spermin hareketini kolaylaştırır. Ejakülatın büyük kısmını %70-80 oranda vezikula seminalis salgısı oluşturmaktadır. Alkali özelliğe sahip ejakulat sıvısı, ortam pH'sını kısa süre içerisinde nötralize ederek spermeleri vajinada bulunan laktik asit kaynaklı asiditeden korur. Ejakulat spermin hem erkek hemde dişi üreme kanallarında kolayca taşınmasını etkiler (Kuruş, 2020).

2.2.1.Rutin Semen Analizi

Testis ve yardımcı genital bezlerin faaliyetini değerlendirmek amacıyla semen analizi yapılır. Rutin semen analizi için hastalara 3-5 gün cinsel perhiz önerilir. Hastalardan mastürbasyon yolu ile alınan ejakülatın likefaksiyonunun gerçekleşmesi için 15-60 dk 37°C sıcaklıktaki inkübatörde bekletilir. Likefiye olmuş ejakulat makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilir. Rutin semen analizinde sperm konsantrasyonu, motilitesi, viabilitesi ve morfolojisi değerlendirilir (Dünya Sağlık Örgütü-WHO, 2021).

Tablo1: Semen Karakteristik Özelliklerinin Alt Referans Limitleri (WHO, 2021)

Semen Parametreleri	Alt referans limiti
Semen volümü(ml)	1.4 (1.3–1.5)
Spermkonsantrasyonu ($\times 10^6$ /ml)	15 (12-16)
Toplam sperm sayısı ($\times 10^6$ /ejakulat)	39 (35–40)
Toplam hareketlilik (%)	42 (40–43)
İleriye doğru hareketlilik (%)	30 (29–31)
Vitalite(%)	54 (50–56)
Sperm morfolojisi (%)	4 (3,9-4,0)
Diğer eşik değerler	
pH	$\geq 7,2$
Peroksidaz pozitif lökositler (106 /ml)	$< 1,0$
MAR testi (%)	< 50
İmmunobeadtest(%)	< 50
Seminal çinko (μmol /ejakulat)	$\geq 2,4$
Seminalfruktoz (μmol /ejakulat)	≥ 13
Seminalnötralglukozidaz (mU/ejakulat)	≥ 20

2.2.2.Makroskobik Değerlendirme

Makroskobik değerlendirme sırasında ejakulatın rengi, karakteristik kokusu, semen volümü, likefaksiyon olup olmadığı, viskozitesi ve semen pH'ı değerlendirilir.

2.2.2.1. Likefaksiyon

Ejakulat hastadan temin edildiğinde, semen yarı katı koagüle kitle halindedir. Oda sıcaklığında bekletildiğinde birkaç dakika içinde incelmeye (likefiye olmaya) başlar. Semen zaman içerisinde daha homojen, su gibi akıcı forma dönüşür. Koagülasyon topakları kaybolur. Numunelerin büyük bölümü oda sıcaklığında 15

dakika içinde likefiye olur. Nadiren 5-60 dakika ya da daha uzun sürebilir. Ejakulasyon sonrası 15-60 dakika içinde semenin likefaksiyonu gözlenmesi ile analize başlanmalıdır. Normal seminal likefaksiyonunun oda sıcaklığında 60 dakikada tamamlanması gerekir. Likefaksiyon süresinin uzaması geç likefaksiyon olarak belirtilmelidir. Geç likefaksiyon vakalarında 2 yöntem uygulanır. Mekanik yöntemde spermi oksidatif strese sokmayacak düzeyde pipetaj yaparak likefaksiyon sağlanır. Enzimatik yöntemde ise semen proteaz enzimi ile çözülerek likefiye edilir (WHO, 2021).

2.2.2.2.Viskozite

Viskozite ölçümü likefaksiyon sonrasında yapılır. Pipetaj yapılarak semen pastör pipetine alınır ve damlatılarak, damla ile pipet arasında oluşan ince ipliğin uzunluğu dikkate alınarak viskozite belirlenir. Normal viskoziteye sahip semende damlalar birbirinden ayrı düşerken, anormal viskoziteye sahip semen örneğinde bu iplikçikler yaklaşık 2 cm kadar uzamaktadır (WHO, 2021).

2.2.2.3.Semen Volümü

Ejakulatın hacmi total sperm hücrelerinin sayısının hesaplanmasında kullanılacağı için hassas bir şekilde ölçülmesi gerekir. Semen hacminin doğru ölçülmesi için geniş ağızlı bir ölçüm silindrine alınarak derecelendirilir (WHO, 2021).

2.2.2.4.Semen pH Değeri

Semen pH'ı semen içerisindeki tüm salgılanan sıvıların pH değerlerini gösterir. Laboratuvar için belirlenmiş standarta göre ejakulat alındıktan sonra 30 dakika içinde pH ölçümü gerçekleştirilmelidir. pH ölçümü için 6.0-10.0 arasında olan pH ölçüm kağıdı kullanılmalıdır. Semen pH değerlendirilmesi için alt referans 7.2 olmalıdır (WHO, 2021).

2.2.3.Mikroskopik İnceleme

Spermin mikroskopik incelemesi sırasında sperm sayısı, motilite ve viabilite yüzdesi ve sperm morfolojisi incelenmektedir.

2.2.3.1.Sperm Sayısı

Likefiye olmuş semen makroskopik değerlendirme yapıldıktan sonra bir pipetör yardımıyla 20 µl volümde Horwell veya Makler sayım kamarasına damlatılarak, faz kontrast mikroskobu yardımıyla x20 büyütmede incelenmektedir. Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre alt referans değeri ml başına sperm sayısı 15×10^6 olmalıdır. Bu sayı sperm konsantrasyonunu belirler. Ejakülattaki total sperm sayısının dünya sağlık örgütünün belirlediği alt referans değeri 39×10^6 olmalıdır.

Makler kamaraya konulan semen içerisindeki sperm yoğunluğuna göre sayım yapılacak alan belirlenir. Sperm yoğunluğu alana homojen dağılmışsa ve 100 kare içerisinde kare başına birden fazla sperm düşüyorsa 10 kare sayılır, kare başına birden az sperm düşüyorsa 100 kare sayılır. Sperm sayısı daha az ise tüm alan sayılarak değerlendirilir. Tüm alanda sperm görülmediği durumlarda 3000 G'de 15 dakika santrifüj edilir ve yeniden makler kamaraya yayılarak mikroskop altında incelenir (WHO, 2021).

2.2.3.2.Sperm Motilitesi

Makler kamaraya damlatılan semen, faz kontrast mikroskobunda değerlendirilerek x20 büyütmede 200 adet sperm hücresinin hareketliliğine göre motilite yüzdesi belirlenir. Motilite değerlendirmesi spermelerin, progresifmotil sperm (ileri hareketli sperm), non-progresifmotil sperm (yerinde hareketli sperm), immotil sperm (hareketsiz sperm) olarak 3 kategoride değerlendirilmesiyle belirlenir (WHO, 2021).

2.2.3.3.Sperm Vitalitesi

Membran bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanan sperm canlılık testi, özellikle progresif hareketli sperm oranının %40'dan az olduğu durumlarda önemlidir. Sperm canlılık testi, hipoozmotik şişme yöntemi ve boya eksklüzyonu metodu (Eozinnigrosin boyaması) olmak üzere 2 yöntem ile değerlendirilir.

Canlı spermelerde membran bütünlüğü korunduğu için, hareketsiz olsalarda vital boya hücre membranından sitoplazmaya geçemediği için, sitoplazma boyanmadan şeffaf olarak kalır. Membran bütünlüğü bozulmuş spermelerde, boya

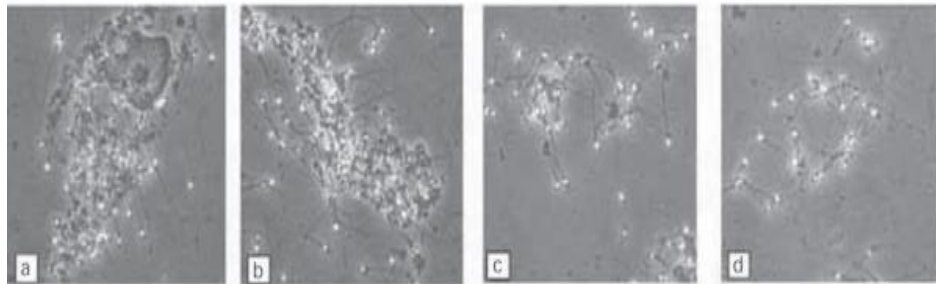
hücre membranından sitoplazmaya geçer, sitoplazma koyu pembe boyanır. Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği kriterlere göre vitalitenin referans alt sınırı %54'dür.

Hipoozmotik şişme yönteminde ise hipotonik ortama hareketsiz spermeler bırakılarak membran hasarı olmayan sperm hücrelerinin şişmesi gözlemlenir (WHO, 2021). Jeyendran tarafından ilk defa 1984 yılında tanımlanan hipo-osmotik şişme testi (HOS) dünya sağlık örgütü tarafından boyama yöntemlerine alternatif olarak önerilen bir yöntemdir (Jeyendran ve ark., 1984). Bu test uygulanan örneklerde canlı olduğu tespit edilen sperm hücresinin yardımcı üreme tedavi yöntemlerinde kullanılma şansı tanır. Casper ve ark. yaptığı bir çalışmada inmotil spermeler ile yapılan ICSI'de hipo-osmolar şişme testi (HOS) kullandıklarında fertilizasyon ve klivaj oranlarını sırası ile %43 ve %39 olduğunu göstermişler, ancak bu oranlar rastgele seçilmiş spermelerde yapılan ICSI'de fertilizasyon ve klivaj oranları sırası ile %26 ve %23'tür (Casper, 1996). HOS testi taze ejakulat örneğinden alınan spermelerin değerlendirmelerinden etkin olsada dondurma/çözdürme sonrası sperm canlılığını değerlendirmede yeterli değildir (Casper, 1996).

Hipo-ozmotik Şişme Testi (HOS) Ortamının Hazırlanması ve Yönteminin Uygulanması: 100 ml Distile su içerisine 1,351 gram D-fruktoz ve 0,735 gram sitratdihidrat çözündürülerek reaktif hazırlanır. Yıkama yöntemi ile hazırlanan semen örneğinden 100 µl bir kısmı alınır ve hipo-ozmotik çözeltiye eklenir. Daha sonra 5 ile 30 dk arasında 37°C'de inkübe edilir, ardından canlı spermeler hipo-ozmotik ortamda kuyrukları kıvrılırken, cansız sperm örneklerinde bu değişim görülmez (WHO, 2021).

2.2.3.4. Spermatozoanın Agregasyonu

Hareketsiz spermelerin mukus iplikleri gibi debris materyali ile veya sperm dışı hücreler ile birbirlerine yapışması sonucu gözlenir (WHO, 2021).



Şekil 12: Bir epitel hücresi (a), debris (b) veya spermatozoa (c, d) ile kümeleşmiş spermatozoa görüntüleri (WHO 6.baskı, 2021).

2.2.3.5.Sperm Aglütinasyonu

Hareketli spermilerin birbirlerine karışık olarak yapışarak bir arada bulunmasıdır. Aglütinasyon izole, orta, geniş ve yoğun aglütinasyon olarak 4 farklı aşamada sınıflandırılmaktadır (WHO, 2021).

2.2.3.6.Morfolojik Değerlendirme

Likefiye olmuş semen örneğinden bir lam üzerine ince yayma yapılarak hazırlanan yayma preparat havada kurutulduktan sonra fiksasyon işlemi uygulanır. Fiksasyondan sonra Diff-Quik boyası ile boyama yapılır. Diff-Quik boyası 3 farklı solüsyondan oluşmaktadır:

1. Fiksatif solüsyonu
2. Xanthene solüsyonu
3. Thiazine solüsyonu

UygulamaYöntemi

1. Oda sıcaklığında kurutulmuş yayma preparat fiksatif solüsyonuna 10 defa (dips) batırılıp çıkarılır.
2. Yayma preparat Xanthenesolüsyonuna 8 dips batırılıp çıkarılır.
3. Yayma preparat Thiazinesolüsyonuna 8 dips batırılıp çıkarılır.
4. Son olarak steril distile su içinde1 dakika yıkanır.

Preparat oda ısısında kurutulup, faz kontrast mikroskobunda x100 büyütme oranı (immersiyon yağı damlatılarak) ile inceleme yapılmalıdır. Dünya sağlık örgütünün belirlediği referansa göre normal morfolojide sperm yüzdesi alt referansı %4 olarak belirlenmiştir (WHO, 2021).

Tablo 2: Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi (Kruger, 1986).

BAŞ	Uzunluk 4-5 µm / Genişlik 3 µm
AKROZOM	Sperm başının % 40-70'ini oluşturmali
ORTA PARÇA	Genişlik 1 µm / Uzunluk 7 µm
KUYRUK	Uzunluğu 45 µm / Uniform / Orta parçadan daha ince / Kıvrılmamış olmalıdır
SİTOPLAZMİK DAMLACIK	Sperm başının % 30-70'inden az sadece orta parçada lokalize

2.3.Akrozomal Reaksiyon

Akrozomal reaksiyon spermin fonksiyonel kapasitesini değerlendirme yöntemlerinden biridir. Fertilizasyon anında spermin kumulus hücreleri arasından ilerlemesi ve zona pellusidaya bağlanması akrozomal kep içerisindeki hidrolize edici enzimlerin etkisiyle gerçekleşir. Sadece akrozomal reaksiyonu gerçekleştiren spermiler zona pellusidaya nüfuz eder ve oosit hücre membranına bağlanır, ooplazmaya geçer. Akrozomal reaksiyonun gerçekleşmesi için litik enzimlerin salınması ve membran reseptörlerinin varlığı gerekmektedir, böylece sperm zonapellusidaya penetre olur ve oolemma ile bütünleşir. Akrozomal reaksiyonun spermin zonapellusidaya bağlanması ile başlaması gerekir. Akrozom, sperm başının %40-70'inin kaplayan, glikohidrolazlar, proteazlar, esterazlar, asitfosfatazlar ve arilsülfatazlar dahil olmak üzere çeşitli enzimler içeren büyük bir salgı granülüolarak kabul edilir. Bu hidrolitik enzimlerin salınması zona pellusidanın yapısını bozar ve spermatozoanın ilerlemesini ve kalsiyuma (Ca^{2+}) bağımlı akrozomal reaksiyon adı verilen bir süreçte oositle birleşmesine olanak tanır (Abou-Haila ve ark., 2000).

Akrozomal reaksiyonun aşamalarını tanımlayacak olursak; spermin dışı genital sistemde kapasitasyonundan sonra akrozom reaksiyonu gerçekleşir. Spermin kumulus hücreleriyle temasıyla bir grup litik enzimsalınır, fakat akrozomal kep halen bütünlüğünü korur. Zona pellusidaya temasıyla kepiçindeki tüm enzimlerin hücre dışına salınımı gerçekleşir. Enzimlerin salınması hücrelere kalsiyum alımına ve hücre içi pH artışına bağlıdır (pH 7.1-7.5). Akrozom şişer ve dışakrozomal zar üstteki plazma zarıyla birleşir. Vezikülasyon meydana gelir ve gözenekler oluşur. Akrozomal enzimler dışarıya salınır. Akrozomal reaksiyon kalsiyum iyonofor (A23187), progesteron, forbolmiristat esterleri vefoliküler sıvı kullanılarak in vitro indüklenebilir (Jaiswal ve ark 1999). Spesifik olarak kalsiyumiyonofor hücre dışı Ca^{2+} 'yı hücreye taşır veya iyonu hücre içi depolardan serbestleştirir. Ca^{2+} sperm kapasitasyonunun ve posterior akrozomal reaksiyonun sinyal yollarının aktivasyonunda anahtar rol oynar (Florman ve ark., 2008). Sperm fonksiyonunu incelemenin olası bir alternafi, spermin oositi fertilize etme potansiyeli için temel olay olan akrozomal reaksiyonun değerlendirilmesidir. Akrozomal reaksiyonun analizi elektron mikroskopi, aydınlık alan görüntüleme, floresan etiketli lektinlerle, flüoresan işaretli antikolarla, klortetrasiklin flüoresansı ile ve flow-sitometrik

analizle değerlendirilebilir (Zeginiadou ve ark., 2000). Belirtilen testlerin tümü akrozom reaksiyonu tamamlanmış spermleri tamamlamamış olanlardan ayırabilir, başka bir deyişle sadece spontan reaksiyona giren spermleri belirleyebilir. Kumulus ooforusu yalnızca akrozomu bozulmamış spermler nüfuz edecektir ve bu nedenle bu testlerin sonucunun semen numunesinin fertilizasyon potansiyelini belirleyici etkisi azdır ya da yoktur. Tesarik ve arkadaşları (1984) akrozom reaksiyonunun uygun zamanlamasının önemini vurguladı ve bir akrozom reaksiyon testinin anlamlı olabilmesi için ‘spontan ve uyarılmış akrozom reaksiyonlarını ayırt edecek şekilde tasarlanması gerektiği’ sonucuna vardı (Jan Tesarik ve ark., 1989). Bu koşul iyonofor ile indüksiyonun ardından akrozom reaksiyonu (acrosome reaction following ionophore challenge-ARIC) ile karşılanmaktadır (Cummins ve ark., 1991). ARIC analizinde spermatozoa kapasitasyon koşullarında hazırlanır ve daha sonra kalsiyum akışını indüklemek için kalsiyum iyonofor A23187 ile muamele edilir. Daha sonra spermatozoa yıkanır, lama yayılır, etanol ile fiks edilir ve akrozomal matrikse bağlanan floresan lektin pisumsativum ile etiketlenir. Floresan etiketleme modeli reaksiyona girmiş ve reaksiyona girmemiş spermler arasında farklıdır ve bu fark spermatozoanın ayrılması için kullanılır. Spontan olarak reaksiyona giren spermlerin toplam yüzdesinin indüklenmiş spermlerden çıkarılması ile elde edilen ARIC skoru akrozom fonksiyonunu tanımlayan daha iyi bir yaklaşımdır (Cummins ve ark., 1991). ARIC skorunun fertil ve infertil erkekler arasında eşik değerini %31 olarak vurgulayan çalışmaların yanı sıra (Pampiglione ve ark., 1993), Cummins ve arkadaşları bu değeri %5 olarak, Henkel ve arkadaşları ise %7,5 olarak raporlamıştır (Cummins ve ark., 1991; Henkel ve ark., 1993). Klinik anlamlılık açısından bakıldığında; akrozomal reaksiyon oranı düşük olan hastalar intra uterin inseminasyon ve/veya in vitro fertilizasyon yerine intra sitoplazmik sperm enjeksiyonuna yönlendirilir. Oehninger ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği meta analizde fertilizasyonun tahmini için akrozomal reaksiyon testlerinin belirleyici gücünün olduğu raporlanmıştır (Henkel ve ark., 1993; Tello-Mora ve ark., 2018). İn vitro akrozomal reaksiyon değerlendirmesinin IVF tedavisindeki hastalarda fertilizasyonun %30-50’sini tahmin edebileceği bildirilmiştir (Wiser ve ark., 2013). Toplam 796 denekte, ROC eğrisi daha yüksek pozitif prediktif değer (>%75), negatif prediktif değer (>%65), %80 duyarlılık ve %20 yanlış pozitiflik oranı gösterdiğini

vurgulamışlardır. Klinik kullanımdan ziyade araştırma amaçlı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Henkel ve ark., 1993). Taze ve dondurulmuş-depolanmış spermde çözme sonrası hasarlı akrozom içeren hücrelerin yüzdesinin hesaplanması, semen değerlendirmesinin önemli aşamalarından biridir.

2.4.Sperm Morfolojik Anomalileri

Spermin normal görünümü dışında; baş, boyun ve kuyruk bölgesinde olası morfoloji anomalileri bulunmaktadır.

Baş anomalileri: Sperm başı büyük, küçük, konik, yuvarlak, piriform, vakuollü , amorf ve çift başlı şeklinde görülebilmektedir.

Boyun ve orta kısım anomalileri: Boynun ince olması veya kalın olması, sperm baş kısmının asimetrik olarak orta parçaya birleşmesi şeklinde görülebilmektedir.

Kuyruk anomalileri: Birden çok kuyruk olması, kısa olması, kırık olması, keskin açılı, koilşekilde görülebilir (WHO, 2021).

2.5.WHO Parametrelerine Göre Sperm Analizi Terminolojilerinin Tanımları

Aspermi; Seminal sıvının üretiminin olmadığı durumdur.

Astenoteratozoospermi; İlerleyici harekete sahip spermelerin ve normal morfolojiye sahip spermelerin alt referans değerinden az olması durumudur.

Astenozoospermi; İleri hareketli spermatozoa'nın alt referans değerinden az olması durumudur.

Azospermi; Tüm ejakülatta hiç sperm bulunmadığı durumdur.

Globozoospermi; Spermelerde akrozom anomalisinin yoğunlukta olup sperm başının yuvarlak görülmesi durumudur.

Hiperspermi; Semen hacminin üst sınırdan fazla olması durumudur.

Hiposperspermi; Semen hacminin alt sınırdan daha az olmasıdır

Kriptozoospermi; Semende santrifüj sonrası sperm görülmesidir.

Lökositospermi; Semendeki lökositlerin sayısının üst sınırdan (1 milyon/ml) fazla olmasıdır.

Nekrospermi; Numunede % 25'ten fazla ölü sperm hücresinin bulunması durumudur.

Normozospermi; Mililitredeki sperm sayısı 15 milyon/ml veya daha fazla olmasıdır.

Oligozoospermi: Mililitredeki sperm sayısı 15 milyon/ml'den daha az olmasıdır.

Polispermi; Mililitredeki sperm sayısı 15 milyon/ml'den fazla olduğu durumlardır.

Teratozoospermi; Morfolojik olarak normal sperm morfolojisinin %4 'ün altında bulunduğu durumlardır.

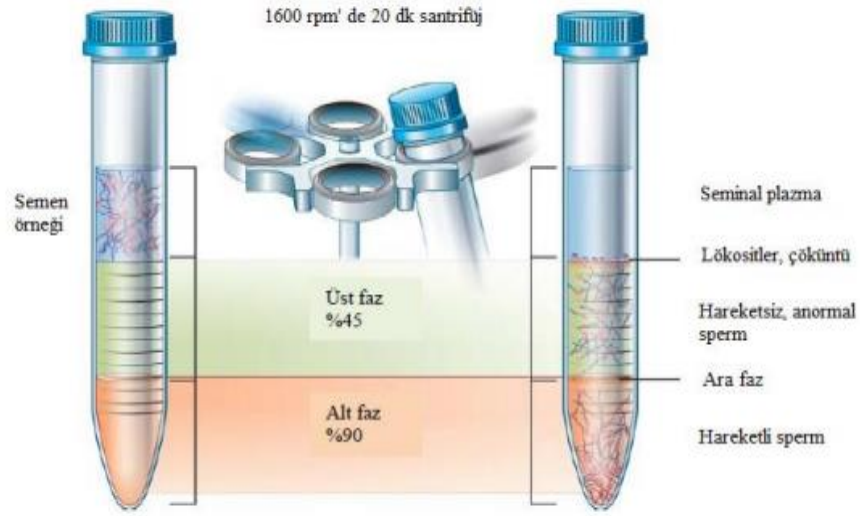
2.6.Sperm Hazırlama Teknikleri

Temel olarak sperm hazırlamanın 3 ana yöntemi vardır; Kesintili dansite-gradyanları yöntemi, direkt yüzdürme tekniği yöntemi (swim-up) ve basit yıkama yöntemi(WHO, 2021).

2.6.1. Dansite-Gradient Yöntemi

İyi kalitede spermelerin seçilmesini sağlayan, sperm parametrelerinin optimal olmadığı olgularda ensık kullanılan yöntemdir. Spermilerin ölü hücrelerden, seminal plazmadan ve diğer hücre tiplerinden temizlenmesini sağlayan yöntemdir. Bu yöntemde in vitrofertilizasyon (IVF) ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için sperm elde edilmesi amacıyla, spermier kolloidal silika kaplı partiküllerden geçirilir.

Bu yöntem için farklı ticari ürünler mevcuttur. Bu yıkama prosedüründe öncelikle bir konik santrifüj tüpüne 1 ml %80'lik gradient solüsyonu ve üzerine 1 ml %40'lık gradient solüsyonu birbirine karışmayacak şekilde ilave edilir. Gradient solüsyonlarının üzerine 1 ml likefiye olmuş ve pipetlenerek homojen dağılımı sağlanmış ejakulat örneği yavaşca eklenir. Konik tüp 15–30 dakika 300–400 g'de santrifüj edilir. Sperm pelletinden supernatant atılır. Pellete nazıkçe pipetaj yapılır, 5 ml medyum eklenerek sperm pelletin homojenitesi sağlanır ve 4–10 dakika 200 g'de santrifüjlenir. Supernatan atıldıktan sonra, pelletkültür medyumunu içindepipetaj yapılarak homojen dağılması sağlanır. Ardından sperm parametreleri değerlendirilir (WHO, 2021).



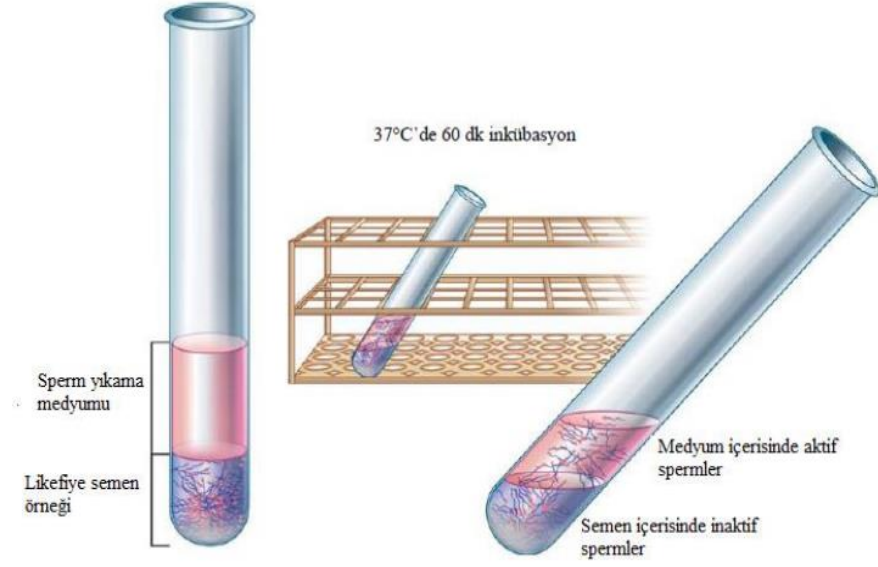
Şekil 13: Dansite Gradiyent Yöntemi (Beydola ve ark., 2013).

2.6.2. Basit yıkama

Yüksek miktarda sperm eldesi için bu yöntem kullanılır. Semen örneği iyice pipetaj yapıldıktan sonra kültür medyumunu ile 1:2 oranında dilüe edilir. Dilüe edilmiş örnek santrifüj tüpüne alınarak 300-500 g'de 5 ile 10 dakika arası santrifüj edilir. Seminal plazma atıldıktan sonra sperm pelletine 1 ml kültür medyumunu eklenerek, yavaşça pipetaj yapıp homojen hale getirilir. Yeniden 300-500 g'de 3-5 dakika santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve sperm pelleti dikkatlice pipetaj yapılarak homojen hale getirilir (WHO, 2021).

2.6.3. Direkt Yüzdürme Tekniği (Swim-up)

Spermilerin kültür medyumuna içine bekletilerek, seminal plazmadan mediuma doğru kendi motilite kabiliyetiyle başına yüzdürülmesi tekniğidir. Bu yöntem IVF ve ICSI için daha yüksek motiliteye sahip spermilerin seçiminde önemlidir. Bu yöntemde test tüpü içerisine 1 ml semen örneği koyulur, tüp 45° açıyla tutularak semen üzerine 1,2 ml kültür medyumunu eklenir ve tüp 37°C'de 1 saat inkübatörde bekletilir. Bir saatin sonunda tüp alınarak nazikçe dik tutulur ve üst kısım olan 1 ml'lik kültür medyumunu kısmı başka bir tüpe alınır. Bu kısımda hareketli sperm sayısının çok olması beklenir (WHO, 2021).



Şekil 14: Swim-up yöntemi (Beydola ve ark., 2013)

2.7. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon yaşayan hücrelerin yaşamını beklemede bırakmak, biyolojik saati durdurmak amacıyla uygulanan soğutma ve dondurma işlemleridir. Hücrelerin tuz ve düşük moleküler ağırlıklı solüsyonlar içinde, sıcaklıklarının sıfırın altında çok düşük değerlere, yaklaşık -196°C 'ye kadar düşürülmesi sonrası uzun yıllar sıvı nitrojen içerisinde dondurulup saklanması ve daha sonra normal fonksiyonlarını geri kazanmaları için çözündürülerek kullanılması yöntemidir. Kriyoprezervasyonun temelleri 1934 yılında Luyent ve arkadaşları tarafından atılmıştır (Luyent ve ar., 1934). İlk olarak permatozoayı Polge ve arkadaşları 1949 yılında dondurmışlardır (Polge ve ark., 1949). Bu araştırmacılar kriyoprotektan olarak gliserolü kullanmışlardır. Genel olarak erkeklerde spermatozoa veya gonadal doku kriyoprezervasyonu azospermi, virtualazospermi ve onkoloji hastalarında fertilitiyi korumak amacıyla uygulanmaktadır. Sperm kriyoprezervasyonunda hücrelerin %50'sinin kriyoprezervasyondan sonra sağkalımı sağlanmaktadır. Bu işlem hastalara herhangi bir risk oluşturmaz. Ejakulat veya cerrahi prosedür ile elde edilen sperm hücreleri vitrifikasyon veya yavaş dondurma yöntemi ile dondurulur. Bu yöntemler sonrası efektif sonuçlar alınmaktadır (Kuruş, 2020).

Üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında superovulasyon uygulanan hastalarda elde edilen çok sayıda oosit ve embriyonun daha sonra kullanılması amacıyla, taze siklularda embriyo transferinin siklus sürecinde transferinin riskli olduğu ovaryan hiperstimülasyon, intrauterin kanama durumlarında ya da uterin polip varlığında, transfer günü embriyo kalitesinin kötü olması veya blastulasyonun gecikmesi durumunda, kemo-radyoterapi tedavisi alacak olan onkoloji hastalarında fertilitenin korunması amacıyla kriyoprezervasyon uygulanmaktadır. Ayrıca IVF uygulamalarında virtualazospermi, obstrüktif ve non-obstrüktif azospermi hastalarında kriyoprezervasyon yapılır (Kuruş, Avcı B, 2020).

2.7.1.Kriyohasar

Kriyoprezervasyon işleminde donma sırasında dehidratasyon, çözme sırasında rehidratasyon hücrelerde hasara neden olur. Dehidratasyon ve rehidratasyon makromoleküller ve membranlar üzerinde mekanik strese neden olur. Donma esnasında ekstrasellüler ve intrasellüler solüsyonda oluşan önemli değişim suyun uzaklaşmasına neden olur ve gerçekleşen ısı transferi hücrenin canlılığını etkiler. Bu hasarları gidermek amacıyla kriyoprezervasyon işleminde bazı solüsyonlar kullanılır. Kriyoprotektan olarak tanımlanan bu solüsyonlar biyolojik doku ve hücreleri donma hasarından korur. Hiperozmotik karakterde oldukları için suyla tamamen karışırlar. Hücre içine giren ve girmeyen kriyoprotektanlar vardır. Hücre içine giren solüsyonlar kriyoprotektan içeren solüsyonlar olarak, hücre içine girmeyen solüsyonlar ise kriyoprotektan-free solüsyonlar olarak da tanımlanır. Hücre içine giren kriyoprotektanlar hücre içinde buz oluşumunu engeller. Geçirgen olmayanlar ise osmotikdehidratasyon etkisiyle koruyucu etki gösterirler. Her iki grupta intrasellüler yapıyı ve hücremembranını korur. Olumsuz etkileri toksisite ve osmotik hasardır. Toksik etkileri konsantrasyon ve uygulanan süreyle ilişkilidir. Kriyoprotektanlar hücre içinde proteinleri stabilize eder. Donma sıcaklığını düşürerek zarar verici buz gelişimini azaltır ya da ortadan kaldırır. Difüzyon hızlarına göre propanediol, dimetilsülfoksit, gliserol ve etilen glikol bu grupta sayılabilir. Hücre içine girmeyen, kriyoprotektan-free solüsyonlar tek başına kriyoprotektan olarak kabul edilmezler. Kriyoprotektanlarla birlikte kullanıldığında oluşan ozmotik basınç farkına bağlı zararı engelleyici etki gösterirler. Çözme

sürecinde hücresel şişmeyi engellerler. Ayrıca hücrenin dışında bulunan donmamış suyun oranını azaltırlar. Bunlara örnek olarak da disakkaritler (sükroz), monosakkaritler (glukoz ve heksoz) ve trisakkaritler (raffinöz) verilebilir (Kuruş M , Avcı B, 2020). Sperm kriyoprezervasyon işlemi belirgin olarak sperm motilitesi, sperm hücrelerinin membran bütünlüğü, morfolojik yapısı, kromatin kondansasyonu ve viabilitesi üzerinde olumsuz değişimlere yol açmaktadır. Yapılan bir çalışmada kriyoprezervasyon sonrası fertil ve infertil kişilerin sperm örnekleri karşılaştırıldığında, infertil erkeklerin sperm kromatin kondansasyonunda daha yüksek oranda bozulma olduğu saptanmıştır (Hammadeh ve ark, 1999).

2.8.Plateletten Zengin Plazma (PRP)

Trombositler (plateletler) çekirdeksiz hücreler olup, kan elemanları olan fibrin, eritrosit, lökositlerin damarların iç yüzüne pıhtı halinde yapışmasının başlamasından sorumludur. Pıhtı kitlesi oluşumunda, trombosit aktivasyonu birincil adımdır. Trombositlerin aktivasyonu hücre dışı katyonlar, trombin, kollajen, tromboksanlar, adenosindifosfat (ADP), serotonin, oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ve bunlarla sınırlı olmayıp çok sayıda farklı agonist tarafından sayısız mekanizma yoluyla meydana gelebilir. Trombositin aktivasyona yanıtı, intrasitoplazmik granül içeriğinin salınmasıdır. Bu yöntemlerden farklı olarak, ticari PRP kitleri mevcuttur. Bu kitler belirlenmiş bir trombosit konsantrasyonunu sağlarlar.

Son yıllarda, PRP uygulamaları geniş kullanım alanına sahiptir. Özellikle rejeneratif tıpta otolog kandan hızlı ve basit olarak elde edilen PRP'nin kısa sürede uygulanabilmesi ve immün cevabı tetiklememesi nedeniyle geniş kullanım alanı vardır. Günümüzde PRP uygulamaları önemli derecede ilgi çekmektedir (Shen, ve ark., 2017; Scully, ve ark., 2020).

Son yıllarda tıbbın birçok alanında olduğu gibi infertilite tedavisinde de ek tedavi (add-on) uygulamaları kapsamında trombositten zengin plazma uygulamalarına dair deneysel ve klinik çalışmalar mevcuttur. Trombositler (plateletler), pıhtılaşmadan sorumlu küçük, çekirdek içermeyen hücrelerdir. Alfa, yoğun ve lizozomal granüller olarak tanımlanan organellere sahiptir. Alfa granüller

zimojen formda büyüme faktörlerini, yoğun granüller serotonin, ADP, ATP, GDP, GTP, histamin, kalsiyum, magnezyum gibi molekülleri içerir. Granül içerikleri trombositlerin aktivasyonu ile salınır. Bu aktivasyon trombin, kollajen, ADP, tromboksanlar, serotonin ve daha birçok agonist tarafından gerçekleşir (Lopez-Vilchez ve ark., 2009; Li ve ark., 2011; Wraith ve ark., 2013; Shen ve ark., 2017). Trombositten (platelet) zengin plazma (PRP) flebotomi (venden kan alma işlemi) yoluyla sitrat veya EDTA bazlı bir antikoagülan içeren tüpe alınan kandan izole edilir. Santrifüj sonrası kırmızı kan hücreleri ile bağışıklık hücrelerinin uzaklaştırılması sonucunda plazma içinde yüksek konsantrasyonda trombosit elde edilir. Trombosit içeriğine aktivatör (trombin, kalsiyum, ADP, kollajen) ilavesi ile PRP elde edilir. Ayrıca trombosit sayısını standardize eden ticari PRP kitleri de mevcuttur. PRP rejeneratif tıpta geniş kullanım alanına sahiptir. Kas-iskelet sistemi uygulamaları (Scully ve ark., 2019) oral-maksillofasial uygulamaları (Xu ve ark., 2020) ve osteoartrit (Evans ve ark., 2020) üzerinde PRP'nin pozitif etkisi raporlanmıştır.

Literatürde erkek üreme sisteminde hücre-doku ve organ düzeyinde yapılan deneysel çalışmalarda PRP'nin toksisite modellerindeki iyileştirici etkisini değerlendiren ve sperm kriyoprezervasyonu öncesi PRP uygulamasına dair az sayıda çalışma mevcuttur (Dehghani ve ark., 2019; Sayed ve ark., 2021; Alcaay ve ark., 2021). Busulfanla oluşturulmuş sıçan toksisite modelinde intratestiküler PRP uygulamasının etkinliğini değerlendiren bir çalışmada sperm parametreleri, testis volümü, seminifer tübüllerde Sertoli ve Leydig hücrelerinin, spermatogenik hücrelerin sayısında artış raporlanmıştır (Bader ve ark., 2020). Sayed ve arkadaşları (2021) (Yan ve ark., 2021) kemoterapotik ajan olan metotreksat vererek oluşturdukları sıçan testis toksisite modelinde selenyum ve PRP'nin proapoptotik/anti-apoptotik ve hücrel rejenerasyon aktivitelerini karşılaştırmışlar. PRP'nin metotreksat toksisitesini azalttığı, bu etkinin besin taksiyesi olarak verilen selenyumdan daha yüksek olduğu, PRP'nin iyileştirici etkisini rejeneratif genleri, antiapoptotik belirteci (Bcl-2) ve antioksidan belirteci (eNos) güçlendirerek yaptığını raporlamışlar. İnsan sperm hücresi üzerine yapılan çalışmalarda fresh hücrelerin PRP içinde inkübasyonunun sperm motilitesini, viabilitesini artırdığı, DNA fragmentasyonunu ve vakuolizasyonu azalttığı, özellikle H₂O₂ ile indüklenmiş

oksidatif stres ortamında PRP'nin bu parametrelerdeki iyileştirici etkisinin daha da belirgin olduğu bildirilmiştir (Yan ve ark., 2021). Yapılan çalışmalarda farklı PRP konsantrasyonları çalışılmış ve farklı sperm parametrelerine etkisi karşılaştırılmıştır. Literatürde sperm kriyoprezervasyonunda PRP içinde inkübasyonun dondurma-çözme sonrası sperm kalitesine etkisini değerlendiren bir çalışma vardır (Yan ve ark., 2021). Yapılan çalışmalar kriyoprotektan içeren solüsyonlar içerisinde yavaş dondurma veya vitrifikasyon uygulanacak olan numunelere farklı PRP konsantrasyonları içinde inkübasyon uygulamasının karşılaştırmalı olarak çözme sonrası sperm parametrelerine etkisine yönelik çalışmalardır. Alcay ve arkadaşları (2021) sığır sperminin yavaş dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyonunda kriyoprotektan içeren solüsyon kullanmışlar (Alcay ve ark., 2021). Dondurma öncesi 0.5×10^7 , 1×10^7 ve 2×10^7 /ml konsantrasyonda trombosit içeren PRP içerisinde inkübasyonun sperm motilitesi, membran bütünlüğü, akrozomal bütünlük, mitokondriyal zar potansiyeli, DNA bütünlüğü ve malondialdehit konsantrasyonlarına etkisini değerlendirmişler. Çalışmalarının sonucunda 2×10^7 /ml hücre içeren PRP'nin daha etkin olduğunu raporlamışlardır. Literatürde insan sperminin vitrifikasyonunda PRP'nin iyileştirici etkisini değerlendiren tek çalışmada Yan ve arkadaşları (2021) (Yan ve ark., 2021) otolog PRP uygulamasının donmuş-çözülmüş insan sperminin kalitesi üzerindeki etkisini tanımlamayı amaçlamışlar. Farklı konsantrasyonlarda PRP'nin sperm motilitesi, viabilitesi, membran bütünlüğü, DNA fragmentasyon indeksi, serbest oksijen radikalleri seviyesi ve mitokondriyal membran potansiyeline etkisini karşılaştırdıklarında %5 konsantrasyonda PRP'nin motilite, viabilite ve membran bütünlüğünü arttırdığını bildirmişlerdir. Mevcut çalışmalarda spermin fertilizasyon kapasitesine yönelik değerlendirme yapılmamış, kriyoprotektan içeren solüsyonlarla dondurma-çözme protokollerinde PRP'nin etkinliği değerlendirilmiştir.

Erkek infertilitesinde PRP'nin iyileştirici etkisi konusunda bir ortak görüş oluşmamıştır ve bu nedenle ek tedaviler kapsamında değerlendirilmektedir. Sperm kriyoprezervasyonunda PRP'nin etkinliğine dair çalışmaların çoğunun deneysel olması, kullanılan dondurma solüsyonu ve protokollerinin farklı olması, PRP uygulama periyodu, süresi ve konsantrasyonundaki değişiklikler nedeniyle rutin kullanımda PRP'nin etkinliği konusunda belirsizlik devam etmektedir.

2.9.Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada ‘üremeye yardımcı tedavi yaklaşımlarından biri olarak gerçekleştirilen üreme potansiyelini koruma yaklaşımları kapsamında uygulanan sperm kriyoprezervasyonunda; sperm viabilitesi, hareket kabiliyeti ve fertilizasyon potansiyeli açısından optimum sonuç veren protokolü belirlemek’ amacıyla, normozoospermik erkeklerden alınan ejakulat örneklerinde taze (fresh) sperm hücrelerinin PRP içinde inkübasyonunun sperm viabilitesine, motilitesine, fertilizasyon kapasitesine etkisinin değerlendirilmesi; sperm dondurma protokolünde kullanılan 2 farklı solüsyonun (kriyoprotektan içermeyen ve kriyoprotektan içeren solüsyon) çözme sonrasında sperm viabilitesine, motilitesine ve fertilizasyon kapasitesine etkilerinin karşılaştırılması; dondurma protokolü öncesinde sperm hücrelerinin otolog PRP solüsyonunda inkübasyonunun çözme sonrası hücre viabilitesine, motilite oranına ve fertilizasyon potansiyeline etkisinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Hasta Seçimi

Çalışmamız Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi (BUÜTF) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-2111.05.2022 tarih ve 2022-10/27 karar nolu onayı ile Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Bebek Merkezi Laboratuvarlarında ve Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

BUÜTF Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezine spermiyogram analizi için başvuran ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen kriterlere göre normal semen parametrelerine (sperm volümü 1.4 ml ve üzeri, konsantrasyonunu 15 milyon/ml ve üzeri, motilitesi %42 ve üzeri) sahip 20 hasta çalışmaya dahil edilmiştir .

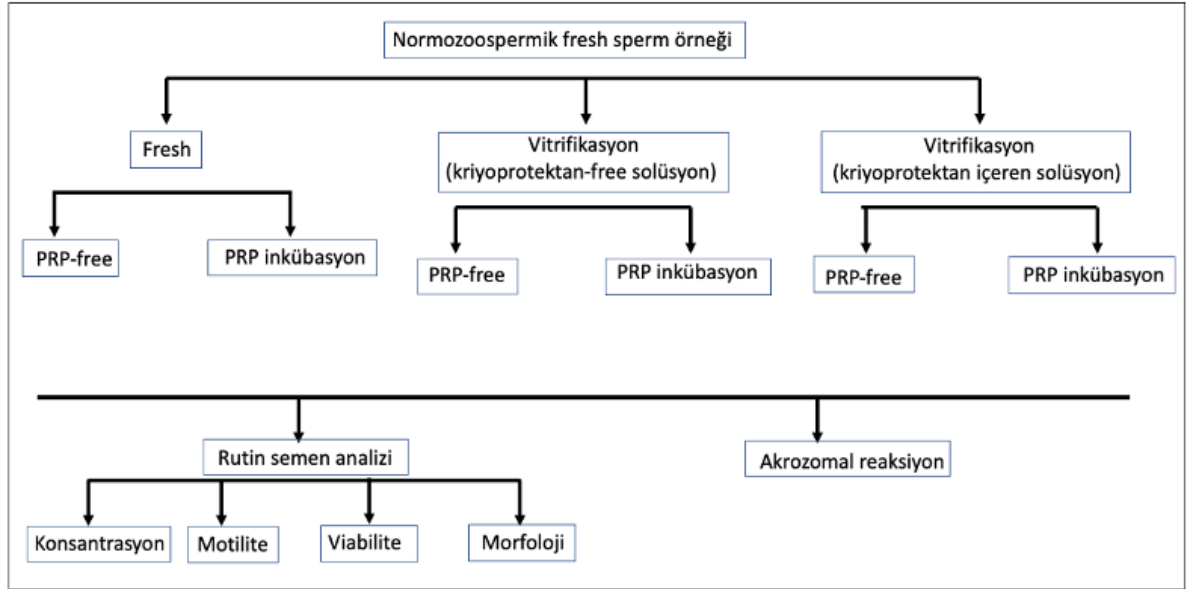
3.2.Semen Örneklerinin Eldesi

Hastanın onayı alınarak onam formu imzalandıktan sonra mastürbasyon yöntemi ile ejakulat örneği toplandı. Ejakulat örnekleri 37°C’de inkübatörde 30-45 dk lik efaksiyon için bekletildi. Rutin spermiyogram analizi kapsamında volüm, konsantrasyon, sperm motilite yüzdesi değerlendirildikten ve morfolojik analiz için yayma preparat hazırlandıktan sonra kalan ejakulat örneği dansite gradient yıkama yöntemi ile yıkandı.

3.3.Çalışma Grupları

Mastürbasyon yolu ile 20 olgudan elde edilen normal semen parametrelerine sahip (normozoospermik) ejakulat örneği yıkama sonrası 3 alt gruba ayrıldı. Taze (fresh) ejakulat örneği, kriyoprotektan-free solüsyonda vitrifikasyon uygulanan ejakulat örneği ve kriyoprotektan içeren solüsyonda vitrifikasyon uygulanan ejakulat örneği olmak üzere ayrılan sperm süspansiyonlarının herbiri ayrıca kendi içinde 2 alt gruba ayrıldı. Vitrifikasyon öncesinde, alt grupların birine herhangi bir ekleme yapılmadan diğerine ise eşit konsantrasyonda otolog PRP eklendi. Taze ve dondurulacak tüm gruplardaki ejakulat örnekleri 2 saat inkübatörde bekletildi. Ardından vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan numuneler sıvı azotta 1 hafta

depolandı. Numunelerin çözme işlemi sonrasında sperm viabilite ve motilite yüzdeleri, morfolojik ve akrozomal reaksiyon analizi yapıldı (Şekil 15).



Şekil 15: Hasta gruplarının dizaynı

Yıkama sonrası sperm solüsyonu (SS)

Sham Grubu: Sperm solüsyonu (SS); yıkanan sperm numunesinden 200µl alındı ve 37°C’de inkübatörde 2 saat bekletildikten sonra değerlendirmeler yapıldı.

Deney Grubu 1: SS+PRP; yıkanan sperm numunesinden 200µl alındı ve numuneye eşit volümde %2 konsantrasyonda otolog PRP örneği eklenerek 37°C’de inkübatörde 2 saat bekletildikten sonra değerlendirmeler yapıldı.

Deney Grubu 2: SS-kriyofree (400µl+400µl) vitrifikasyonu; SS solüsyonu aynı volümde kriyoprotektan içermeyen (kriyofree) vitrifikasyon solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sıvı azota alındı ve bir hafta sıvı azotta depolama sonrasında çözülerek değerlendirmeler yapıldı.

Deney Grubu 3: SP+PRP-kriyofree (400µl+400µl) vitrifikasyonu; SS solüsyonundan 200µl alındı, eşit volümde %2 konsantrasyonda otolog PRP örneği eklenerek 37°C’de inkübatörde bekletildikten sonra aynı volümde (400µl) kriyoprotektan içermeyen vitrifikasyon solüsyonu ile karıştırıldı ve sıvı azota alındı. Bir hafta sıvı azotta depolama sonrasında çözülerek değerlendirmeler yapıldı.

Deney Grubu 4: SS-kriyo (400µl+400µl) vitrifikasyonu; SS solüsyonu aynı volümde kriyoprotektan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sıvı azota alındı ve bir hafta sıvı azotta depolama sonrasında çözülerek değerlendirmeler yapıldı.

Deney Grubu 5: SP+PRP-kriyo (400µl+400µl) vitrifikasyonu; SS solüsyonundan 200µl alındı, eşit volümde %2 konsantrasyonda otolog PRP örneği eklenerek 37°C’de inkübatörde bekletildikten sonra aynı volümde (400µl) kriyoprotektan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile karıştırıldı ve sıvı azota alındı. Bir hafta sıvı azotta depolama sonrasında çözülerek değerlendirmeler yapıldı.

3.4. PRP Solüsyonunun Hazırlanması ve Standardizasyonu

Çalışmaya katılan hastalardan ejakulat örneğinin alındığı gün intravenöz olarak 10ml kan örneği alındı. Elde edilen kan Sitrat veya EDTA bazlı bir antikoagülan içeren tüpe alınıp, belirlenmiş bir trombosit konsantrasyonu sağlayabilen ticari kit aracılığı ile PRP elde edildi (T-LAB PRP Kit). Üretici firmanın kullanım talimatlarına göre tüpler 1150 G’de 4 dakika santrifüj edildi. Daha sonra santrifüj tüpüne 16 G’lik bir enjektör yardımıyla girilerek buffycoat tabakasına kadar ilerletildi. Enjektör ucu döndürülerek buffycoat tabakası aspire edilip, steril süspansiyon tüpüne aktarıldı (Isachenko ve ark.,2012). Elde edilen PRP trombosit sayım cihazında sayılarak kültür medyumuna ilüe edildi ve çalışma gruplarındaki (Deney Grubu 1, Deney Grubu 3 ve Deney Grubu 5) yıkama sonrası sperm solüsyonlarına eklendi.

3.5. Dansite- Gradient Yıkama Yöntemi ile Sperm Hazırlığı

Likefaksiyon sonrası sperm konsantrasyonu ve motilitesi, viabilitesine bakılan örnekler dansite-gradient yöntemi ile yıkama işlemine tabi tutuldu.

1. Yıkama işleminde kullanılacak olan 15 ml’lik konik falkon tüpüne 1 ml %80’lik gradient solüsyonu ve üzerine %40’lık gradient solüsyonu birbirine karışmayacak şekilde yavaşça eklendi.
2. Gradient solüsyonlarının üzerine 1 ml likefiye olmuş ve pipetlenerek homojen dağılımı sağlanmış ejakulat örneği yavaşça eklendi.
3. Konik tüp 500 G’de 15dk santrifüj edildi, supernatant atıldı.

4. Pelletin üzerine 3 ml yıkama mediumu (VITROLIFE-GIVF) eklenerek pipetaj yapıldı ve tekrar 300 G'de 10 dk santrifüj edildi.
5. Supernatan atıldıktan sonra pelletin üzerine 1,5 ml sperm yıkama mediumu (VITROLIFE-GIVF) eklendi ve plastik patör pipeti ile pipetaj yapılarak sperm hücrelerinin solüsyonda homojen dağılımı sağlandı (Kruger, 1988).

Çalışmaya yıkama sonrası konsantrasyonu 50 milyon/ml ve üzerinde olan numuneler dahil edildi.

3.6.Dondurma- Çözme Protokolü

Semen numunelerinin dansite-gradient yöntemi ile yıkama sonrasında gerçekleştirilen dondurma protokolünde vitrifikasyon yöntemi kullanıldı. Sperm örnekleri (PRP ile inkübe edilen ve edilmeyen) farklı iki dondurma solüsyonu içinde (kriyoprotektan içeren ve içermeyen) vitrifiye edildi. Kriyoprotektan içeren solüsyon olarak ticari kit kullanıldı (SpermFreeze Solution-VITROLIFE). Kriyoprotektan içermeyen solüsyon olarak 0.5M süktroz solüsyonu (HTF+%1 HSA içerisinde) kullanıldı (Isachenko ve ark., 2011; Agha-Rahimi ve ark., 2016). Sperm solüsyonu ve oda sıcaklığına getirilmiş dondurma solüsyonu eşit volümlerde (400µl+400µl) olacak şekilde karıştırıldı ve kriyovial içine alınan homojenat+4°C'de 15dk bekletildikten sonra (Wang ve ark., 2021) 30 dk sıvı azot buharına maruz bırakıldı. Sıvı azot buharında bekletmenin ardından örnekler -196°C sıvı azot içine konuldu ve 1 hafta süreyle sıvı azotta depolandı.

Deney Grubu 2'de; SS solüsyonundan alınan 400µl numune 2 saat %5 CO₂ ve %5 O₂ içeren %99 nem ortamı sağlayan inkübatörde bekletildi. Ardından aynı volümde 0.5M süktroz solüsyonu (HTF+%1 HSA içerisinde) eklenerek (Isachenko ve ark., 2011; Agha-Rahimi ve ark., 2016) kriyovial içine alındı. +4°C'de 15 dk bekletildikten sonra 30 dk sıvı azot buharına maruz bırakıldı. Sıvı azot buharında bırakılmalarını takiben örnekler -196°C sıvı azot içine bırakıldı ve 1 hafta süreyle sıvı azotta depolandı.

Deney Grubu 3'te; 400µl SS içeren tüpe aynı volümde %2 konsantrasyonda PRP solüsyonu eklenerek 2 saat %5 CO₂ ve %5 O₂ içeren %99 nem ortamı sağlayan inkübatörde bekletildi. PRP içinde inkübasyon sonrası 400µl 0.5M süktroz solüsyonu

(HTF+%1 HSA içerisinde) eklenerek kriyovial içine alındı.+4°C’de 15 dk bekletildikten sonra 30dk sıvı azot buharına maruz bırakıldı. Sıvı azot buharında bırakılmalarını takiben örnekler -196°C sıvı azot içine bırakıldı ve 1 hafta süreyle sıvı azotta depolandı.

Deney Grubu 4’de; SS solüsyonundan alınan 400µl numune 2 saat %5 CO₂ ve %5 O₂ içeren %99 nem ortamı sağlayan inkübatörde bekletildi. Ardından aynı volümde kriyoprotektan içeren solüsyon olarak ticari kit kullanılarak (SpermFreeze Solution-VITROLIFE)+4°C’de 15 dk bekletildikten sonra 30dk sıvı azot buharına maruz bırakıldı. Sıvı azot buharında bırakılmalarını takiben örnekler -196°C sıvı azot içine bırakıldı ve 1 hafta süreyle sıvı azotta depolandı.

Deney grubu 5’te; 400µl SS içeren tüpe aynı volümde %2 konsantrasyonda PRP solüsyonu eklenerek 2 saat %5 CO₂ ve %5 O₂ içeren %99 nem ortamı sağlayan inkübatörde bekletildi. PRP içinde inkübasyon sonrası 400µl ticari kit (SpermFreeze Solution-VITROLIFE) eklenerek kriyovial içine alındı. +4°C’de 15 dk bekletildikten sonra 30dk sıvı azot buharına maruz bırakıldı. Sıvı azot buharında bırakılmalarını takiben örnekler -196°C sıvı azot içine bırakıldı ve 1 hafta süreyle sıvı azotta depolandı.

Dondurulmuş örneklerin çözme aşamasında kriyovialsıvı azot tankından çıkarılarak oda sıcaklığında bekletildi. Sıvı faza geçen örnekler inkübatörde bekletilerek 37°C’ye ısıtılmış 3 ml sperm yıkama solüsyonu eklendi. Elde edilen homojenat 300G’de 10 dksantrifüjlendi ve ardından supernatant atıldı. Pellet üzerine 0.5 ml sperm yıkama solüsyonu eklenip pipetlendikten sonra değerlendirmeye tabi tutuldu.

3.7. Viabilite Değerlendirmesi

Yıkama sonrası ve çözme protokolünün ardından yapılan viabilite analizi Eozin-Nigrosin boyaması ile gerçekleştirildi. Bu protokol kapsamında:

1. Çözünen örnekten 10 µl alınarak 2 ml tüp içerisine konuldu.
2. Üzerine 20 µl %1’lik Eosin Y eklendi, 15 saniye pipetaj yapılarak homojen hale getirildi.
3. Daha sonra homojenat üzerine 20µl %10 Nigrosin eklenip pipetaj yapıldı.

4. Homojenattan 10 µl alınarak lam üzerine ince yayma yapılarak ve üzeri lamel ile kapatıldı.
5. Preparat hızlı bir şekilde faz kontrast mikroskopunda x100 büyütmede (immersiyon yağı damlatılarak) incelendi. Mikroskopik değerlendirmede iki farklı alanda 200 adet sperm hücresi değerlendirmesi gerçekleştirildi. Bu değerlendirmede viable sperm hücrelerinde, hücre membranı bütünlüğünün korunması nedeniyle boya hücre içine girmediği için sperm başları beyaz veya soluk pembe boyanırken, non-viable sperm hücre başları hücre membran bütünlüğü bozulduğu ve hücre boyayı hücre içine aldığı için kırmızı veya koyu pembe boyanma özelliği ile birbirinden ayırt edildi. Her bir preparat için ortalama viable ve non-viable sperm hücre sayısı tayin edilerek gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldı (WHO, 2021).

3.8. Morfolojik Değerlendirme

Yıkama öncesi ve çözme sonrası tüm gruplara ait semen örneğinden lam üzerine ince yayma yapılarak hazırlandı ve preparat havada kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra Diff-Quik boyası ile boyama yapıldı. Diff-Quik boyası 3 farklı solüsyondan oluşmaktadır:

1. Fiksatif solüsyonu
2. Xanthene solüsyonu
3. Thiazine solüsyonu

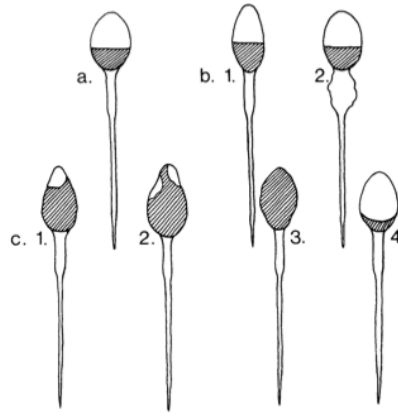
Boyama Protokolü

1. Oda sıcaklığında kurutulmuş yayma preparatı fiksatif solüsyonuna 10 defa (dips) batırılıp çıkarıldı.
2. Yayma preparatı Xanthene solüsyonuna 8 dips batırılıp çıkarıldı.
3. Yayma preparatı Thiazine solüsyonuna 8 dips batırılıp çıkarıldı.
4. Son olarak preparat steril distile su ile 1 dakika yıkanarak fazla boyadan kurtarıldı.

Preparat oda ısısında kurutulup, faz kontrast mikroskopunda x100 büyütme oranı (immersiyon yağı damlatılarak) ile inceleme yapıldı (WHO, 2021).

Sperm hücre morfolojisi tanımlamaları:

1. Düzenli sınırlara sahip ve oval şekilli baş morfolojisinin tanımlanması (4-4,5µm uzunluk, 3 mm genişlik)
2. Baş bölgesinin %40–70'ini akrozom bölgesinin oluşturması
3. Baş bölgesinde sitoplazmik defektler (vakuol) mevcut olmaması
4. Sperm orta parçanın ana eksenine sperm başının ana eksenine aynı hizada olması
5. Ana parçanın uzunluğu boyunca aynı genişlikte olması, orta parçadan ince ve yaklaşık 45 µm uzunlukta olması kriterlerine göre değerlendirildi (Kruger TF.1988) (Şekil 16).



Şekil 16: Normal sperm morfolojisi (a)

Anormal sperm morfolojisi (b1-c4) (baş-boyun-orta parça-akrozom alanomalileri) (WHO 5.baskı, 2010)

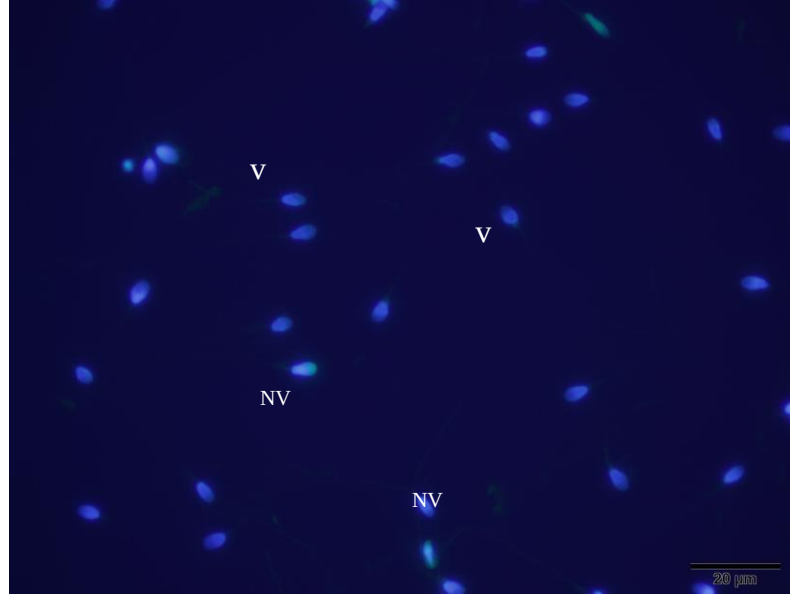
3.9. Akrozom Reaksiyonu Testi

Akrozom reaksiyonu değerlendirmesi, Pisumsativum (pea)-FITC konjugatından elde edilen Lectin akrozomal belirteci kullanılarak yapıldı (Zhu ve ark., 2014; Aizpurua ve ark., 2017). Sperm yıkama protokolü sonrasında elde edilen semen örneği ve dondurulup-çözülen semen numunesi;

1. Her biri 500 µL'lik hacimde olacak şekilde test ve kontrol grubu olarak ikiye ayrılarak numuneler santrifüjlendi, supernatant atıldı.

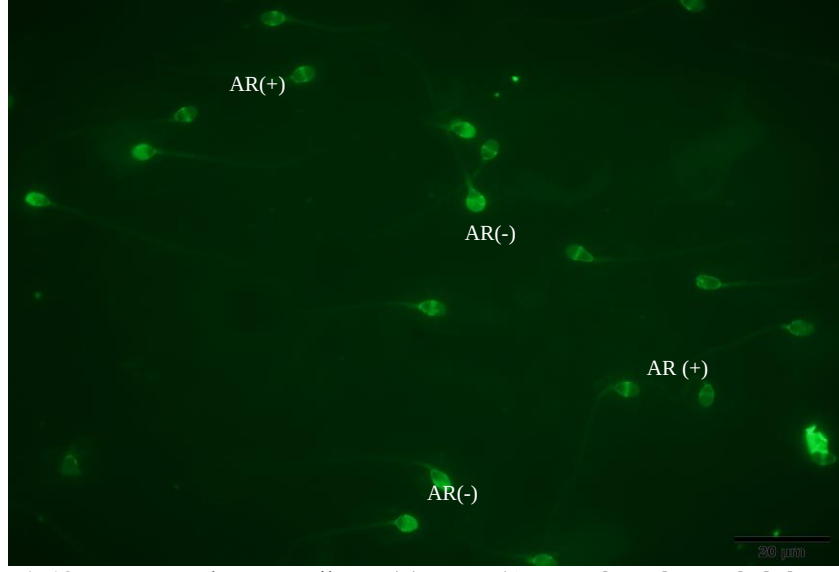
2. Pellet üzerinesperm kapasitasyonunu gerçekleştirmek için %3 albümin (30 mg/mL) içeren 500 µL HTF ortamı eklenerek, karışım inkübatörde 37°C' de 3 saat boyunca inkübe edildi.
3. Test örneğine 10 µL Kalsiyum iyonofor A23187 (10 µM/L), kontrol örneğine ise 10 µL dimetilsülfoksit (%10, DMSO/PBS) solüsyonu eklendi veörnekler 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra test ve kontrol örnekleri 1600 rpm'de 7 dakika santrifüjlenip, süpernatant atıldı.
5. Pelet üzerine 100 µL PBS ve 100 µL Hoechst solüsyonu (2mg/mL) eklenerek karanlıkta 37°C'de inkübatörde 10 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyonunardından1600 rpm'de 7 dakika santrifüjlenip, süpernatantı atıldı ve pelet üzerine 100 µL PBS eklenerek pipetaj yapıldı.
7. Elde edilen homojenat 1600 rpm'de 7 dakika santrifüjlenip, süpernatantı atıldı. Pellet üzerine 100 µL PBS eklenerek pipetaj yapıldı.
8. Elde edilen homojenattan10 µL'lik hacimde soğuk lamlara yayma preparat hazırlandı.
9. Oda sıcaklığında kurutulan yayma preparatları 30 dk soğuk %95'lik etanol içindefiksasyona tabi tutularak, sonrasında oda sıcaklığında kurutuldu.
10. Kurutulan preparatlara, 10 µL FITC-PSA eklenerek karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
11. Fazla işaretlenmeyi engellemek için 10-15dips PBS'de preparatlar yıkanıp oda sıcaklığında kurutuldu. Örnekler fluoresan mikroskopta x100 büyütmede değerlendirildi.

Viable sperm hücrelerinin saptanmasında; Hoechst 33258 boyasının hücre membranından geçememesi nedeniyle sperm başı soluk mavi boyandı. Non-viable sperm hücreleri ise sperm başınaaçık mavi boyanması ile tayin edildi (Agarwal ve ark., 2016) (Şekil 17).



Şekil 17:Hoechst 33258 boyaması ile viabil ve non-viabil sperm hücrelerinin belirlenmesi(V: Viabil sperm; NV: Non-Viabil Sperm)

Akrozom reaksiyonunun değerlendirilmesinde; akrozomal reaksiyonun gerçekleştiği AR(+) sperm hücrelerinde ekvatoryal segmentte akrozom bant şeklinde yeşil renkte boyanma gösterdi. Akrozom reaksiyonu oluşmayan AR (-) sperm hücrelerinde ise sperm başı dağınık yeşil boyanma gösterdi (Şekil 18). Her bir preparat için iki farklı alanda 200 viable sperm hücresi tayin edilip, bu sperm hücrelerinin akrozom reaksiyonu pozitif-negatif olarak değerlendirilmesi yapıldı ve gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.



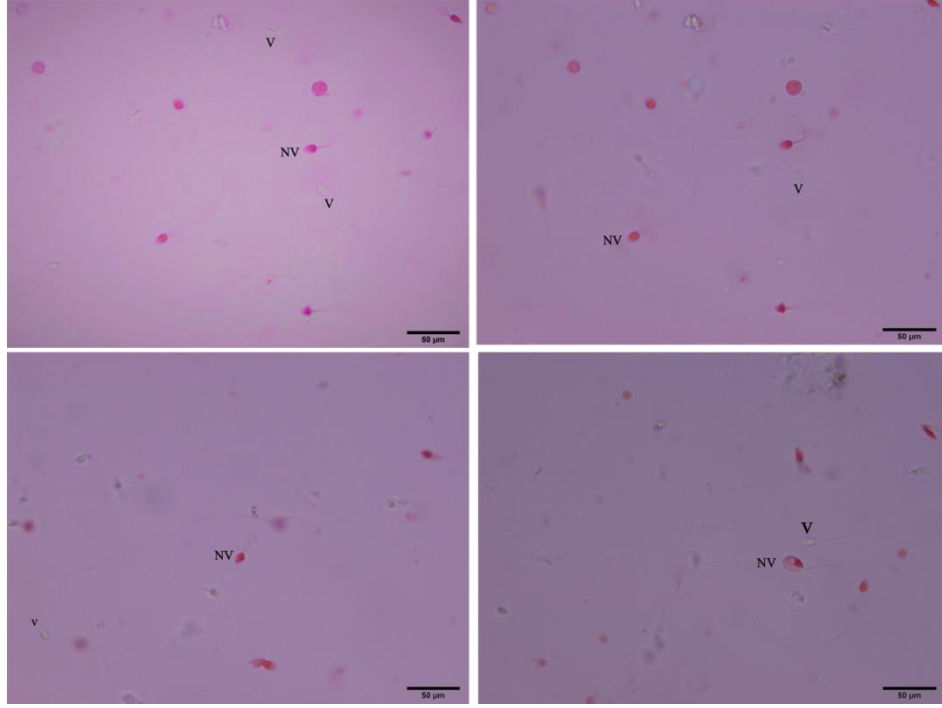
Şekil 18. FITC-PSA boyaması ile AR(+) ve AR(-) sperm hücrelerinin belirlenmesi

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

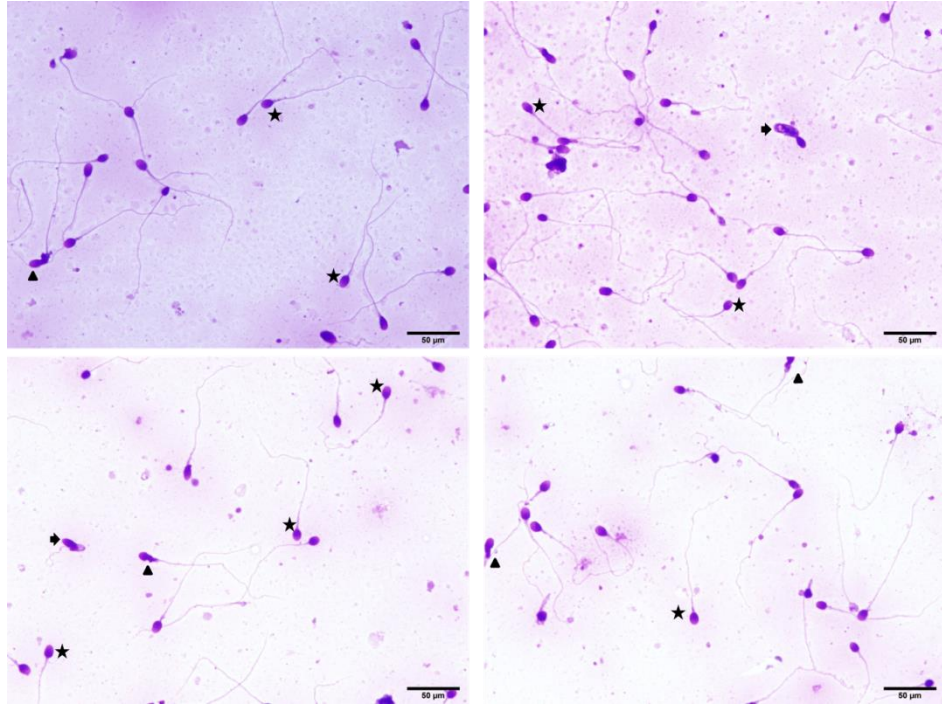
Verilerin analizi; tanımlayıcı istatistikler medyan ve minimum-maksimum (Min-Max) şeklinde verildi. Gruplardaki farklılığın incelenmesinde Wilcoxon analizi yapılmıştır. Çalışmada 0,05'den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi. Analizler SPSS 28.0 ile analiz edildi.

4.BULGULAR

Bu çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarına Ocak 2023 ve Nisan 2023 tarihleri arasında rutin spermiyogram analizi için başvuran, normal semen parametrelerine sahip (normozoospermik) 20 olgudan mastürbasyon yolu ile toplanan ejakulat örneği ile gerçekleştirildi. Ejakulat örnekleri 3 alt gruba ayrıldı. Taze (fresh) ejakulat örneği, kriyoprotektan-free solüsyonda vitrifikasyon uygulanan ejakulat örneği ve kriyoprotektan içeren solüsyonda vitrifikasyon uygulanan ejakulat örneği olmak üzere ayrılan sperm süspansiyonlarının herbiri ayrıca kendi içinde 2 alt gruba ayrıldı. Vitrifikasyon öncesinde, alt grupların birine herhangi bir ekleme yapılmadı, diğerine ise eşit konsantrasyonda otolog PRP eklendi. Taze ve dondurulacak tüm gruplardaki ejakulat örnekleri 2 saat inkübatörde bekletildi. Ardından vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan numuneler sıvı azotta 1 hafta depolandı. Numunelerin çözme işlemi sonrasında sperm viabilite ve motilite yüzdeleri, morfolojik ve akrozomal reaksiyon analizi yapıldı. Resim 19'de viabilite değerlendirmesi amacıyla gerçekleştirilen eozin-nigrosin boyaması sonucunda canlı (viabl) ve cansız (non-viabl) sperm hücrelerin tanımlanmasına yönelik örnekler verildi. Resim 20'de morfolojik analiz için yapılan sperm yayma preparatlarına uygulanan Diff-Quik boyaması sonrası elde edilen mikrograftlar görülmektedir. Sperm baş, boyun ve kuyruk anomalileri değerlendirilerek, normal morfolojili sperm oranı belirlenmiştir.



Resim 19. Eozin-nigrosin boyaması ile sperm viabilite değerlendirilmesi, x100. V (viabl); canlı sperm, NV (non-viabl); cansız sperm.



Resim 20. Diff-Quik boyaması ile sperm morfolojik analizi, x100. (*) normal morfolojili, (ok başı) boyun anomalili, (kısa ok) kuyruk anomalili sperm

4.1.Dansite-Gradient Yöntemi İle Yıkama Sperm Viabilitesini ve Motilite Oranını Arttırdı

Çalışmada yıkama öncesive yıkamanın ardından 2 saat inkübasyon sonrası (Sham grubu-SS) sperm motilite oranlarıistatistiksel karşılaştırması yapıldığında; sham grubu lehine anlamlı farklılık saptandı ($p=0.01$, $p<0.05$) (Tablo 3).

Benzer şekilde yıkama öncesi ve sonrası sperm viabilitesideğerlendirildiğinde; sham grubu lehine istatistiksel açıdan anlamlı farklılıkgörüldü ($p=0,01$, $p<0.05$) (Tablo 3).

Sperm morfolojisi açısından iki grup karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,08$, $p>0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3.Yıkama Öncesi ve Yıkama Sonrası Semen Parametreleri

Sperm Parametresi	Yıkama Öncesi %-(min-max)	Yıkama Sonrası Sham Grubu %-(min-max)	<i>p</i> değeri
Motilite	72.5 (56.0-77.5)	83.0 (74.50-90.50)	0,01*
Viabilite (Eozin-nigrosin)	74.5 (69.0-82.5)	87.5 (80.50-92.0)	0,01*
Morfoloji	2.0-(1.0-3.0)	3.0 (2.0-5.0)	0,08

**Wilcoxon işaret testi yapılmıştır.

4.2. Taze Ejakulatın PRP ile İnkübasyonu Rutin Sperm Parametrelerini Değiştirmedi

Çalışmada yıkama sonrası 2 saat inkübasyona tabi tutulmuş sperm solüsyonu (Sham grubu-SS) ve sperm solüsyonu+ %2 konsantrasyonda otolog PRP karışımının 2 saatlik inkübasyonu sonrası (Grup 1-SS+PRP) sperm motilite yüzdesi ve iki boyama metoduyla (eozin-nigrosin ve Hoechst) viabilite oranları karşılaştırıldığında; gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı görüldü (sırasıyla $p=0,06$, $p=0,17$ ve $p=0.188$, $p>0,05$) (Tablo 4).

Yıkama sonrası 2 saat inkübasyona tabi tutulmuş sperm solüsyonu(Sham grubu-SS) ve sperm solüsyonu +%2 konsantrasyonda otolog PRP karışımının 2 saatlik inkübasyonu sonrası (Grup 1- SS+PRP) sperm morfolojisi değerlendirildiğinde; gruplar arasında istatistiksel anlamda fark saptanmadı ($p=0,79$, $p>0,05$) (Tablo 4).

Tablo4.Sham (SS)ve PRP İnkübasyonu Yapılan Grup 1'in (SS+PRP) Motilite, Viabilite ve MorfolojiOranları

Sperm Parametresi	Sham Grup(SS)	Grup 1(SS+PRP)	p değeri
	%-(min-max)	%-(min-max)	
Motilite	83.0 (74.5-90.5)	87.0 (82.0-91.5)	0,06
Viabilite (Eozin-nigrosin)	87.5 (80.5-92.0)	90.0 (87.0-94.0)	0,17
Viabilite (Hoechst)	88.5 (80.75-93.0)	90.0 (86.46-94.0)	0,188
Morfoloji	3.0 -(2.0-5.0)	3.0- (2.0-5.0)	0.79

**Wilcoxon işaret testi yapılmıştır.

4.3. Vitrifikasyon Sperm Viabilitesini Düşürdü

Çalışmada yıkama sonrası 2 saat inkübasyona tabi tutulan sperm solüsyonu (Sham grubu-SS) ile kriyoprotektan içermeyen (0.5M süktroz solüsyonu; HTF+%1 HSA içerisinde) (Grup 2; SS-kriyo-free) ve kriyoprotektan içeren (Grup 4; SS-kriyo) solüsyonlarla vitrifikasyon uygulanan sperm numunelerieozin-nigrosin ve Hoechst fluoressan boyaması ile viabilite açısından değerlendirilip karşılaştırıldığında;her iki vitrifikasyon protokolünde de sham grubuna oranla sperm viabilitesinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<.001$ ve $p<.001$, $p<0,05$). (Tablo 5)

Tablo5.Sham (SS)ve kriyoprotektan-free (kriyo-free) solüsyonlarla vitrifiye edilen gruplarda (Grup 2; SS-kriyo free)viabilite oranları

Viabilite testi	Sham Grup(SS)	Grup 2(SS-kriyo free)	p değeri
	%-(min-max)	%-(min-max)	
Eozin-nigrosin	87.5 (80.5-92.0)	32.0 (27.0-37.0)	<.001*
Hoechst	88.5 (80.75-93.0)	32.0 (24.99-36.0)	<.001*

**Wilcoxon işaret testi yapılmıştır.

Tablo 6.Sham (SS)ve kriyoprotektan içeren (kriyo) solüsyonlarla vitrifiye edilen gruplarda (Grup 4; SS-kriyo)viabilite oranları

Viabilite testi	Sham Grup(SS)	Grup 4(SS-kriyo free)	p değeri
	%-(min-max)	%-(min-max)	
Eozin-nigrosin	87.5 (80.5-92.0)	32.0 (27.0-37.0)	<.001*
Hoechst	88.5 (80.75-93.0)	62.5 (52.0-72.0)	<.001*

**Wilcoxon işaret testi yapılmıştır.

4.4. Kriyoprotektan İçeren Solüsyon Sperm Parametrelerini Korudu

Çalışmada yıkama sonrası kriyoprotektan içermeyen (0.5M süktroz solüsyonu; HTF+%1 HSA içerisinde) (Grup 2; SS-kriyo-free) ve kriyoprotektan içeren (Grup 4; SS-kriyo) solüsyonlarla vitrifikasyon uygulanan sperm numuneleri eozin-nigrosin ve Hoechst fluoresan boyaması ile viabilite açısından değerlendirilip karşılaştırıldığında: kriyoprotektan içeren grupta sperm viabilitesi anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü (Tablo 7).

Tablo 7.Kriyoprotektan-free (kriyo-free) ve kriyoprotektan içeren (kriyo) solüsyonlarla vitrifiye edilen gruplarda (Grup 2; Grup 4)viabilite oranları

Viabilite testi	Grup 2 (SS-kriyo free) %-(min-max)	Grup 4 (SS-kriyo free) %-(min-max)	p değeri
Eozin-nigrosin	32.0 (27.0-37.0)	67.50(54.00-75.00)	<.001*
Hoechst	32.00(24.99-36.00)	62.5 (52.0-72.0)	<.001*

**Wilcoxon işaret testi yapılmıştır.

4.5.Kriyoprotektan İçermeyen Solüsyonlarla Vitrifikasyonda PRP Rutin Sperm Parametrelerini Değiştirmedi

Çalışmada 0.5M süktroz solüsyonu (HTF+%1 HSA içerisinde) (kriyoprotektan-free solüsyon) ile vitrifikasyon uygulanan gruplarda (Grup 2 ve Grup 3);vitrifikasyon öncesi herhangi bir ekleme yapılmadan 2 saat inkübatörde bekletilen sperm numunesi (Grup 2; SS-kriyo-free) ve %2 konsantrasyonda otolog PRP eklenerek inkübe edilen sperm numunesi (Grup 3; SS+PRP-kriyo free) dondurulup çözüldükten sonra sperm parametreleri açısından karşılaştırıldığında; sperm motilite oranında ve morfolojisindeistatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,06$; $p=0.51$; $p>0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Kriyoprotektan-free (kriyo-free) solüsyonlarla vitrifiye edilen gruplarda (Grup 2; SS-kriyo free ve Grup 3; SS+PRP-kriyo free)Sperm Motilite, Viabilite ve Morfoloji Oranları

Sperm Parametresi	Grup 2	Grup 3	p değeri
	(SS-kriyo free)	(SS+PRP-kriyo free)	
	%-(min-max)	%-(min-max)	
Motilite	8.50 (3.0-12.0)	7.0 (3.50-10.50)	0.57
Viabilite (Eozin-nigrosin)	27.0 (27.0-37.0)	33.0 (28.0-39.0)	0,04*
Viabilite (Hoechst)	32.0 (24.99-36.0)	31.0 (24.96-39.75)	0.717
Morfoloji	1.0- (1.0-3.0)	1.0- (1.0-2.0)	0.51

**Wilcoxon işaret testi yapılmıştır.

Grup 2 ve Grup 3'e ait numunelerin eozin-nigrosin ve Hoechst boyamalarıyla sperm viabilitesi gruplar arasında karşılaştırıldığında; eozin-nigrosin boyaması sonucuna göre vitrifikasyon öncesi herhangi bir ekleme yapılmadan 2 saat inkübatörde inkübe edilen sperm numunesi (Grup 2; SS-kriyo-free) ve %2 konsantrasyonda otolog PRP eklenerek inkübe edilen sperm numunelerinde (Grup 3; SS-PRP-kriyo-free) dondurulup çözöldükten sonra sırasıyla %27 (27.0-37.0) ve %33 (28.0-39.0) oranında istatistiksel olarak anlamlı viabilite oranları saptandı ($p=0,04$; $p<0,05$)(Tablo 7). Aynı grupların Hoechst boyaması sonuçlarında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ($p=0.717$; $p>0,05$) (Tablo 8).

4.6.Kriyoprotektan Solüsyonuyla Vitrifikasyonda PRP Rutin Sperm Parametrelerini Değiştirmedir

Çalışmada kriyoprotektan içeren solüsyonda (VITROLIFE) vitrifikasyon uygulanan gruplarda (Grup 4 ve Grup 5); vitrifikasyon öncesi herhangi bir ekleme yapılmadan 2 saat inkübatörde bekletilen sperm numunesi (Grup 2;SS-kriyo) ve %2 konsantrasyonda otolog PRP eklenerek inkübe edilen sperm numunesi (Grup 3; SS+PRP-kriyo) çözöldükten sonra karşılaştırıldığında sperm motilite yüzdesi, eozin-nigrosin ve Hoechst fluoresan boyaması ile elde edilen viabilite oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,62$; $p=0.15$; $p=0.504$; $p>0,05$) (Tablo9).

Tablo 9.Kriyoprotektan içeren solüsyonlarla vitrifiye edilen gruplarda (Grup 4 ve Grup 5)Sperm Motilite, Viabilite ve Morfoloji Oranları

Sperm Parametresi	Grup 4 (SS-kriyo) %-(min-max)	Grup 3 (SS+PRP-kriyo) %-(min-max)	<i>p</i> değeri
Motilite	44.50 (27.50-54.50)	45.0 (34.50-54.0)	0.62
Viabilite (Eozin-nigrosin)	67.50 (54.0-75.0)	67.50 (62.50-71.0)	0.15
Viabilite (Hoechst)	62.5 (52.0-72.0)	67.5-71.0)	0.504
Morfoloji	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	0.93

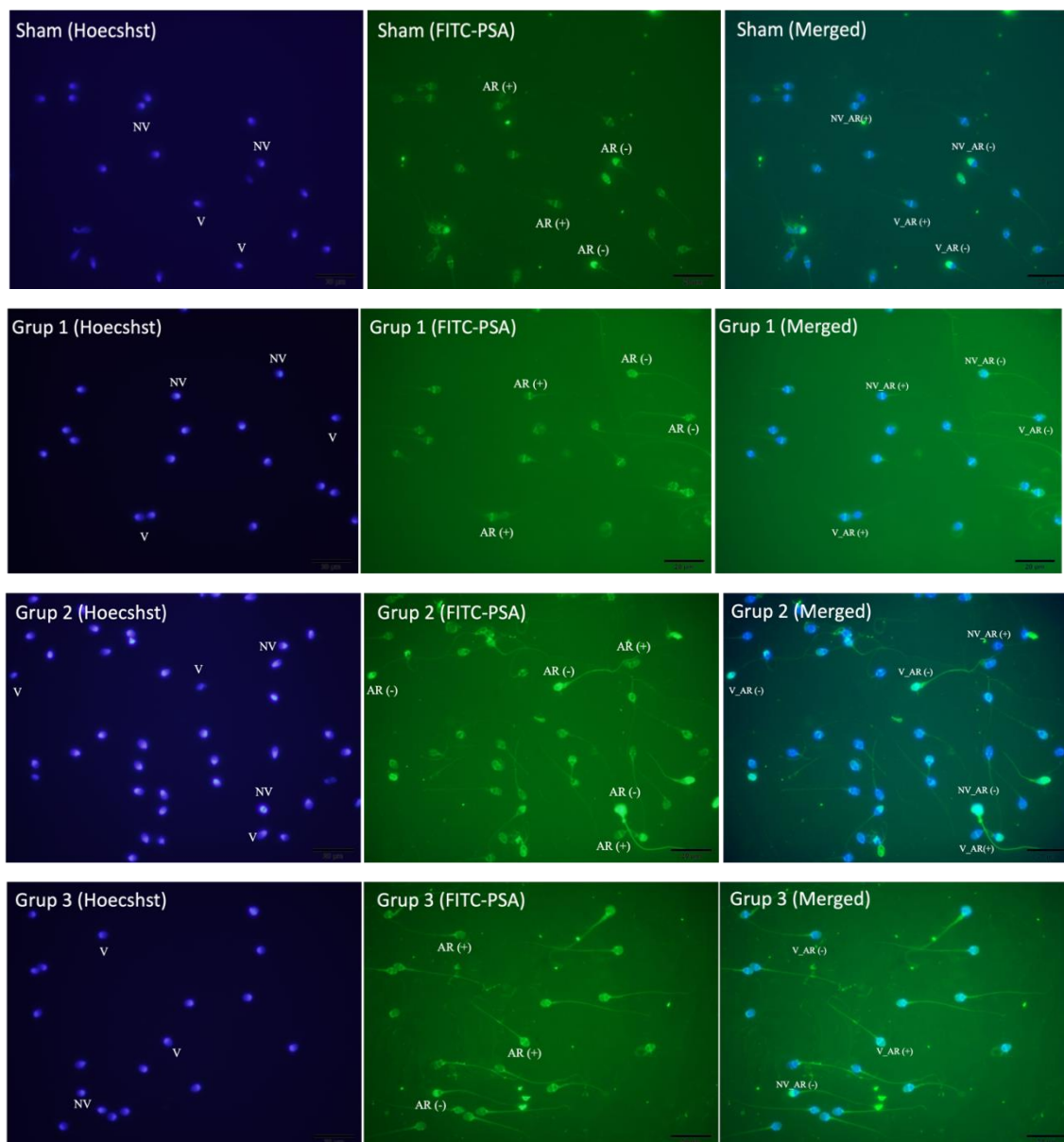
**Wilcoxon işaret testi yapılmıştır.

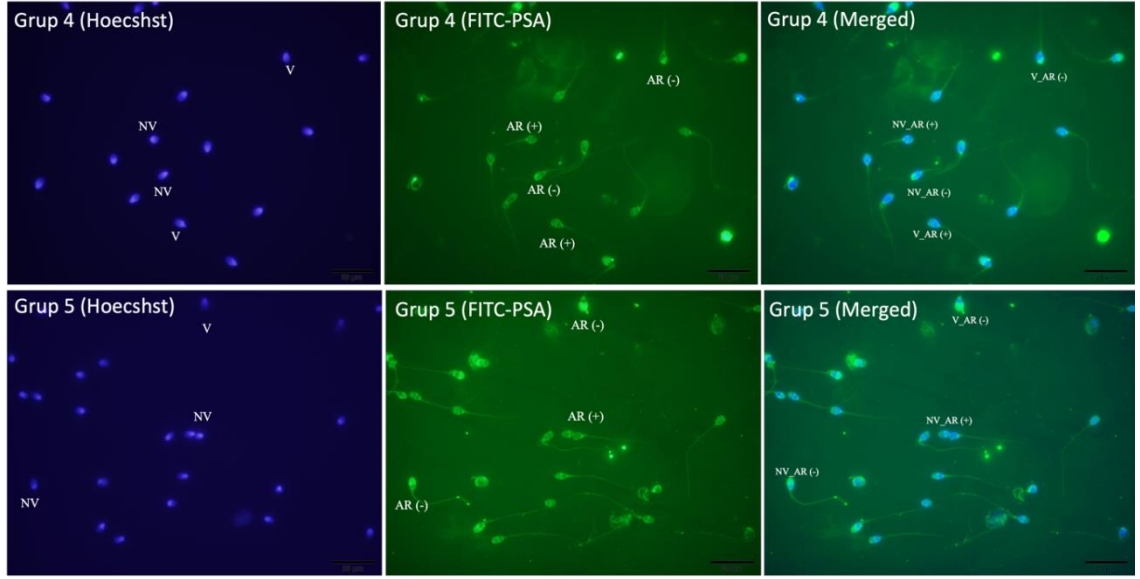
Çalışmada vitrifikasyon öncesi herhangi bir ekleme yapılmadan 2 saat inkübatörde inkübe edilen sperm numunesi (Grup 2; SS-kriyo) ve %2 konsantrasyonda otolog PRP eklenerek inkübe edilen sperm numunesi (Grup 3;SS+PRP-kriyo) çözüldükten sonra karşılaştırıldığında; sperm motilitesinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği saptandı ($p=0,93;p>0,05$) (Tablo 9).

4.7. Akrozom Reaksiyonu Analizi Sonuçları

Çalışma gruplarında Hoechst boyaması ile saptanan canlı sperm hücrelerinde indüklenmiş akrozomal reaksiyonun oranını belirlemek için kalsiyum iyonofor ile indüklenmiş akrozomal reaksiyon oranından spontan akrozomal reaksiyon oranı çıkarılarak ARIC skorları hesaplandı.

Pisum sativum (pea)-FITC konjugatından elde edilen Lectin akrozomal belirteci kullanılarak yapılan akrozom reaksiyonu değerlendirmesinde (Abou-Haila ve ark., 2000; Agarwal ve ark., 2016); sperm yıkama protokolü sonrasında elde edilen taze semen örneklerinde (Sham grubu ve Grup 1) ve dondurulup-çözülen semen örneklerinde (Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5) canlı (Hoechst negatif-açık mavi) sperm hücrelerinin spontan ve indüklenmiş akrozomal reaksiyon değerleri, yüzdeleri ve ARIC skorları Tablo 10, 11, 12, 13, 14 ve 15’de verilmiştir (Resim 21).





Resim 21. Çalışma gruplarında viabilite (Hoechst) ve akrozomal reaksiyon analizi (FITC-PSA) değerlendirmesi. Hoechst boyası hücre içine geçen spermiler ölü (mavi), boyanın hücre membranından geçmediği hücreler canlı (soluk mavi) olarak değerlendirildi. Canlı olarak tanımlanan spermelerde akrozomal kep FITC-PSA ile yoğun boyanan hücreler akrozomal reaksiyon negatif, boyanma spermin ekvatoryal bölgesinde çizgi şeklinde gözleniyorsa akrozomal reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 10. Sham grubunda (SS) sperm numunelerinin canlı hücrelerde spontan ve indüklenmiş akrozomal reaksiyon değerleri, yüzdeleri ve ARIC skorları

Hasta no	Sham sAR(-)	Sham sAR(-) %	Sham sAR(+)	Sham sAR(+) %	Sham iAR(-)	Sham iAR(-) %	Sham iAR(+)	Sham iAR(+) %	Sham ARIC SCORE
1	170	98,84	2	1,16	169	97,13	5	2,87	1,71
2	186	98,94	2	1,06	182	97,33	5	2,67	1,61
3	129	98,47	2	1,53	125	96,15	5	3,85	2,32
4	181	98,37	3	1,63	178	96,22	7	3,78	2,15
5	165	95,93	7	4,07	156	91,23	15	8,77	4,70
6	158	98,75	2	1,25	156	96,89	5	3,11	1,86
7	153	96,23	6	3,77	148	93,67	10	6,33	2,56
8	177	98,88	2	1,12	173	96,65	6	3,35	2,23
9	144	96,64	5	3,36	141	94,00	9	6,00	2,64
10	191	98,96	2	1,04	189	97,93	4	2,07	1,04
11	162	98,78	2	1,22	160	96,39	6	3,61	2,39
12	182	99,45	1	0,55	177	97,25	5	2,75	2,20
13	178	98,34	3	1,66	175	96,15	7	3,85	2,19
14	160	98,16	3	1,84	156	95,71	7	4,29	2,45
15	188	98,95	2	1,05	184	97,35	5	2,65	1,59
16	186	98,41	3	1,59	183	96,83	6	3,17	1,59
17	174	98,86	2	1,14	167	95,43	8	4,57	3,44
18	175	98,31	3	1,69	170	95,51	8	4,49	2,81
19	179	98,35	3	1,65	174	95,08	9	4,92	3,27
20	148	98,67	2	1,33	140	95,89	6	4,11	2,78

SS sperm solüsyonu

sAR(-) spontan akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

sAR(+) spontan akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

iAR(-) indüklenmiş akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

iAR(+) indüklenmiş akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

ARIC SCORE= % iA(+) – sAR(+)

Tablo 11. Grup 1 (SS+PRP) sperm numunelerinin canlı hücrelerde spontan ve indüklenmiş akrozomal reaksiyon değerleri, yüzdeleri ve ARIC skorları

Hasta no	Grup 1 sAR(-)	Grup 1 sAR(-) %	Grup 1 sAR(+)	Grup 1 sAR(+) %	Grup 1 iAR(-)	Grup 1 iAR(-) %	Grup 1 iAR(+)	Grup 1 iAR(+) %	Grup 1 ARIC SCORE
1	166	98,81	3	1,79	163	95,88	7	4,12	2,33
2	169	96,57	2	1,14	164	95,91	7	4,09	2,95
3	141	97,92	6	4,17	134	92,41	11	7,59	3,42
4	186	96,88	3	1,56	182	95,79	8	4,21	2,65
5	182	97,85	6	3,23	179	94,71	10	5,29	2,07
6	170	98,84	4	2,33	164	94,80	9	5,20	2,88
7	178	98,89	2	1,11	174	96,67	6	3,33	2,22
8	185	97,88	2	1,06	181	97,31	5	2,69	1,63
9	156	98,73	4	2,53	149	93,71	10	6,29	3,76
10	192	98,97	2	1,03	188	96,91	6	3,09	2,06
11	179	98,90	2	1,10	174	96,13	7	3,87	2,76
12	186	98,41	2	1,06	180	96,77	6	3,23	2,17
13	174	98,31	3	1,69	172	96,63	6	3,37	1,68
14	177	98,33	3	1,67	173	95,58	8	4,42	2,75
15	188	98,43	3	1,57	185	96,86	6	3,14	1,57
16	190	98,45	3	1,55	185	96,35	7	3,65	2,09
17	171	98,84	3	1,73	166	94,86	9	5,14	3,41
18	184	98,92	2	1,08	179	96,24	7	3,76	2,69
19	178	98,34	2	1,10	170	94,97	9	5,03	3,92
20	160	100,00	3	1,88	159	96,36	6	3,64	1,76

SS+PRP sperm solüsyonu ve otolog PRP karışımı

sAR(-) spontan akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

sAR(+) spontan akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

iAR(-) indüklenmiş akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

iAR(+) indüklenmiş akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

ARIC SCORE= % iA(+) – sAR(+)

Tablo 12. Grup 2 (SS-kriyo free vitrifikasyon) sperm numunelerinin canlı hücrelerde spontan ve indüklenmiş akrozomal reaksiyon değerleri, yüzdeleri ve ARIC skorları

Hasta no	Grup 2 sAR(-)	Grup 2 sAR(-) %	Grup 2 sAR(+)	Grup 2 sAR(+) %	Grup 2 iAR(-)	Grup 2 iAR(-) %	Grup 2 iAR(+)	Grup 2 iAR(+) %	Grup 2 ARIC SCORE
1	38	95,00	2	5,00	34	85,00	6	15,00	10,00
2	45	95,74	2	4,26	44	91,67	4	8,33	4,08
3	26	78,79	7	21,21	22	64,71	12	35,29	14,08
4	22	91,67	2	8,33	20	83,33	4	16,67	8,33
5	56	94,92	3	5,08	54	90,00	6	10,00	4,92
6	57	95,00	3	5,00	54	88,52	7	11,48	6,48
7	78	97,50	2	2,50	75	93,75	5	6,25	3,75
8	55	93,22	4	6,78	49	85,96	8	14,04	7,26
9	55	96,49	2	3,51	54	91,53	5	8,47	4,97
10	98	98,00	2	2,00	96	95,05	5	4,95	2,95
11	45	95,74	2	4,26	43	87,76	6	12,24	7,99
12	70	95,89	3	4,11	69	92,00	6	8,00	3,89
13	67	97,10	2	2,90	63	92,65	5	7,35	4,45
14	65	95,59	3	4,41	62	91,18	6	8,82	4,41
15	79	95,18	4	4,82	78	91,76	7	8,24	3,42
16	70	98,59	1	1,41	68	94,44	4	5,56	4,15
17	49	94,23	3	5,77	46	86,79	7	13,21	7,44
18	104	98,11	2	1,89	103	96,26	4	3,74	1,85
19	70	98,59	1	1,41	68	94,44	4	5,56	4,15
20	68	95,77	3	4,23	67	93,06	5	6,94	2,72

SS-kriyo free vitrifikasyon; kriyoprotektan içermeyen solüsyon içinde vitrifiye edilen sperm solüsyonu

sAR(-) spontan akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

sAR(+) spontan akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

iAR(-) indüklenmiş akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

iAR(+) indüklenmiş akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

ARIC SCORE= % iA(+) – sAR(+)

Tablo 13. Grup 3 ((SS+PRP)-kriyo free vitrifikasyon) sperm numunelerinin canlı hücrelerde spontan ve indüklenmiş akrozomal reaksiyon değerleri, yüzdeleri ve ARIC skorları

Hasta no	Grup 3 sAR(-)	Grup 3 sAR(-) %	Grup 3 sAR(+)	Grup 3 sAR(+) %	Grup 3 iAR(-)	Grup 3 iAR(-) %	Grup 3 iAR(+)	Grup 3 iAR(+) %	Grup 3 ARIC SCORE
1	37	94,87	2	5,13	35	87,50	5	12,50	7,37
2	54	96,43	2	3,57	53	92,98	4	7,02	3,45
3	33	80,49	8	19,51	25	62,50	5	37,50	17,99
4	37	94,87	2	5,13	35	87,50	5	12,50	7,37
5	39	95,12	2	4,88	35	87,50	5	12,50	7,62
6	75	97,40	2	2,60	72	93,51	5	6,49	3,90
7	61	95,31	3	4,69	57	89,06	7	10,94	6,25
8	57	96,61	2	3,39	53	91,38	5	8,62	5,23
9	59	95,16	3	4,84	57	90,48	6	9,52	4,69
10	117	97,50	3	2,50	115	95,04	6	4,96	2,46
11	39	95,12	2	4,88	36	87,80	5	12,20	7,32
12	80	97,56	2	2,44	79	94,05	5	5,95	3,51
13	58	95,08	3	4,92	56	91,80	5	8,20	3,28
14	75	97,40	2	2,60	74	93,67	5	6,33	3,73
15	63	95,45	3	4,55	60	89,55	7	10,45	5,90
16	83	97,65	2	2,35	81	94,19	5	5,81	3,46
17	57	96,61	2	3,39	54	90,00	6	10,00	6,61
18	98	97,03	3	2,97	95	95,00	5	5,00	2,03
19	82	96,47	3	3,53	78	90,70	8	9,30	5,77
20	59	95,16	3	4,84	57	90,48	6	9,52	4,69

(SS+PRP)-kriyo free vitrifikasyon; kriyoprotektan içermeyen solüsyon içinde vitrifiye edilen sperm solüsyonu+PRP

sAR(-) spontan akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

sAR(+) spontan akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

iAR(-) indüklenmiş akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

iAR(+) indüklenmiş akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

ARIC SCORE= % (iAR-sAR)

Tablo 14. Grup 4 (SS-kriyo vitrifikasyon) sperm numunelerinin canlı hücrelerde spontan ve indüklenmiş akrozomal reaksiyon değerleri, yüzdeleri ve ARIC skorları

Hasta no	Grup 4 sAR(-)	Grup 4 sAR(-) %	Grup 4 sAR(+)	Grup 4 sAR(+) %	Grup 4 iAR(-)	Grup 4 iAR(-) %	Grup 4 iAR(+)	Grup 4 iAR(+) %	Grup 4 ARIC SCORE
1	124	97,64	3	2,36	121	94,53	7	5,47	3,11
2	135	97,83	3	2,17	136	96,45	5	3,55	1,37
3	59	90,77	6	9,23	55	84,62	10	15,38	6,15
4	120	97,56	3	2,44	117	94,35	7	5,65	3,21
5	155	97,48	4	2,52	152	95,00	8	5,00	2,48
6	146	97,99	3	2,01	144	96,00	6	4,00	1,99
7	107	97,27	3	2,73	105	95,45	5	4,55	1,82
8	96	97,96	2	2,04	94	94,95	5	5,05	3,01
9	80	95,24	4	4,76	77	90,59	8	9,41	4,65
10	143	97,28	4	2,72	139	94,56	8	5,44	2,72
11	138	97,87	3	2,13	135	95,74	6	4,26	2,13
12	135	98,54	2	1,46	133	95,68	6	4,32	2,86
13	175	98,87	2	1,13	172	96,63	6	3,37	2,24
14	157	98,13	3	1,88	154	96,25	6	3,75	1,88
15	139	98,58	2	1,42	134	95,71	6	4,29	2,87
16	115	97,46	3	2,54	114	95,80	5	4,20	1,66
17	118	97,52	3	2,48	115	94,26	7	5,74	3,26
18	114	98,28	2	1,72	112	94,92	6	5,08	3,36
19	71	97,26	2	2,74	65	90,28	7	9,72	6,98
20	95	97,94	2	2,06	97	95,10	5	4,90	2,84

SS-kriyo vitrifikasyon; kriyoprotektan solüsyonu içinde vitrifiye edilen sperm solüsyon (2 saat inkübe edilmiş)

sAR(-) spontan akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

sAR(+) spontan akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

iAR(-) indüklenmiş akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

iAR(+) indüklenmiş akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

ARIC SCORE= % (iAR-sAR)

Tablo 15. Grup 5 ((SS+PRP)-kriyo vitrifikasyon) sperm numunelerinin canlı hücrelerde spontan ve indüklenmiş akrozomal reaksiyon değerleri, yüzdeleri ve ARIC skorları

Hasta no	Grup 5 sAR(-)	Grup 5 sAR(-) %	Grup 5 sAR(+)	Grup 5 sAR(+) %	Grup 5 iAR(-)	Grup 5 iAR(-) %	Grup 5 iAR(+)	Grup 5 iAR(+) %	Grup ARIC SCORE
1	126	96,92	4	3,08	123	93,89	8	6,11	3,03
2	130	95,59	6	4,41	125	92,59	10	7,41	3,00
3	52	92,86	4	7,14	50	89,29	6	10,71	3,57
4	117	97,50	3	2,50	115	95,04	6	4,96	2,46
5	140	97,90	3	2,10	137	95,14	7	4,86	2,76
6	132	97,06	4	2,94	128	93,43	9	6,57	3,63
7	132	98,51	2	1,49	129	96,27	5	3,73	2,24
8	127	97,69	3	2,31	123	94,62	7	5,38	3,08
9	120	97,56	3	2,44	115	94,26	7	5,74	3,30
10	145	96,67	5	3,33	140	93,96	9	6,04	2,71
11	137	97,86	3	2,14	134	95,04	7	4,96	2,82
12	137	97,86	3	2,14	134	95,04	7	4,96	2,82
13	170	98,27	3	1,73	168	96,00	7	4,00	2,27
14	170	98,84	2	1,16	167	96,53	6	3,47	2,31
15	154	98,09	3	1,91	150	95,54	7	4,46	2,55
16	137	97,16	4	2,84	133	93,66	9	6,34	3,50
17	123	96,85	4	3,15	119	92,97	9	7,03	3,88
18	100	97,09	3	2,91	97	93,27	7	6,73	3,82
19	109	97,32	3	2,68	104	92,04	9	7,96	5,29
20	79	96,34	3	3,66	77	91,67	7	8,33	4,67

((SS+PRP)-kriyo vitrifikasyon; kriyoprotektan solüsyonu içinde vitrifiye edilen sperm solüsyonu PRP (2 saat inkübe edilmiş)

sAR(-) spontan akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

sAR(+) spontan akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

iAR(-) indüklenmiş akrozomal reaksiyon negatif canlı sperm

iAR(+) indüklenmiş akrozomal reaksiyon pozitif canlı sperm

ARIC SCORE= % (iAR-sAR)

4.8. Vitrifikasyon Protokolünün İndüklenmiş Akrozomal Reaksiyon Potansiyeline Etkisi

Çalışmada yıkama sonrası 2 saat inkübasyona tabi tutulan sperm solüsyonu (Sham grubu-SS) ile kriyoprotektan içermeyen (Grup 2; SS-kriyo-free) ve kriyoprotektan içeren (Grup 4; SS-kriyo) solüsyonlarla vitrifikasyon uygulanan sperm numunelerindeki çözme sonrası canlı sperm hücrelerinin ARIC skorları hesaplandığında; kriyoprotektan içermeyen solüsyonlarla vitrifiye edilen numunelerde (Grup 2) % 4,28, sham grubunda %2,21 ARIC skoru hesaplandı, ARIC skoru kriyoprotektan içermeyen solüsyonlarla vitrifiye edilen numunelerde (Grup 2) istatistiksel açıdan anlamlı yüksek bulundu ($p<.001;p<0,05$). Kriyoprotektan içeren solüsyonla vitrifiye edilen numunelerde %2,85 oranında hesaplanan ARIC skoru (Grup 4) ile sham grubu arasında ARIC skoru açısından anlamlı fark görülmedi ($p=0.70;p>0.05$) (Tablo 16).

Tablo 16.Çalışma gruplarının ARIC skorlarına göre karşılaştırmalı değerlendirmesi sonucunda elde edilen *p* değerleri

	ShamGrubu (SS)	Grup 2 (SS kriyofree)	Grup 3 (SS+PRP-kriyofree)	Grup 4 (SS-kriyo)	Grup 5 (SS+PRP-kriyo)
ShamGrubu (SS)		<.001	<.001	.070	0.989
Grup 2 (SS-kriyofree)	<.001		0.914	0.002	
Grup 3 (SS+PRP kriyofree)	<.001	0.914			0.004
Grup 4 (SS-kriyo)	0.070	0.002			0.989
Grup 5 (SS+PRP-kriyo)	0.989		0.004	0.989	

4.9. Farklı Kriyoprezervasyon Solüsyonlarının İndüklenmiş Akrozomal Reaksiyon Potansiyeline Etkisi

Çalışmada kriyoprotektan içermeyen (Grup 2; SS-kriyo-free) ve kriyoprotektan içeren (Grup 4; SS-kriyo) solüsyonlarla vitrifikasyon uygulanan sperm numunelerindeki canlı sperm hücrelerinin ARIC skorları hesaplandığında; kriyoprotektan içermeyen solüsyonlarla vitrifiye edilen numunelerde kriyoprotektan içeren gruba göre ARIC skoru anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla %4,28 ve %2,85, $p=0.002$; $p<0,05$) (Tablo 16).

4.10. Sperm Vitrifikasyonunda PRP İnkübasyonunun Akrozomal Reaksiyon Potansiyeline Etkisi

Vitrifikasyon uygulanmayan 2 saat inkübatörde bekletilen sham grubu ve 2 saat PRP eklenerek inkübatörde bekletilen Grup 1'e ait sperm numunelerinin akrozomal reaksiyon potansiyelini değerlendirmek amacıyla hesaplanan ARIC skorunda her iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı. ARIC skorları sırasıyla %2.21 (1.60-2.60) ve %2.49 (2.06-2.91) olarak hesaplandı ($p=0.060$, $p>0.05$)

Vitrifikasyon uygulanan 4 çalışma grubunun sham grubu ile karşılaştırılması gerçekleştirildi. PRP inkübasyonu sonrası kriyoprotektan içermeyen (Grup 3;

SS+PRP-kriyo free) ve kriyoprotektan içeren (Grup 5; SS+PRP-kriyo) solüsyonlarla vitrifikasyon sonrası çözülen numunelerde canlı hücrelerin ARIC skorları hesaplandığında; PRP inkübasyonu uygulanıp kriyoprotektan içermeyen solüsyonlarla vitrifiye edilen numunelerde (Grup 3) elde edilen %4.69 ARIC skoru, sham grubunun %2.21 değerinde ARIC skoruna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<.001$; $p<0.05$). PRP inkübasyonu uygulanıp kriyoprotektan içeren solüsyonla vitrifiye edilen numunelerle (Grup 5) %2.79 olarak hesaplanan ARIC skoru sham grubu ile anlamlı fark göstermedi ($p=0.989$; $p>0.05$) (Tablo 16).

Kriyoprotektan içermeyen solüsyonla vitrifiye edilen PRP inkübasyonu uygulanmayan (Grup 2; SS-kriyo free) ve PRP inkübasyonu uygulanan (Grup 3; SS+PRP-kriyo free) çalışma gruplarında çözme sonrası canlı sperm hücrelerinde ARIC skoru hesaplandığında; sırasıyla %4.28 (3.58-6.87) ve %4.69 (3.36-6.96) değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ($p=0.914$, $p>0.05$) (Tablo 16).

Benzer şekilde kriyoprotektan içeren solüsyonla vitrifiye edilen PRP inkübasyonu uygulanmayan (Grup 4; SS-kriyo) ve PRP inkübasyonu uygulanan (Grup 5; SS+PRP-kriyo) çalışma gruplarında çözme sonrası canlı sperm hücrelerinde ARIC skoru hesaplandığında; sırasıyla %2.85 (2.06-3.23) ve %2.79 (2.29-3.60) değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ($p=0.989$, $p>0.05$) (Tablo 16).

Çalışmada PRP ile inkübasyonun ardından iki farklı kriyoprezervasyon solüsyonu ile vitrifiye edilip çözüldükten sonra değerlendirilen sperm numunelerinde (Grup 3 ve Grup 5) ARIC skorları birbiriyle karşılaştırıldığında; kriyoprotektan içermeyen solüsyonla dondurulan sperm örneklerinin lehine istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu (sırasıyla ARIC skorları %4.69 ve %2.79, $p<.004$, $p<0.005$) (Tablo 16).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, ‘üremeye yardımcı tedavi yaklaşımlarından biri olarak gerçekleştirilen üreme potansiyelini koruma kapsamında uygulanan sperm kriyoprezervasyonunda; trombosit (platelet) zengin plazma (PRP) ile inkübasyonun çözme sonrası sperm viabilitesi, hareket kabiliyeti ve fertilizasyon potansiyeline olası iyileştirici etkisini belirlemek’ amacıyla taze (fresh) ejakulat örneği ve farklı kriyoprezervasyon solüsyonlarında (kriyoprotektan-free ve kriyoprotektan içeren) vitrifikasyon uygulanan ejakulat örnekleri, kendi içinde 2 alt gruba ayrılarak, vitrifikasyon öncesinde eşit konsantrasyon ve sürede otolog PRP içinde inkübasyona tabi tutuldu. Vitrifiye edilen sperm örneklerinde çözme sonrasında normal semen parametreleri (viabilite, motilite, morfoloji) ve fertilizasyon potansiyelini değerlendirmek amacıyla akrozomal reaksiyon aktivitesi taze sperm örneğiyle ve birbirleriyle ikili olarak karşılaştırıldı.

Üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında sperm kriyoprezervasyonu erkek fertilitésinin korunmasında önemli bir yere sahiptir. Virtual azospermi, obstrüktif ve non-obstrüktif azospermi olgularında, sitotoksik kemoterapi, radyoterapi ve/veya cerrahi girişimler uygulanacak onkolojik hastalarda ejakulat, testiküler sperm ve testis dokusu kriyoprezervasyonu uygulanmaktadır. Sperm kriyoprezervasyonu işlemi sırasında oluşan kriyo hasarı en aza indirmek için, sperm seçimi, dondurmadan önce sperm kalitesini iyileştirme ve koruma, uygun kriyoprotektanların kullanılması ve uygun çözme tekniklerinin kullanılması gibi birtakım optimizasyonlar gerekmektedir. Son yıllarda tıbbın birçok alanında olduğu gibi infertilite tedavisinde de ek tedavi (add-on) uygulamaları kapsamında trombosit zengin plazma uygulamalarına dair deneysel ve klinik çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada PRP’nin yaralanan dokudaki süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini ve eritrositlerdeki non-protein tiol (-SH) seviyelerini artırma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Martins ve ark., 2016). Hem oksidatif stres modülasyonu hem de apoptoz inhibisyonu, kriyoprezervasyon işlemi sırasında önemli bir role sahiptir. Bu durumda PRP’nin donma-çözülme kaynaklı hasara karşı sperm kalitesini iyileştirip iyileştiremeyeceği sorusunu

gündeme getirmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, taze (fresh) sperm hücrelerinde ve sperm dondurma protokolünde kullanılan 2 farklı solüsyon (kriyoprotektan içermeyen ve kriyoprotektan içeren solüsyon) kullanılarak vitrifiye edilen sperm hücrelerinde; PRP'nin çözme sonrasında sperm viabilitesine, motilitesine ve fertilizasyon kapasitesine etkileri karşılaştırıldı.

Üremeye yardımcı tedavilerde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), intrauterin inseminasyon (IUI) ve konvansiyonel in vitro fertilizasyonda (IVF) kullanılacak ejakülat örneğinin sperm dışı salgılardan ve epitelyum döküntülerinden arındırılması, motilitesinin ve viabilitesinin yükseltilmesi tedavide kullanılacak doğru sperm seçiminde önem taşımaktadır. Bunun için en doğru sperm hazırlama tekniği uygulanması gerekir. Gerçekleştirilen bir çalışmada dansite-gradient, swip-up, dansite-gradient+swim-up, geri-yüzdürme yıkama yöntemlerinin sperm hareketliliği, morfolojisi, DNA parçalanması, akrozom durumu, oksidatif stres ve mitokondriyal aktivite üzerindeki etkileri araştırılmış. Yapılan bu çalışmada dansite gradient sperm hazırlama tekniğinin yıkama öncesi ve diğer gruplara göre sperm motilitesini anlamlı olarak arttırdığı rapor edilmiştir (Raad ve ark., 2021). R.Henkel'in yaptığı, sperm hazırlama tekniklerinin karşılaştırılması ve optimum sonuç veren tekniğin belirlenmesine yönelik bir çalışmada dansite-gradient sperm hazırlama tekniğinin yıkama öncesine göre sperm motilitesini ve viabilitesini arttırdığını bildirilmiştir (Henkel ve ark., 2003). Yaptığımız çalışmanın ilk değerlendirme basamağı olan taze sperm örneği ile yıkama sonrası sperm örneği karşılaştırmamızda da literatürdeki veriyi destekler nitelikte dansite-gradient yıkama yöntemi ile yıkama sonrası sperm motilitesi ve viabilitesi anlamlı olarak artmıştır.

Taze ejakülat ve otolog trombosit açısından zengin plazmanın inkübasyonunun insan spermatozoasında H_2O_2 kaynaklı oksidatif stres üzerindeki etkisini karşılaştıran bir çalışmada; oksidatif strese maruz bırakılan ejakülat örneğinin % 2, %5, %10 PRP konsantrasyonlarında 24 saat inkübasyonu sonrası karşılaştırma yapıldığında, %2 konsantrasyonda PRP ile inkübe edilengrubun diğer iki konsantrasyona oranla iyileştirici etkisinin daha anlamlı olduğu görülmüş. Fakat oksidatif stresin kontrol grubuna oranla her üç konsantrasyonda anlamlı olarak azaldığını bildirmişler. PRP tedavisinin, strese girmemiş taze spermatozoanın progresif ve toplam motilitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını belirtmişler (Bader

ve ark., 2020). Çalışmamızda bu veriler dikkate alınarak tüm inkübasyongruplarında %2'lik PRP konsantrasyonunu kullandık. Sonuçlarımızın yapılan istatistiksel karşılaştırmaları sonucunda, bu çalışmayı destekler nitelikte, yıkanmış ve 2 saat bekletilmiş taze ejakulat (Sham) ile yıkama sonrası PRP ile 2 saatlik inkübasyona tabi tutulan taze ejakulatın (Grup 1) arasında sperm motilite, viabilite ve morfolojik değerlendirmelerinde anlamlı fark görülmemiştir. Viabilite analizinde hem rutin androloji laboratuvarlarında uygulanan eozin-nigrosin boyaması hem de bu çalışmada akrozomal reaksiyon analizi protokolü kapsamında gerçekleştirilen Hoechst boyaması sonuçları değerlendirilmiştir. Her iki boyamanın sonuçları birbirini destekler niteliktedir.

Üremeye yardımcı tedavilerde kriyoprezervasyon protokollerinin dondurulan hücreye düşük ısı ve kullanılan kriyoprotektanların toksik etkileri nedeniyle zarar verdiği bilinsede infertil bireylerin ve/veya onkolojik hastaların fertilitelerinin korunması açısından önemli bir koruyucu tedavi yaklaşımıdır. Kriyoprezervasyonun sperm hücrelerinin yapı ve fonksiyonuna zarar verdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Günümüzde farklı kriyoprezervasyon yöntemleri kullanılmakla birlikte, yapılan çok sayıda sperm kriyoprezervasyon çalışmalarında, vitrifikasyon sonrası sperm motilitesinde ve viabilitesinde % 30-75'e varan oranlarda azalmanın olduğu bildirilmiştir (Keel ve ark., 1987, Hammadh ve ark., 1999, Esteves ve ark., 2000, Nijs ve ark., 2009). Yapılan güncel bir çalışmada da yıkama sonrası taze sperm ile kriyoprotektan içeren solüsyon ile uygulanan vitrifikasyon sonrası sperm viabilite ve motilitesi değerlendirilmiş; viabilitenin %90.10'dan %42.15'e düştüğü, motilitenin %81.66'dan %26.35'e düştüğü (her ikisi içinde $p < 0.001$) rapor edilmiştir (Khosronezhad ve ark., 2023). Farklı konsantrasyon ve içeriklerde kriyoprotektan içeren kriyoprezervasyon solüsyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada taze sperm örnekleriyle karşılaştırıldığında viabilite ve motilitenin vitrifikasyon sonrasında anlamlı azaldığı bildirilmiştir. Total motilite taze sperimde %65.13, dondurulup çözölmüş sperm örneğinde iki farklı kriyoprotektan içeren solüsyonda %13.83 ve %8.27'ye düşmüş. Viabiliteninde benzer şekilde taze numunelerde %75.33 iken %22.93 ve %18.33 oranına kadar düştüğü bildirilmiştir (Arciero ve ark., 2022). Bu çalışmada da viabilite oranları %87.5 olarak saptanan taze örneklerle karşılaştırıldığında, kriyoprotektan içermeyen ve kriyoprotektan içeren iki farklı

solüsyonda vitrifiye edilen sperm örneklerinin eozin-nigrosin boyaması ile viabilite oranı her ikisinde de %32, Hoechst boyaması ile sırasıyla %32 ve %62.5 olarak bulunmuştur. Taze sperm örneği ile karşılaştırıldığında, iki vitrifikasyon grubunda da viabilite anlamlı oranda azalmıştır.

Çalışmamızda kriyoprotektan içermeyen, sadece non-permeabl sükroz solüsyonu ile dondurulan sperm örnekleri ile kriyoprotektan içeren ticari kitle dondurulan sperm örnekleri birbiriyle karşılaştırıldığında; kriyoprotektan içeren solüsyonla dondurulanlarda sperm viabilitesi ve motilitesi anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Literatüre bakıldığında bu konuda tam bir ortak görüş mevcut değildir. Isachenko ve arkadaşlarının iki çalışmasında kriyoprotektan içeren solüsyonlarla konvensiyonel yavaş dondurma protokolü ve 0.25M sükroz solüsyonuyla vitrifikasyonun karşılaştırması yapılmış ve motilite oranının, sitoplazmik bütünlüğün ve akrozomal membranların sükroz ile vitrifiye edilen grupta anlamlı daha yüksek olduğu bildirilmiştir (sırasıyla%76vs %52, %54 vs %28, %44 vs %30). Araştırmacılar kriyoprotektan-free solüsyonlarla dondurmanın kriyo hasardan korunma için uygunyaklaşım olduğunu vurgulamışlardır (Isachenko ve ark., 2011, Isachenko ve ark., 2012). Literatürde kriyoprotektan-free solüsyonlarla sperm vitrifikasyonunun konvensiyonel yavaş dondurma ile karşılaştırmasını yapan çok sayıda çalışmada kriyoprotektan içermeyen solüsyonlarla vitrifikasyonun sperm viabilitesi, motilitesi, DNA bütünlüğü ve fonksiyonel kapasitesi açısından daha uygun bir yöntemolduğu bildirilmiştir (Zhu ve ar., 2013, Slabbert ve ark. 2014, Aizpurua ve arlk., 2017, Spis ve ark., 2019, Kerthikeyan ve ark., 2019). Sperm vitrifikasyonunda kriyoprotektan-free ve kriyoprotektan içeren solüsyonların kullanımının motilite, kapasitasyon, apoptotik aktivasyona etkisinin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada, motilite (sırasıyla %34.5 ve %34) ve apoptotik aktivasyonun (sırasıyla %47.7 ve %44.5) her iki grupta da benzer olduğu, apoptotik aktivasyonun kriyoprotektan-free solüsyon kullanılan grupta daha yüksek olmakla birlikte,iki protokolün birbirine üstünlüğünün olmadığı vurgulanmış (Wangve ark., 2021). Literatürde sıgır spermleri ile yapılan güncel bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda disakkarit kullanılarak uygulanan vitrifikasyonda viabilite ve motilite karşılaştırması yapılmış. Vitrifikasyonda disakkaritler kullanıldığında spermatozoanın viabilitesinin ve motilitesinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Perez-Marin ve ark., 2022).

Bizim çalışmamızın sonuçlarında da kriyoprotektan içeren solüsyonlarla vitrifikasyonun daha etkin olduğu bulundu. Sükrozun insan spermi için toksik olmamasına rağmen, bunun neden olduğu ozmotik hasar hala mevcuttur (Chen ve diğerleri, 2015). Vitrifikasyon protokolünde her ne kadar yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan kullanılsa da protokolün çok hızlı gerçekleşmesi ve dolayısıyla hücrelerin kriyoprotektanamaruziyetinin çok kısa sürmesi, kriyoprotektanın hücre içinde proteinleri stabilize etmesi ve donma sıcaklığını düşürerek hücreye zarar verici buz gelişimini azaltması nedeniyle kriyoprotektan-free solüsyona göre kriyoprotektan içeren solüsyonlar daha efektif sonuçlar vermektedir.

PRP çözme sonrasında sperm motilitesini, viabilitesini, mitokondriyal fonksiyonunu ve DNA bütünlüğünü pozitif etkileyecek çok sayıda biyolojik aktif bileşen (IGF-1, VEGF, TGF, NGF, ATP, çinko iyonları, SOD ve trombosit aktive edici faktör) içerir (Yan ve ark., 2021). Oksidatif hasar en yaygın kriyoprezervasyon hasarlarından biridir ve PRP memeli hücrelerinde antioksidan etkiye sahip olduğu için kriyoprezervasyon sırasında sperm üzerinde de olumlu bir etki oluşturabilir düşüncesi mevcuttur (Motlagh ve ark., 2014). PRP'nin sperm üzerine etkisini değerlendiren güncel bir çalışmada, sperm hücrelerinde H₂O₂'nin neden olduğu oksidatif stresin zararlı etkilerini azalttığı ve %2 konsantrasyondaki PRP'nin spermin ilerleyici hareket ve DNA bütünlüğü gibi tanımlanmış parametreleri üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu gösterilmiştir (Bader ve ark., 2020). Otolog PRP'nin sperm progressif motilitesini ve canlılığını iyileştirdiği gösterilmiştir (Yan ve ark. 2021). Farklı bir çalışmada 1×10⁵ /µL konsantrasyondaki trombositlerin spermlerin progressif motilitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Nabavinia ve ark., 2022). Bu çalışmalardan farklı olarak, bizim çalışmamızda kriyoprotektan içermeyen ve kriyoprotektan içeren solüsyonlarla gerçekleştirdiğimiz iki farklı vitrifikasyon protokolünde PRP ile inkübasyonun sperm viabilitesi, motilitesine olumlu bir etkisi saptanmadı. Sadece kriyoprotektan içermeyen solüsyonla vitrifiye edilen sperm örneklerinde eozin-nigrosin boyaması sonrası viabilite oranı PRP lehine anlamlı yüksek bulundu ($p=0.04$). Fakat bu verinin Hoschst boyaması sonrası konfirmasyonu aynı sonucu vermedi ($p=0.717$).

PRP uygulamalarına yönelik çalışmalarda standardizasyonun sağlanmasını önleyici en önemli uyumsuzluklardan biri uygulanan PRP konsantrasyonunun

değişkenliğidir. Farklı hücre ve dokulara yönelik PRP'nin add-on olarak etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda ortak problemidir ve tedavi yaklaşımının tekrar uygulanabilirliği açısından sorun oluşturmaktadır. Alcay ve arkadaşları keçi spermi ile yaptıkları çalışmada 3 farklı konsantrasyonda otolog PRP konsantrasyonunun etkinliğini değerlendirmişler. $0.5 \times 10^7/\text{ml}$, $1 \times 10^7/\text{ml}$ ve $2 \times 10^7/\text{ml}$ konsantrasyonlarındaki PRP inkübasyonları karşılaştırıldığında, en etkin konsantrasyonun $2 \times 10^7/\text{ml}$ olduğu rapor edilmiştir (Alcay ve ark. 2021). Buffalo spermatozoasında kriyoprezervasyon öncesi PRP inkübasyonunun etkinliğini değerlendiren iki çalışmada donör deneklerde %5 ve subfertil deneklerde %15 konsantrasyonda PRP inkübasyonu sonrası sperm kalitesi, antioksidan aktivitesi ve in vivo fertilizasyon kapasitesinin iyileştirdiği bildirilmiştir (El-Sherniny ve ark., 2022, Almadaly ve ark., 2023). İnsan spermi ile gerçekleştirilen iki çalışmada $1 \times 10^6/\text{mikrolitre}$ konsantrasyonunda PRP kullanılmış ve sperm solüsyonu %5 oranında PRP ile inkübe edilmiştir (Bader ve ark., 2019, Yan ve ark., 2021). Bununla birlikte insan spermi ile gerçekleştirilen güncel bir çalışmada 20 normal semen parametrelerine sahip hastadan alınan ejakulat örnekleri 3 farklı konsantrasyonda PRP ile inkübe edilmiş ve dondurulmuş. Sperm progressif motilitesi ve viabilitesinin $1 \times 10^5/\text{mikrolitre}$ konsantrasyonda anlamlı yüksek olduğu rapor etmişler (Nabavinia ve ar., 2023). Bizim çalışmamızda ejakulat örneği aldığımız hastalardan alınan kan numunelerindeki ortalama trombosit sayısı $26 \times 10^7/\text{ml}$ olarak hesaplanmıştır ve uygulanan PRP konsantrasyonunun standardizasyonu için inkübasyonda $20 \times 10^7/\text{ml}$ konsantrasyonunda PRP kullanılmış ve sperm solüsyonu ile %2 oranında inkübe edilmiştir. Literatürde PRP konsantrasyon aralıklarının çok geniş olması ve bizim çalışmamızda tek PRP konsantrasyonunun karşılaştırılmış olması nedeniyle, bu kapsamda PRP etkinliği için daha yüksek konsantrasyonların karşılaştırması yapılabilir.

Ayrıca, insan sperminin vitrifikasyon sonrası çözme aşamasında 42°C 'de ısıtmanın, spermin hareketliliğini önemli ölçüde artırmak için gereken optimum sıcaklık olduğunu bildiren Mansilla ve arkadaşlarının çalışmasıyla karşılaştırıldığında (Mansilla ve ark., 2016), bu çalışmada çözme aşamasında numuneler sıvı azot tankından çıkarılarak oda sıcaklığında bekletildi ve sıvı faza geçen örnekler 37°C 'ye ısıtılmış 3 ml sperm yıkama solüsyonu ile dilüe

edildi. Yukarıdaki çalışmada belirtilen farklı sıcaklıkta çözmenin kliniğe uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi içindaha geniş ve kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Sperm fonksiyonunu incelemede, spermin oositi fertilize etme potansiyeli için temel olay olan akrozomal reaksiyonun değerlendirilmesi yapılır. Akrozomal reaksiyon analizinde spontan olarak akrozomal reaksiyona giren spermlerin toplam yüzdesinin kalsiyum iyonofor ile indüklenmiş spermlerden çıkarılması ile elde edilen ARIC skoru akrozom fonksiyonunu tanımlayan bir yaklaşımdır (Cummins JM ve ark., 1991). ARIC skorunun fertil ve infertil erkekler arasında eşik değerini %31 olarak vurgulayan çalışmaların yanısıra (Pampiglione ve ark 1993), Cummins ve arkadaşları bu değeri %5 olarak, Henkel ve arkadaşları ise %7.5 olarak raporlamıştır (Cummins JM ve ark 1991; Henkel R ve ark 1993). Bu çalışmada sham ve deney gruplarından elde edile tüm ARIC skoru değerleri %5'in altında hesaplandı. ARIC skorlarının bu değerde elde edilmesinin nedeni, ejakulat örneklerinin çalışmanın gerçekleştirildiği üremeye yardımcı tedavi merkezine başvuran infertil çiftlerin erkek partnerinden alınmış olmasıdır. Çalışmada değerlendirilen ejakulat örneklerinde ARIC skoru %2,21 ile %5 arasındadır. Çalışmamızda Cummins ve arkadaşlarının raporlamış olduğu ARIC skoru değerine yakın aralıkta sonuçlar elde edildi (Cummins ve ark., 1991).

Literatürde sperm kriyoprezervasyonunda PRP'nin çözme sonrası sperm kalitesine etkisine yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte, yapılan çalışmaların çoğu rutin semen parametrelerine yöneliktir. Spermin fonksiyonel kapasitesini değerlendirmeye yönelik çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada spermin dondurup-çözdükten sonra oositi fertilize etme potansiyelini değerlendirmek amacıyla akrozomal reaksiyon analizi yapıldı. ARIC skorlarında şaşırtıcı bir veri; yıkama sonrası oda sıcaklığında 2 saat bekletilen grup (Sham) ile kriyo-free solüsyonuyla vitrifiye edilen sperm numuneleri arasında, vitrifiye edilen sperm numuneleri lehine anlamlı sonuç çıkmasıdır. Çalışma gruplarında sperm sayımı yapılırken tüm numunelerde 200 hücre sayıldı ve bu hücrelerin Hoechst (+) ve (-) sonuçlarına göre viabilite değerlendirmesi, FITC-PSA boyamasına göre akrozomal kepin intakt görünmesi akrozomal reaksiyon (-) olarak, akrozomal kepin boyanmadığı-sperm ekvatoryal bölgesinde şerit halinde boyanmanın görüldüğü

spermelerde-akrozomal reaksiyon (+) tanımlaması yapılarak hücre sayıları kaydedildi. Canlı hücrelerde akrozomal reaksiyon oranları belirlenerek ARIC skorları hesaplandı. Kriyoprotektan içermeyen solüsyonla vitrifiye edilen Grup 2 ve Grup 3 numunelerinde, sperm viabilite oranının, sham ve kriyoprotektan içeren solüsyonuyla dondurulan gruplardan anlamlı oranda daha düşük olduğu ve bu nedenle sayılabilen hücre sayısına göre yüzde oran hesaplaması yapıldığında ARIC skorundaki bu yüksekliğin yanıltıcı bir sonuç olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Vitrifikasyon grupları arasında ARIC skorları karşılaştırıldığında en yüksek değerin kriyoprotektan-free solüsyonla vitrifiye edilen numunelerde olduğu görüldü (Grup 2; SS-kriyofree ve Grup 3; SS+PRP-kriyofree). Bunun da Grup 2 ve Grup 3'teki canlı sperm sayılarının az olmasının bir yanıltıcı sonucu olduğu şeklinde yorumlandı.

PRP içinde inkübasyonunvitrifikasyon gruplarında ARIC skoruna etkisi karşılaştırıldığında; kriyoprotektan-free ve kriyoprotektan içeren solüsyonla dondurulan numunelerin PRP inkübasyonu yapılan ve yapılmayan alt grupları arasında da ARIC skorunda anlamlı fark görülmedi (Grup 2 ve Grup 3, Grup 4 ve Grup 5). Dolayısıyla kriyo solüsyonu ne olursa olsun, PRP inkübasyonu spermin çözme sonrası fertilizasyon kapasitesini olumlu etkilemedi.

Sonuç olarak, sperm vitrifikasyonunda çözme sonrası hücrelerin viabilitesini, motilitesini ve fonksiyonel olarak oositi fertilize etme potansiyelini iyileştirmek amacıyla vitrifikasyon öncesinde spermin PRP içinde inkübasyonunun sperm parametrelerine olumlu bir etkisi görülmemiştir. Kriyoprotektan içeren solüsyonlarla vitrifikasyon, toksik etkileri bilinmekle birlikte, sperm vitrifikasyonunda tercih edilmesi gereken bir uygulamadır. Literatürde çelişkili verilerin bulunması nedeniyle, konsantrasyon değerleri açısından oldukça değişken verilerin olduğu PRP uygulamalarında farklı konsantrasyon değerlerinin etkinliğinin spermin fonksiyonel kapasine etkisini değerlendiren yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6.KAYNAKLAR

- Abduljabbar HS, Hashim H, Abduljabar HH, Elnaeim AA, Abduljabar NH. The Effect of Autologous Platelet-Rich Plasma Treatment on In Vitro Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection and Its Impact on the Endometrium and Clinical Pregnancy Rate. *Cureus*. 2022 Aug 12;14(8):e27913. doi: 10.7759/cureus.27913. PMID: 36120226; PMCID: PMC9467478.
- Abou-Haila A, Tulsiani DR. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Jul 15;379(2):173-82. doi: 10.1006/abbi.2000.1880. PMID: 10898932.
- Abraham L., Kierszenbaum M.D.(2002)Histology and Cell Biology, 2th edition, Mosby,; 529-550.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Basic semen analysis. In: Agarwal A, Gupta S, Sharma R, editors. *Andrologicevaluation of maleinfertility: a laboratoryguide*. Cham: Springer; 2016.
- Agarwal A, Tvrdá E. Chapter 5 SlowFreezing of Human Sperm. *MethodsMolBiol*. 2017;1568:67-78.
- Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nottola SA, Miglietta S, Moradi A. Cryoprotectant-freevittrification of humanspermatozoa in newartificialseminalfluid. *Andrology*. 2016 Nov;4(6):1037-1044. doi: 10.1111/andr.12212. Epub 2016 Aug 27. PMID: 27566065.
- Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nottola SA, Miglietta S, Moradi A. Cryoprotectant-freevittrification of humanspermatozoa in newartificialseminalfluid. *Andrology*. 2016 Nov;4(6):1037-1044. doi: 10.1111/andr.12212. Epub 2016 Aug 27. PMID: 27566065.
- Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, Sarasa J, Romero A, Fernández MA, Gómez-Torres MJ. New permeablecryoprotectant-freevittrificationmethodfornativehuman sperm. *Hum Reprod*. 2017 Oct 1;32(10):2007-2015. doi: 10.1093/humrep/dex281. PMID: 28938751.
- Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, Sarasa J, Romero A, Fernández MA, Gómez-Torres MJ. New permeablecryoprotectant-freevittrificationmethodfornativehuman sperm. *Hum Reprod*. 2017 Oct 1;32(10):2007-2015. doi: 10.1093/humrep/dex281. PMID: 28938751.
- Alcay S, Aktar A, Koca D, Kilic MA, Akkasoglu M, Sagirkaya H. Positiveeffect of autologousplateletrichplasma on Saanenbuck semen cryopreservation in non-breedingseason. *Cryobiology*. 2021 Dec;103:45-48. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.09.012. Epub 2021 Oct 26. PMID: 347103
- Almadaly EA, Ibrahim IM, Salama MS, Ashour MA, Sahwan FM, El-Kon II, Abouzed TK, El-Domany WB. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on post-thaw quality, kinematics and in vivo fertility of fertile and subfertile buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Vet Res Commun*. 2023 Jan;47(1):61-72. doi: 10.1007/s11259-022-09928-1. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35451670.
- Arciero V, Ammar O, Maggi M, Vignozzi L, Muratori M, Dabizzi S. Vapour fast freezing with low semen volumes can highly improve motility and viability or DNA quality of cryopreserved human spermatozoa. *Andrology*. 2022 Sep;10(6):1123-1133. doi: 10.1111/andr.13208. Epub 2022 Jun 27. PMID: 35712876; PMCID: PMC9544568.

- Aysel Şeftalioğlu Genel&Özel İnsan Embriyolojisi, 3.Baskı, Ankara Feryal Matbaası, 1998 ,bölüm 15,(328)
- Bader R, Ibrahim JN, Moussa M, Mourad A, Azoury J, Azoury J, Alaaeddine N. Invitroeffect of autologousplatelet-richplasma on H₂ O₂ -inducedoxidativestress in humanspermatozoa. *Andrology*. 2020 Jan;8(1):191-200. doi: 10.1111/andr.12648. Epub 2019 May 12. PMID: 31079423.
- Bader R, Ibrahim JN, Moussa M, Mourad A, Azoury J, Azoury J, Alaaeddine N. In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H₂ O₂ -induced oxidative stress in human spermatozoa. *Andrology*. 2020 Jan;8(1):191-200. doi: 10.1111/andr.12648. Epub 2019 May 12. PMID: 31079423.
- Bailey J, Morrier A, Cormier N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian journal of animal science*. 83(3);393-401, 2003.
- Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology*. 21(1);1-7, 2000.
- Batislam E., M.Murad B. (2004). Erkek üreme sisteminin anatomisi. İçinde: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (editörler). *Erkek Reprodüktif Hastalıkları ve Tedavisi*. 1. Baskı. İstanbul, Türk Androloji Derneği Yayınları.,25-34.
- Boitrelle F, Shah R, Saleh R, Henkel R, Kandil H, Chung E, Vogiatzi P, Zini A, Arafa M, Agarwal A. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life (Basel)*. 2021 Dec 9;11(12):1368. doi: 10.3390/life11121368. PMID: 34947899; PMCID: PMC8706130.
- Borgen P.L., Wong G.Y., Vlaims V., Hoffmann B., Kinne D.W., Osborne M.P., McKinnon W.M. (1992). Current management of male breast cancer. *AnnSyrge*. 215(5): 451-457.
- Cakiroglu Y, Saltik A, Yuceturk A, Karaosmanoglu O, Kopuk SY, Scott RT, Tiras B, Seli E. Effects of intraovarianinjection of autologousplateletrichplasma on ovarianreserveand IVF outcomeparameters in womenwithprimaryovarianinsufficiency. *Aging (Albany NY)*. 2020 Jun 5;12(11):10211-10222. doi: 10.18632/aging.103403. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32507764; PMCID: PMC7346073.
- Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1996;65:972–6.
- Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl*. 1991 Mar-Apr;12(2):98-103. PMID: 2050585.
- Dehghani F, Sotoude N, Bordbar H, Panjeshahin MR, Karbalay-Doust S. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan. *Platelets*. 2019;30(4):513-520. doi: 10.1080/09537104.2018.1478400. Epub 2018 Jun 8. PMID: 29883240.
- Dehghani F, Sotoude N, Bordbar H, Panjeshahin MR, Karbalay-Doust S. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan. *Platelets*. 2019;30(4):513-520. doi: 10.1080/09537104.2018.1478400. Epub 2018 Jun 8. PMID: 29883240.

- Demir, R. 2006. Histoloji ve hücre biyolojisi. Palme Yayınları, 531-584, İstanbul.
- Desmet B, Joris H, Nagy Z, Liu J, Bocken G, Vankelecom A, et al. Selection of vital immotile spermatozoa for intracytoplasmic injection by the hypoosmotic swelling test. *Hum Reprod* 1994;9:24-31.
- Elder, K. ve Dale, B. 2011. In-vitro fertilization. Cambridge University Press. 32-34, UK.
- El-Sherbiny HR, Abdelnaby EA, Samir H, Fathi M. Addition of autologous platelet rich plasma to semen extender enhances cryotolerance and fertilizing capacity of buffalo bull spermatozoa. *Theriogenology*. 2022 Dec;194:104-109. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.09.029. Epub 2022 Oct 4. PMID: 36219886.
- Eşrefoğlu.M. Özel Histoloji İstanbul Tıp Kitabevi 2016 .2. Baskı, 335-347,İstanbul
- Evans A, Ibrahim M, Pope R, Mwangi J, Botros M, Johnson SP, Al Kassis S. Treating hand and foot osteoarthritis using a patient's own blood: A systematic review and meta-analysis of platelet-rich plasma. *J Orthop*. 2020 Jan 28;18:226-236. doi: 10.1016/j.jor.2020.01.037. PMID: 32071509; PMCID: PMC7015825.
- Evans A, Ibrahim M, Pope R, Mwangi J, Botros M, Johnson SP, Al Kassis S. Treating hand and foot osteoarthritis using a patient's own blood: A systematic review and meta-analysis of platelet-rich plasma. *J Orthop*. 2020 Jan 28;18:226-236. doi: 10.1016/j.jor.2020.01.037. PMID: 32071509; PMCID: PMC7015825.
- Farazmand T, Mansouri F, Koohestanidehaghi Y, Shahandeh E. Human sperm parameter improvement associated with *Ceratonia siliqua* extract as a cryopreservation supplement after vitrification. *Clin Exp Reprod Med*. 2023 Jun;50(2):86-93. doi: 10.5653/cerm.2022.05554. Epub 2023 May 11. PMID: 37258101; PMCID: PMC10258514.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5-6):503-10. doi: 10.1387/ijdb.082696hf. PMID: 18649263.
- Gartner L.P. ve Hiatt J.L. (2016) .Color Textbook of Histology (2. Baskı).
- Gartner L.P., Hiatt J.L. (1997).Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W. B. Saunders Company.493-98.
- Hammadeh, M.E., Askari, A.S., Georg, T., Rosenbaum, P. ve Schmidt, W. 1999. Effect of freeze- thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl*, 22(3); 155-162.
- Hammadeh, M.E., Askari, A.S., Georg, T., Rosenbaum, P. ve Schmidt, W. 1999. Effect of freeze- thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl*, 22(3); 155-162.
- Henkel R, Müller C, Miska W, Gips H, Schill WB. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod*. 1993 Dec;8(12):2128-32. doi: 10.1093/Oxford journals.humrep.a137994. PMID: 8150915.
- Henkel R, Müller C, Miska W, Gips H, Schill WB. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod*. 1993 Dec;8(12):2128-32. doi: 10.1093/Oxford journals.humrep.a137994. PMID: 8150915.
- Henkel, RR, Schil, WB. ART için sperm hazırlığı. *Reprod Biol Endocrinol* 1 , 108 (2003).

- Ikeda Y.(1996) .SF-1: a keyregulator of development and function in the mammalian reproductive system. *Acta Paediatr Jpn* .38(4): 412-419.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod*. 2004 Apr;19(4):932-9. doi: 10.1093/humrep/deh194. Epub 2004 Mar 11. PMID: 15016773.
- Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I, Isachenko E. Kriyoprotektanlar olmadan insan ICSI/IVF spermatozoasınınvitrikasyonu: yeni kapiler teknoloji. *J Androl*. 2012 Mayıs-Haziran;33(3):462-8. doi: 10.2164/jandrol.111.013789. Epub 2011 30 Haz. PMID: 21719694.
- Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I, Isachenko E. Kriyoprotektanlar olmadan insan ICSI/IVF spermatozoasınınvitrikasyonu: yeni kapiler teknoloji. *J Androl*. 2012 Mayıs-Haziran;33(3):462-8. doi: 10.2164/jandrol.111.013789. Epub 2011 30 Haz. PMID: 21719694.
- Jaiswal BS, Eisenbach M, Tur-Kaspa I. Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Mol Hum Reprod*. 1999 Mar;5(3):214-9. doi: 10.1093/molehr/5.3.214. PMID: 10333354.
- Jan Tesarik, Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon, *Human Reproduction*, Volume 4, Issue 8, 1 November 1989, Pages 957–961.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984 Jan;70(1):219-28. doi: 10.1530/jrf.0.0700219. PMID: 6694140.
- Johari GP. Theglasstransitionandthenature of theglassystate (EdsGoldstein M, Simha R); New York. *Ann N Y AcadSci*. 1976;279:117
- Junqueira I.C. , Carneiro J. ,Kalley R.O.(1998) . A Lange medical book. Çeviri editörü: Prof. Dr. Yener Aytekin. barış Kitabevi.
- Junqueira L.C. , Carneiro J. , Kelley R .O. , (1998) , ‘22. Bölüm Erkek Üreme Sistemi’, ‘Basic Histology 8th edition’
- Junquera, L., Carneiro, J. ve Kelley, R.O. 2009. Temel histoloji. Nobel Tıp, 418-433, İstanbul.
- Karagöz, E.(2002). Özel Histoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını, 196-199, Isparta.
- Karthikeyan M, Arakkal D, Mangalaraj AM, Kamath MS. Comparison of ConventionalSlowFreezeversusPermeableCryoprotectant-FreeVitrification of Abnormal Semen Sample: A RandomizedControlled Trial. *J Hum ReprodSci*. 2019 Apr-Jun;12(2):150-155. doi: 10.4103/jhrs.JHRS_154_18. PMID: 31293330; PMCID: PMC6594128.
- Keel, B.A., Webster, B.W. ve Roberts, D.K. 1987. Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 81(1); 213-220.
- Khosronezhad N, Hassanzadeh V, Hezavehei M, Shahverdi AH, Shahhoseini M. Comparative Epigenetic Analysis of Imprinting Genes Involved in Fertility, in Cryopreserved Human Sperms with Rapid Freezing versus Vitrification

- Methods. Cell J. 2023 Apr 1;25(4):238-246. doi: 10.22074/cellj.2023.1974291.1171. PMID: 37210644; PMCID: PMC10201361.
- Kierszenbaum A.L. (2002). Histology and Cell Biology. 1st. Edition. Editor: Kierszenbaum AL. Missouri, Mosby, Inc., Çeviri editörü: Demir R.;531-64.3.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril. 1988 Jan;49(1):112-7. doi: 10.1016/s0015-0282(16)59660-5. PMID: 3335257.
- Kuruş M. (2020). Histoloji. Hücre,Doku, Sistemler.Teknik Moleküller-LaboratuvarKlinik Yönleriyle yaklaşımlar (1. baskı) (s.880- 930). Ankara: Akademisyen Kitabevi.
- Lee M.M., Donahoe P.K. (1993). Mullerian.inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. EndocrRev 14(2): 152-164.
- Li XL, Wang GR, Jing YY, Pan MM, Dong CF, Zhou RM, Wang ZY, Shi Q, Gao C, Dong XP. Cytosolic Pr Pinduces apoptosis of cell by disrupting microtubule assembly. J Mol Neurosci. 2011 Mar;43(3):316-25. doi: 10.1007/s12031-010-9443-9. Epub 2010 Sep 14. PMID: 20838
- Li XL, Wang GR, Jing YY, Pan MM, Dong CF, Zhou RM, Wang ZY, Shi Q, Gao C, Dong XP. Cytosolic Pr Pinduces apoptosis of cell by disrupting microtubule assembly. J Mol Neurosci. 2011 Mar;43(3):316-25. doi: 10.1007/s12031-010-9443-9. Epub 2010 Sep 14. PMID
- Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, White JG, Escolar G, Galan AM. Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. Cardiovasc Res. 2009 Nov 1;84(2):309-16. doi: 10.1093/cvr/cvp205. Epub 2009 Jun 18. PMID: 19541671.
- Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, White JG, Escolar G, Galan AM. Serotonin enhances platelet procoagulant properties and the activation induced during platelet tissue factor uptake. Cardiovasc Res. 2009 Nov 1;84(2):309-16. doi: 10.1093/cvr/cvp205. Epub 2009 Jun 18. PMID: 19541671
- M.J. Gomez-Torres, L. Medrano, A. Romero, P.J. Fernández-Colom, J. Aizpurúa, Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation, Cryobiology 78 (2017) 90–94
- Moore K.L., Dalley A.F., (1995). Clinically Oriented Anatomy, Williams & Wilkins, Int Ed. 1995. İlgili Bölüm No: 3 The Pelvis And Perineum, Sayfa: 278-281, 307-313.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N. ve Torchia, M.G. 2016. Before we are born, essentials of embryology and birth defects. Elsevier, 11-20, Philadelphia.
- Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M, Zeinoaldini S. Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. Cryobiology. 2014 Oct;69(2):217-22. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.007. Epub 2014 Jul 19. PMID: 25050864.
- Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B.P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., de Rooij, D.G. ve Vicini, E. 2013. Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. Biol Reprod, 89(3); 60.
- Nabavinia, MS, Yari, A., Ghasemi-Esmailabad, S. *et al.* Bir kriyoprotektan takviyesi olarak trombosit bakımından zengin plazma ile insan sperm özelliklerinin iyileştirilmesi. Hücre Doku Bankası 24 , 307–315 (2023).

- Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Janssen, M., Vanheusden, E., Castro-Sanchez, Y., Thijs, H. ve Ombelet, W. 2009. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*, 19(2); 202-206.,
- Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008;25:403-411.
- Pampiglione JS, Tan SL, Campbell S. The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1993 Jun;59(6):1280-4. doi: 10.1016/s0015-0282(16)55990-1. PMID: 8495778.
- Pérez-Marín CC, Quevedo L, Salas M, Arando A. Ultra-Rapid Freezing Using Droplets Immersed into Liquid Nitrogen in Bull Sperm: Evaluation of Two Cryoprotective Disaccharides and Two Warming Temperatures. *Biopreserv Biobank*. 2022 Nov 17. doi: 10.1089/bio.2022.0075. Epub ahead of print. PMID: 36394463.
- Raad G, Bakos HW, Bazzi M, Mourad Y, Fakih F, Shayya S, Mchantaf L, Fakih C. Differential impact of four sperm preparation techniques on sperm motility, morphology, DNA fragmentation, acrosome status, oxidative stress, and mitochondrial activity: A prospective study. *Andrology*. 2021 Sep;9(5):1549-1559. doi: 10.1111/andr.13038. Epub 2021 Jun 18. PMID: 33999521.
- Ross, M.H. Pawlina, W. (2006). *Histology- A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 5. Baskı, Lippincott W&W, Philadelphia.
- Sayed WM, Elzainy A. Impact of platelet-rich plasma versus selenium in ameliorating induced toxicity in rat testis: histological, immunohistochemical, and molecular study. *Cell Tissue Res*. 2021 Jul;385(1):223-238. doi: 10.1007/s00441-021-03439-2. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33791879.
- Schultz CL, Tchume-Johnson T, Jackson T, Enniful-Eghan H, Schapira MM, Smith-Whitley K. Reproductive intentions in mothers of young children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 May;67(5):e28227. doi: 10.1002/pbc.28227. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32065500.
- Scully D, Sfyri P, Verpoorten S, Papadopoulos P, Muñoz-Turrillas MC, Mitchell R, Aburima A, Patel K, Gutiérrez L, Naseem KM, Matsakas A. Platelet releasate promotes skeletal myogenesis by increasing muscle stem cell commitment to differentiation and accelerates muscle regeneration following acute injury. *Acta Physiol (Oxf)*. 2019 Mar;225(3):e13207. doi: 10.1111/apha.13207. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30339324.
- Scully D, Sfyri P, Verpoorten S, Papadopoulos P, Muñoz-Turrillas MC, Mitchell R, Aburima A, Patel K, Gutiérrez L, Naseem KM. et al. Platelet releasate promotes skeletal myogenesis by increasing muscle stem cell commitment to differentiation and accelerates muscle regeneration following acute injury. *Acta Physiol* 2019;225: e13207.
- Scully, D., Sfyri, P., Wilkinson, H. N., Acebes-Huerta, A., Verpoorten, S., Muñoz-Turrillas, M. C., ... Matsakas, A. (2020). Optimising platelet secretomes to deliver robust tissue-specific regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(1), 82–98. <https://doi.org/10.1002/term.2965>
- Setchell B.P., Brooks D.E.(1988).Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. *The Physiology of Reproduction*. (Knobil E, Neill JD, ed). New York, Raven.753-836.

- Shen L, Yuan T, Chen S, Xie X, Zhang C. The temporaleffect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res.* 2017 Jan 23;12(1):16. doi: 10.1186/s13018-017-0521-3. PMID: 28115016; PMCID: PMC5260061.
- Shen L, Yuan T, Chen S, Xie X, Zhang C. The temporaleffect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res.* 2017 Jan 23;12(1):16. doi: 10.1186/s13018-017-0521-3. PMID: 28115016; PMCID: PMC5260061.
- Shen, J., Sampietro, S., Wu, J., Tang, J., Gupta, S., Matzko, C. N., ... Stalker, T. J. (2017). Coordination of platelet agonist signaling during the hemostatic response in vivo. *Blood Advances*, 1(27), 2767–2775. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017009498>
- Tello-Mora P, Hernández-Cadena L, Pedraza J, López-Bayghen E, Quintanilla-Vega B. Acrosome reaction and chromatin integrity as additional parameters of semen analysis to predict fertilization and blastocyst rates. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Oct 19;16(1):102. doi: 10.1186/s12958-018-0408-0. PMID: 30340492; PMCID: PMC6195742.
- Wang M, Todorov P, Isachenko E, Rahimi G, Wang W, von Brandenstein M, Kumar P, Mallmann P, Isachenko V. Aseptic capillary vitrification of human spermatozoa: Cryoprotectant-free vs. cryoprotectant-included technologies. *Cryobiology.* 2021 Apr;99:95-102. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.01.006. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33422478.
- WHO.(2021). Laboratory Manual For the Examination and Processing of Human Semen 5 th ed. ISBN: 978 92 4 154778 9.
- Wiser A, Sachar S, Ghetler Y, Shulman A, Breitbart H. Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: preliminary results. *Andrologia.* 2014 Apr;46(3):313-5. doi: 10.1111/and.12068. Epub 2013 Jan 28. PMID: 23356546.
- World Health Organization. (2021). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wraith KS, Magwenzi S, Aburima A, Wen Y, Leake D, Naseem KM. Oxidized low-density lipoproteins induce rapid platelet activation and shape change through tyrosine kinase and Rho kinase-signaling pathways. *Blood.* 2013 Jul 25;122(4):580-9. doi: 10.1182/blood-2013-04-491688. Epub 2013 May 22. PMID: 23699602; PMCID: PMC3724193.
- Xu J, Gou L, Zhang P, Li H, Qiu S. Platelet-rich plasma and regenerative dentistry. *Aust Dent J* 2020;65:131–142.
- Xu J, Gou L, Zhang P, Li H, Qiu S. Platelet-rich plasma and regenerative dentistry. *Aust Dent J* 2020;65:131–142.
- Yan B, Zhang Y, Tian S, Hu R, Wu B. Effect of autologous platelet-rich plasma on human sperm quality during cryopreservation. *Cryobiology.* 2021 Feb;98:12-16. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.01.009. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33476642.

- Zeginiadou T, Papadimas J, Mantalenakis S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia*. 2000 Nov;32(6):335-43. doi: 10.1046/j.1439-0272.2000.00359.x. PMID: 11131842.
- Zhu J, Jin RT, Wu LM, Johansson L, Guo TH, Liu YS, Tong XH. Cryoprotectant-free ultra-rapidfreezing of humanspermatozoa in cryogenicvials. *Andrologia*. 2014 Aug;46(6):642-9. doi: 10.1111/and.12131. Epub 2013 Jul 3. PMID:23822810.

7.SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP: Adenosindifosfat
ARIC: İndüklenmiş Akrozomal Reaksiyon
AMH: Anti-Müllerian Hormon
ATP: Adenosintrifosfat
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit
FITC-PSA: Floresan izotiyosiyanat -Pisumsativum
FSH: FollikülStimüleEdici Hormon
GDP: Guanozindifosfat
GTP: Guanozintrifosfat
HOS: Hipo-Osmolar Şişme
ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IUI: İntrauterin İnseminasyon
IVF: İn Vitro Fertilizasyon
LH: Luteinizan Hormon
PRP: Plateletten Zengin Plazma
SRY: Y Kromozomu Üzerinde Cinsiyet Belirleyen Bölge
SS: Sperm Solüsyonu
YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

8.EKLER

EK1

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Farklı Sperm Vitrifikasyon Protokollerinde Trombositten Zengin Plazmanın Sperm Kalitesine Etkisi			
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26			
	AÇIK ADRESİ	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.1 Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa			
	TELEFON	0.224. 295 00 20			
	FAKS	0.224. 295 00 29			
	E-POSTA	uukaek@uludag.edu.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Berrin Avcı			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD-Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Tıp Bebek Merkezi			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Doç.Dr.Işıl Kasapoğlu -Yüksek Lisans Öğrencisi Alim Ganiyev			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	-Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hast. ve Doğum AD -Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif araştırma			
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez çalışması			
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	15.07.2022 / 1 yıl			
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	20			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı		Tarihi	Dili	
	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU		29.04.2022	Türkçe	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Hasta grubu)		29.04.2022	Türkçe	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Sağlıklı kontrol grubu)		29.04.2022	Türkçe	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama		
	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU		☒	Tarih:29.04.2022	
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU		☒	Tarih:29.04.2022	
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLI GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ		☒	Tarih:29.04.2022	
	IKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname		☒	Tarih:29.04.2022	
	SONUÇ ÖZET RAPORU		☐		
	DİĞER:		☒	Araştırma ilk başvuru ön yazısı (Tarih: 29.04.2022), sorumlu araştırmacı özgeçmişi, tüm araştırmacılar tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür	

EK 2

LÜTFEN BU DÖKÜMANI DİKKATLİCE OKUMAK İÇİN ZAMAN AYIRINIZ

Sayın.....

Sizi Bursa Uludağ Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi Laboratuvarların'da yürütülen "Farklı sperm vitrifikasyon protokollerinde trombositten zengin plazmanın sperm kalitesine etkisi" başlıklı **araştırmaya** davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın niçin ve nasıl yapılacağını, bu araştırmanın gönüllü katılımcılara getireceği olası faydaları, riskleri ve rahatsızlıklarını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. İsterseniz bu bilgileri aileniz, yakınlarınız ve/veya doktorunuzla tartışınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde, gerekli yerleri siz, doktorunuz ve kuruluş görevlisi bir tanık tarafından doldurup imzalanmış bu formun bir kopyası saklamanız için size verilecektir.

Araştırmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkında sahipsiniz. Her iki durumda da bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır.

Araştırma Sorumlusu
Doç. Dr. Berrin AVCI

Araştırmanın Amacı:

(Çalışmanın araştırma amaçlı olduğu mutlaka belirtilmeli, gönüllünün anlayabileceği sade bir dil kullanılmalı ve kısaltılmış ifadeler açıklanmalıdır).

Bu çalışmada üremeye yardımcı tedavi yaklaşımlarından biri olan üreme potansiyelini koruma protokolünde uygulanan sperm dondurma/çözme işleminde, sperm canlılığı, hareket kabiliyeti ve fertilizasyon potansiyeli açısından optimum sonuç veren protokolü belirlemek amaçlanmıştır.

İzlenecek Olan Yöntem ve Yapılacak İşlemler:

(İzlenecek olan yöntem ve yapılacak bütün işlemler -invazif olsun veya olmasın- açık ve anlaşılır bir şekilde belirtilmeli, kan, idrar gibi hasta materyallerinin kullanıldığı çalışmalarda, bu örneklerin alınma sıklığı ve miktarları, alınma şekli, bu işlemlere bağlı olarak ortaya çıkabilecek olumsuzluklar veya riskler mutlaka yazılmalıdır)

Hastadan bir defa semen örneği alınacak, Aynı gün hastadan bir defa 15 ml İntravenöz kan alınacak, trombositten zengin plazma eldesi gerçekleştirilecek.

Trombositten zengin plazma semen örneğine eklenerek dondurma işlemi gerçekleştirilecektir. Dondurulan örneğin çözme sonrası semen parametreleri değerlendirilecektir.

Çalışmaya katılan gönüllü için herhangi bir risk teşkil etmemektedir.

Araştırmanın Yapılacağı Yer(ler):

Bursa Uludağ Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi Laboratuvarlarında

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarlarında

Araştırmaya Katılan Araştırmacılar:

Doç. Dr. Berrin Avcı

Doç. Dr. Işıl Kasapoğlu

Yüksek lisans öğrencisi Alim Ganiyev

Araştırmanın Süresi: 12 Ay

Katılması Beklenen Gönüllü Sayısı: 20

Size Getirebileceği Olası Faydalar:

(Gönüllülerin çalışmaya katılmasını teşvik edecek veya yönlendirecek ifadelerden kaçınılmalıdır)

Dondurulan örneklerde trombositten zengin plazma eklenen grupta çözme sonrası canlılık oranlarının yüksek çıkmasıyla klinik kullanımda uygulama önerilebilir.

Size Getirebileceği Ek Risk ve Rahatsızlıklar:

(Gönüllünün başına gelebilecek, makul olarak öngörülebilir her türlü risk ve rahatsızlık (örneğin ağrı, enfeksiyon riski, tedavideki olası başarısızlık vb) açıkça belirtilmelidir. Minimal riskten fazla bir riski bulunan araştırmalarda bunun nasıl giderileceği veya tedavi edileceği açıkça belirtilmelidir.)

Çalışmaya katılan gönüllü için herhangi bir risk faktörü bulunmamaktadır.

Katılma ve Çıkma:

Bu araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahiptir. Ayrıca sorumlu araştırmacı gerek duyarsa sizi çalışma dışı bırakabilir. Çalışmaya katılmama, çalışmadan çıkma veya çıkarılma durumlarında bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır.

Masraflar:

(Bu bölümde çalışma masraflarının hangi kaynaktan karşılanacağı belirtilmelidir.)

Çalışma masrafları Bilimsel Araştırma Programı tarafından karşılanacaktır.

İletişim Kurulacak Kişi(ler):

(Çalışma ile ilgili olarak bilgi alma veya meydana gelebilecek herhangi bir olumsuz durumda günün 24 saatinde ulaşılabilir kişilerin isim ve telefon numaraları belirtilmelidir)

Doç.Dr.Berrin AVCI
Yükseklisan Öğrencisi Alim GANIYEV

Tel: 05325649907
Tel: 05380135706

Gizlilik:

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak ve kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Ben,.....[gönüllünün adı, soyadı (kendi el yazısı ile)] Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum.Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. **Çalışma hakkında soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı.**Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi ve araştırmadan ayrıldığım zaman mevcut tedavimin olumsuz yönde etkilenmeyeceğini biliyorum.

Bu koşullarda;

- 1) Söz konusu Klinik Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı (çocuğumun/vasimin bu çalışmaya katılmasını) kabul ediyorum.
- 2) Gerek duyulursa kişisel bilgilerime mevzuatta belirtilen kişi/kurumkuruluşların erişebilmesine,
- 3) Çalışmada elde edilen bilgilerin (*kimlik bilgilerim gizli kalmak koşulu ile*) yayın için kullanılma, arşivleme ve eğer gerek duyulursa bilimsel katkı amacı ile ülkemiz dışına aktarılmasına olur veriyorum.

Çalışma Kapsamında Katılımcıdan Biyolojik Örnek Alınması Durumunda Aşağıdaki Bölüm Katılımcı Tarafından Doldurulmalıdır:

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin gelecekte her türlü genetik çalışmada (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

Gönüllünün (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Adresi:

(varsa Telefon No, Faks No):

Tarih (gün/ay/yıl):/..../....

Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin

Veli veya Vasisinin (kendi el yazısı ile)

Adı Soyadı:

İmzası:

Adresi:

Varsa Telefon No, Faks No:

Tarih (gün/ay/yıl): .../.../....

Onay Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş
Görevlisinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih (gün/ay/yıl):...../...../.....

Açıklamaları Yapan Kişinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih (gün/ay/yıl):.../.../.....

NOT: Bu formun bir kopyası gönüllüde kalacak, diğer kopyası ise hasta dosyasına yerleştirilecektir. Hasta dosyası veya protokol numarası olmayan sağlıklı gönüllülerden alınacak onam formunun bir kopyası mutlaka sorumlu araştırmacı tarafından saklanacak

9.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgileri, tecrübesi ve sabrıyla her zaman bana destek olan, aynı zamanda yüksek lisans tez çalışmamın planlanıp tamamlanmasına kadar geçen süreçte her zaman yanımda olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam Bursa Uludağ Üniveristesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Berrin AVCI'ya teşekkür ederim.

Eğitimim süresince bilgilerini desteğini ve zamanını esirgemeyen her zaman tecrübeleriyle yanımda olan kıymetli hocam Bursa Uludağ Üniveristesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Öğretim üyesi Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen, görüş ve önerileriyle her zaman destek olan, bilgi birikimleriyle her zaman yol gösterici olan değerli hocalarım Bursa Uludağ Üniveristesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Prof. Dr. Semiha ERSOY'a, Prof. Dr. Zehra MİNBAY'a, Dr. Öğr. Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN ve Uzm. Dr. Cihan ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Eğitimim süresince ufkumu geliştiren akademisyenlik yolunda yoluma ışık tutan Bursa Uludağ Üniveristesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Abd. Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Gürkan UNCÜ ve Doç. Dr. Işıl KASAPOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca zaman ayıran, her zaman yanımda olan tezimin deney aşamalarında yardımlarını esirgemeyen sabrı ve tecrübeleriyle destek olan Araş. Gör. Dr. Gökten KUŞPINAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bana yardımcı olan Bursa Uludağ Üniveristesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteğinesirgemeyen ve çalışmalarımda kolaylık sağlayan Bursa Uludağ Üniveristesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezinde çalışan ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan bana yol gösteren emeklerini ödeyemeyeceğim kıymetli ailem, annem Hacer GANİGİL, babam Ramiz GANİGİL, abim Ethem GANİGİL ve bu zorlu süreçte en büyük destekçim olan eşim Rabiya GANİYEV'e sonsuz teşekkür ederim.

10.ÖZGEÇMİŞ

Alim GANİYEV, Üniversiteye kadar olan eğitimini Azerbaycan'da tamamladı. 2011-2013 yılları arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık hizmetleri meslek yüksek okulu Tıbbi Laboratuvar Teknikerliği bölümünü başarıyla bitirdi. 2013-2018 yılları arasında Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü başarıyla tamamladı. 2018-2023 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bilimsel hazırlık eğitimi ile birlikte yüksek lisans öğrenimini sürdürmektedir.