Seda IŞIKLAR

T.C.
BURSAULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ANABİLİM DALI

KISA ABSTİNENS SÜRESİYLE ARDIŞIK EJAKÜLASYONUN SPERM KROMATİN BÜTÜNLÜĞÜ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTEYE ETKİSİ

Seda IŞIKLAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2021

HİSTOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021

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

KISA ABSTİNENS SÜRESİYLE ARDIŞIK EJAKÜLASYONUN SPERM KROMATİN BÜTÜNLÜĞÜ VE ANTİOKSİDANAKTİVİTEYE ETKİSİ

Seda IŞIKLAR

0000-0003-3922-2009

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç.Dr. Berrin AVCI

0000-0001-8135-5468

BURSA-2021

T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "**Kısa abstinens süresiyle ardışık ejakülasyonun sperm kromatin bütünlüğü ve antioksidan aktiviteye 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.

Seda IŞIKLAR

Tarih ve İmza

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Seda IŞIKLAR tarafından hazırlanan **'Kısa abstinens süresiyle ardışık ejakülasyonun sperm kromatin bütünlüğü ve antioksidan aktiviteye etkisi'**konulu Yüksek Lisans tezi 13/07/21 günü, 10:00-11:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	**İmza**
Tez Danışmanı	Doç.Dr.BerrinAVCI	
Orcid id numarası	0000-0001-8135-5468	
Üye	Prof.Dr.Meltem KURUŞ	
Orcidid numarası	0000-0002-2455-9605	
Üye	Doç.Dr.Işıl KASAPOĞLU	
Orcidid numarası	0000-0002-1953-2475	
Üye		
Orcidid numarası		
Üye		
Orcidid numarası		

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ……. tarih ve ……. sayılı toplantısında alınan …… numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

05/07/21

Adı Soyadı: Seda IŞIKLAR
Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Konusu: Kısa abstinens süresiyle ardışık ejakülasyonun sperm kromatin bütünlüğü ve antioksidan aktiviteye 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

Unvanı Adı Soyadı: Doç.Dr. Berrin AVCI

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **II**
KABUL ONAY ..... **III**
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... **IV**
İÇİNDEKİLER ..... **V**
TÜRKÇE ÖZET ..... **VIII**
İNGİLİZCE ÖZET ..... **IX**
1.GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ **3**
2.1.1. Testis **3**
2.1.1.1.Testis Embriyolojisi **4**
2.1.1.2.Testis Histolojisi **4**
2.1.1.2.1. SeminiferTübüller **6**
2.1.1.2.2.İnterstisyel Alan **10**
2.1.1.2.3. Kan-Testis Bariyeri **10**
2.1.1.2.4. İntratestiküler Kanallar **10**
2.1.2. Ekstratestiküler Kanallar **11**
2.1.2.1.Duktuli Efferentes **11**
2.1.2.2. Duktus Epididimis **11**
2.1.2.3.Duktus Deferens **11**
2.1.2.4. Duktus Ejakülatoryus **12**
2.1.3.Yardımcı Genital Bezler **12**
2.1.3.1.Vesikula Seminalis **12**
2.1.3.2. Prostat **12**
2.1.3.3. Bulboüretral Bezler **12**
2.1.4. Penis **13**
2.2. RUTİN SEMEN ANALİZİ **13**
2.2.1.Makroskobik Değerlendirme **15**
2.2.2.Likefaksiyon **15**
2.2.3. Viskozite **15**
2.2.4. Semen hacmi **15**

2.2.5. Semen pH Değeri ..16
2.2.6. Sperm Motilitesi ..16
2.2.7. Sperm Vitalitesi .16
2.2.8. Sperm Sayısı ..16
2.2.9. Semen Mikroskobik İnceleme ...17
2.3. SPERM DNA BÜTÜNLÜĞÜ ...19
2.3.1.Sperm Kromatin Bütünlüğü ..20
2.3.2. Sperm DNA Hasarı ve ROS ..20
2.3.3. Sperm DNA Hasarı ve Apoptozis ..20
2.3.4.Kromozomal Aberasyonlar ..21
2.4. SPERM KROMATİNİ VE DNA ANALİZİ TESTLERİ ..21
2.4.1.Sperm Kromatin Yapısı Tayini (Sperm Chromatin Structure Assay)(SCSA) .21
2.4.2.Akridin Turuncu Testi (AcridineOrange Test) (AOT)..21
2.4.3.Terminal UridineNick- End Labeling (TUNEL) Yöntemi .21
2.4.4.İn situ Nick Translasyon (NT Testi) 22
2.4.5.Halo Sperm Yöntemi-Sperm Chromatin Dispersion (SCD) 22
2.4.6.Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET) ..22
2.4.7.Sperm Kromatin Analizi 22
2.4.7.1.Anilin Mavisi Boyama 22
2.4.7.2.Toluidine Mavisi Boyama 23
2.4.8. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) 23
2.4.9. Reaktif oksijen radikalleri kaynakları 23
2.5. OKSİDATİF STRES 24
2.5.1.Oksidatif stresin ölçümü .24
2.6.SPERMATOZOONDA ANTİOKSİDAN SİSTEMİ 25
2.7. ABSTİNENS (CİNSEL PERHİZ) SÜRESİ VE SEMEN PARAMETRELERİ 25
2.8. SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİ .26
2.8.1. Basit yıkama 26
2.8.2. Direkt yüzdürme tekniği (Swim-up) 27
2.8.3. Dansite Gradient Yöntemi .28
2.9. ÇALIŞMANIN AMACI 29
3.GEREÇVEYÖNTEMLER .30
3.1.HastaSeçimi 30
3.2.Semen Örneklerinin Eldesi 30
3.3.Hasta Grupları 31
3.4.Semen Örneklerine Uygulanan İncelemeler ve İşlemler 31
3.4.1.Spermiyogram Testi .32
3.4.2.Basit Yıkama Yöntemi ile Sperm Eldesi 32
3.4.3. Spermlerin Morfolojik Değerlendirmesi 33

3.4.4.Spermlerin Vitalite Değerlendirilmesi..... 34
3.4.5. Anilin Mavisi Boyama Yöntemi 35
3.4.6.Tunel Boyama Protokolü 35
3.4.7 Elisa Protokolü 37
4.BULGULAR 38
4.1.Rutin Semen Parametreleri Sonuçları 38
4.2.Sperm Kromatin Bütünlüğü, DNA Fragmantasyonu ve Antioksidan Aktivite Analizi Sonuçları 44
5.TARTIŞMA VE SONUÇ..... 49
6.KAYNAKLAR..... .55
7.SİMGELER VE KISALTMALAR..... 65
8.EKLER.....66
9.TEŞEKKÜR..... 72
10.ÖZGEÇMİŞ..... 73

TÜRKÇE ÖZET

Üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında tercih edilen tedavi yaklaşımına göre semen parametrelerinin embriyoloji laboratuvarı parametrelerine ve klinik başarıya etkisi değişmektedir. Semen parametreleri abstinens süresi ve androloji laboratuvarında uygulananyıkama protokollerine göre değişmekte ve inseminasyonda kullanılacak sperm materyalinin kalitesini etkilemektedir. Bu çalışmada normozoospermik erkeklerde kısa abstinens süresinin rutin semen parametrelerine, sperm kromatin ve DNA bütünlüğüne, oksidatif strese karşı gelişen antioksidan kapasiteye etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aynı hastadan ardışık ejakulasyonla2-5 günlük abstinens süresi sonrası (n=36) ve 1 saat abstinens süresi sonrası(n=36) alınan numuneler yıkama öncesi ve yıkama sonrası değerlendirildi.Yıkama öncesinde abstinens süresine bağlı olarak sperm volümünün ve total motil sperm sayısının kısa abstinens süresi aleyhine anlamlı olarak değiştiği, yıkama sonrasında motilitenin değişmediği, konsantrasyonun kısa abstinens grubunda anlamlı azaldığı görüldü. Abstinens süresi kısa tutulduğunda sperm kromatin hasarının ve DNA fragmantasyon oranının azaldığı, antioksidan kapasitede bir değişiklik oluşturmadığı saptandı. Bu çalışmanın sonucunda abstinens süresinin kısa tutulması sperm konsantrasyonunu ve bununla bağlantılı olarak total progressif sperm sayısını azaltmakla birlikte, normozoospermik olgularda uygulanacak üremeye yardımcı tedavi yaklaşımına göre inseminasyonda kromatin ve DNA bütünlüğü açısından daha kaliteli sperm kullanılmasına imkan sağlayacaktır. Ardışık ejakulasyon ve abstinens süresindeki kısalma aktioksidan kapasitede olumlu ya da olumsuz bir etki oluşturmamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Semen analizi, sperm DNA fragmantasyonu, sperm morfolojisi, anilin mavisi, total antioksidan kapasitesi

İNGİLİZCE ÖZET

The effect of sequential ejaculation with short abstinence time on sperm chromatin integrity and antioxidant activity

The effect of semen parameters on embryology laboratory parameters and clinical successvaries according to the preferred treatment approach in assisted reproductive therapy. Inthisstudy, it was aimed to evaluate the effect of short abstinence period on routine semen parameters, sperm chromatinand DNA integrity, antioxidant capacity against oxidative stress in normozoospermic men. Samples taken from the same patient after 2-5 days of abstinence with sequential ejaculation (n=36) and after one hour of abstinence time (n=36) were evaluated before and after washing. It was observed that the motility did not change after washing, and the concentration decreased significantly in the short abstinence group. It was determined that sperm chromatin damageand DNA fragmentation rate were reduced when the abstinence period was kept short, and no change in antioxidant capacity was observed. It will allow the use of higher quality sperm in terms of The shortening of consecutive ejaculation and abstinence times does not have a positive or negative effect on the antioxidant capacity.

Keywords: Semen analysis, sperm DNA fragmentation, sperm morphology, aniline blue, total antioxidant capacity

1.GİRİŞ

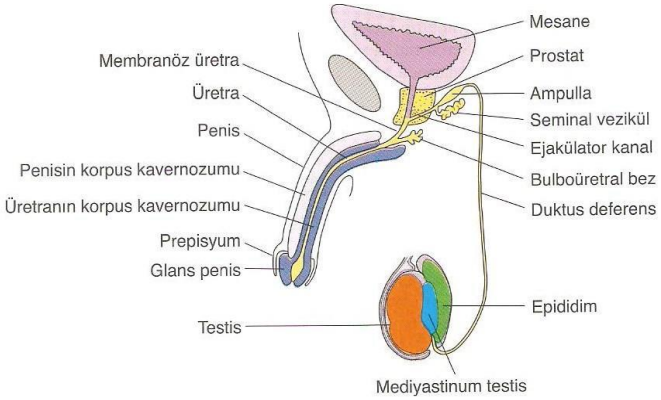
Semenin rutin analizinde değerlendirilen parametreler olan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi erkek infertilitesini tanımlamada önemli faktörlerdir (Agarwal ve ark.,2014; Barratt ,2007). Semen numunelerinin güvenilir yorumu için 2-7 günlük abstinens süresinin olması istenir. Çünkü semen hacmi, sperm konsantrasyonu ve ejakulattaki toplam sperm sayısı, ilk 24 saatte belirgin olacak şekilde, 4-10 güne kadar artan abstinens süresine bağlı olarak göreceli şekilde artar. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda 24 saatlik abstinens süresi sonrası verilen ejakütta sperm motilite ve morfolojisinde iyileşme sağlandığı görülmüştür (Francavilla ve ark.,2007; Jørgensen ve ark.,2001; Jørgensen ve ark.,2012;Lehavi ve ark.,2014; Levitas ve ark.,2005; Makkar ve ark.,2001, Mortimer ve ark.,1982). Normozoospermik örneklerde semen parametrelerinin artan abstinens süresi ile birlikte iyileştiği, ancak oligozoospermik örneklerde konsantrasyon, motilite ve morfolojinin abstinens süresi azaldıkça artış gösterdiği vurgulanmıştır (Bahadur ve ark.,2015; Levitas ve ark.,2005). Testiste spermatositogenez ve mayoz bölünmenin tamamlanmasıyla birlikte, Spermatozoa intratestiküler duktuslardan ekstratestiküler duktuslara geçer ve ejakulasyona kadar epididimiste depolanır (Cooper ve ark.,1993). Uzun abstinens süresi, epididimiste depolanma sürecinde anormal spermatozoa sayısının ve granülositler tarafından üretilen reaktif oksijen radikallerinin (ROS) artışına sebep olur. ROS artışı sperm kromatin kondansasyon anomalilerine ve sperm DNA'sında kırıklara neden olur (Agarwal ve ark.,2009; Donatella ve ark.,2019). İnfertil erkek semeninde lökositler ve matürasyonunu tamamlamamış, anormal veya ölü spermatozoalar seminal sıvıda ROS artışının iki ana sebebidir (Fujii ve ark., 2003). Bu nedenle sperm DNA fragmantasyonu ve abstinens süresi arasında anlamlı pozitif ilişki olduğu düşünülmektedir (Gosalvez ve ark., 2011; Richthoff ve ark., 2002). Ejakülatta hücrenin reaktif oksijen türleriyle uyarılmasını sağlayan lipit peroksidasyonundan koruyan antioksidanlar da mevcuttur (Sharmave ark., 1996). İdiyopatik infertil erkek popülasyonunda antioksidan kapasitenin fertil olgulardan daha düşük olduğu gösterilmiştir (Agarwal ve ark., 2006). Bununla birlikte abstinens süresinin hem rutin hem de ileri sperm parametreleri üzerindeki etkisine, antioksidan kapasite üzerine etkisine yönelik fikir birliği sağlanmış değildir (WHO, 2010).

Bu bilgiler doğrultusunda ardışık olarak alınan semen örneklerinde abstinens sürelerindeki farklılıkların rutin semen parametreleri, kromatin bütünlüğü, DNA yapısı ve antioksidan aktiviteye etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi; testisler, boşaltıcı kanallar, yardımcı genital bezler ve penisten oluştuşur (Şekil 1). Testis ekzokrin ve endokrin bez özelliğine sahiptir. İntra testiküler (tubuli rekti ve rete testis) ve ekstra testiküler (duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius) kanallar spermin vücut dışına iletilmesini sağlayan kanallar sistemidir. Yardımcı genital bezler vezikula seminalis, prostat ve bulbo ürethral bezlerden oluşur. Seminal sıvı genital bezlerin ürettiği salgılardan oluşmaktadır. Bu salgılar spermin beslenmesinde önemli rol üstlenirler. Penis ejakulatın vücut dışına aktarılmasından ve idrarın boşaltılmasından sorumludur (Kuruş, 2020).



Şekil 1. Erkek Üreme Sistemi Bileşenleri

(Junqueira , & Carneiro, 2009)

2.1.1. Testis

Spermatik kordonla skrotum içinde asılı bulunan bir çift organdır. Skrotum testis sıcaklığının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Testis sıcaklığı normal vücut sıcaklığından 3-4ºC daha düşüktür. İnsanlarda testisin uzunluğu yaklaşık 4-5 cm, genişliği 2,5 cm, kalınlığı 3 cm ve ağırlığı da 20-30 gr civarındadır.

2.1.1.1.Testis Embriyolojisi

Embriyoner gelişimin 3. haftasında vitellus kesesinin endoderminde primordiyal germ hücreleri görülür. Gelişimin 5. haftasında primordiyal germ hücreleri embriyon diskinde gonadlar gelişeceği bölgeye göç ederler. Böylelikle gonadların gelişimi uyarılır. Gelişimin başlangıcında ovaryum ve testisinin morfolojik yapısı birbirine benzer görünümdedir. Bu sürece farklılaşmamış gonad adı verilir. Gonadların erkek ya da dişi olma özellikleri 7. haftadan sonra belirlenir. Y kromozomunda bulunan SRY geninin ürünü olan testis belirleyici faktör (TDF) gonadlarda testis oluşumunda önemli rol üstlenir. TDF'ün etkisiyle primitif cinsiyet kordonları gelişir. Puberteye kadar testis kordları olarak adlandırılır ve puberte de seminifer tübüllere dönüşür. Mezonefrozdan testise göç eden mezenkimal hücreler Leydig hücrelerine farklılaşır. Leyding hücreleri mezenkimal kök hücrelerin kökenini oluşturur. Gestasyonel dönemin 8. Haftasında Leydig hücrelerinden testesteron salınımı başlar. Testosteron salınımı epididimis vaz deferens ve aksesuar bezlerin oluşumunu sağlar (Ikeda ve ark.,1996). Sertoli hücreleri anti mullerian hormon (AMH) oluşumunu sağlarlar (Lee ve ark.,1993).

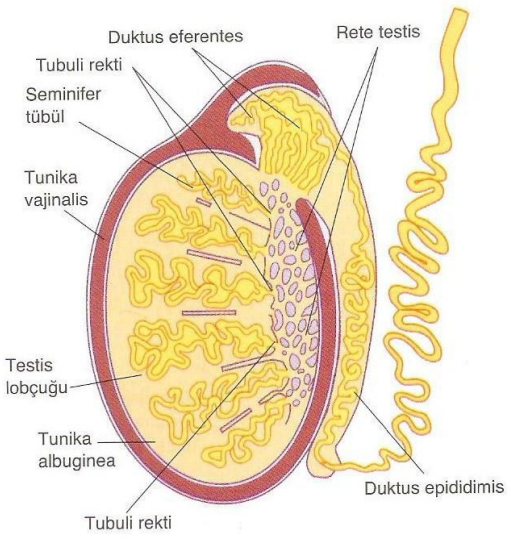
2.1.1.2.Testis Histolojisi

Testis ekzokrin ve endokrin yapıda bileşik tübüler bir bezdir. Testis ekzokrin olarak aktif holokrin salgı yapar. Aktif holokrin salgı ürünü, spermium ve spermatozoa üretimidir. Endokrin olarak ise androjen sentezler.

Testis üç tabakadan oluşur (Şekil 2). En dış tabakasında tunika vajinalis yer alır. Orta tabakayı tunika albuginea oluşturur. İç tabaka da ise tunika vaskuloza yer alır (Kuruş, 2020). Tunika vajinalis tek katlı mezotelyal hücrelerle döşelidir. Preparatlarda tunika vajinalis ayırt edilemez.

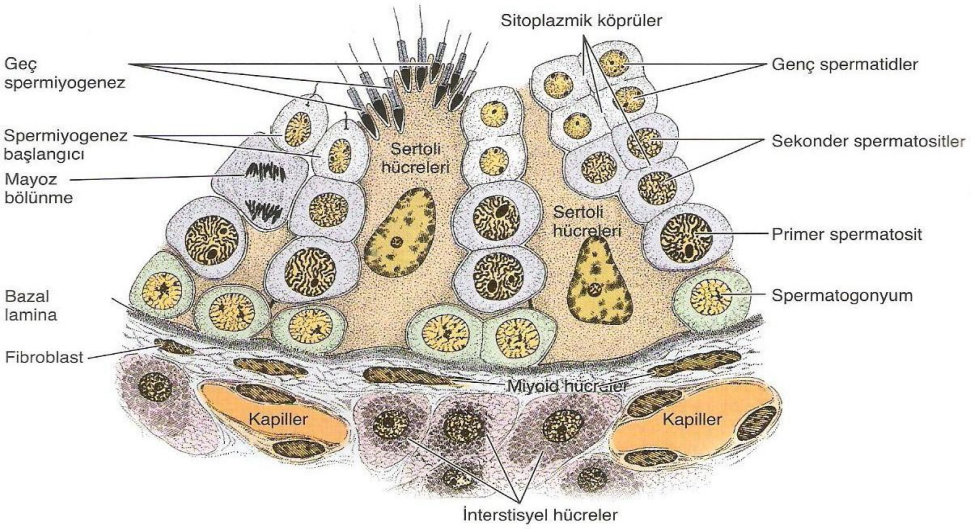
Preparatlarda en net tunika albuginea tabakası ayırt edilir. Tunika albuginea tabakası yoğun bir fibroelastik bağ dokusundan oluşur (Eşrefoğlu, 2004). Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediyastinum testisi oluşturur. Tunica albuginea ince bağ dokusu uzantıları sahiptir. Bu uzantılar sayesinde testis lob ve lobüllere ayrılmaktadır.

Her testis lobülü gevşek bağ dokusu ile çevrili seminifer tübüllerden oluşmaktadır. Seminifer tübül epiteli spermatogenik seri hücreleri ve Sertoli hücrelerinden oluşur. Kapsülün iç kısmında bütün lobülleri dıştan saran tunika vasküloza tabakası yer alır. Bu tabaka, kan damarından zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır (Kuruş, 2020; Setchell ve ark.,1988).



Şekil 2. Testisi Saran Yapılar

(Junqueıra, & Carneıro, 2009)



Şekil 3. Testisi Saran Yapıl**ar**

(Junqueıra, & Carneıro, 2009)

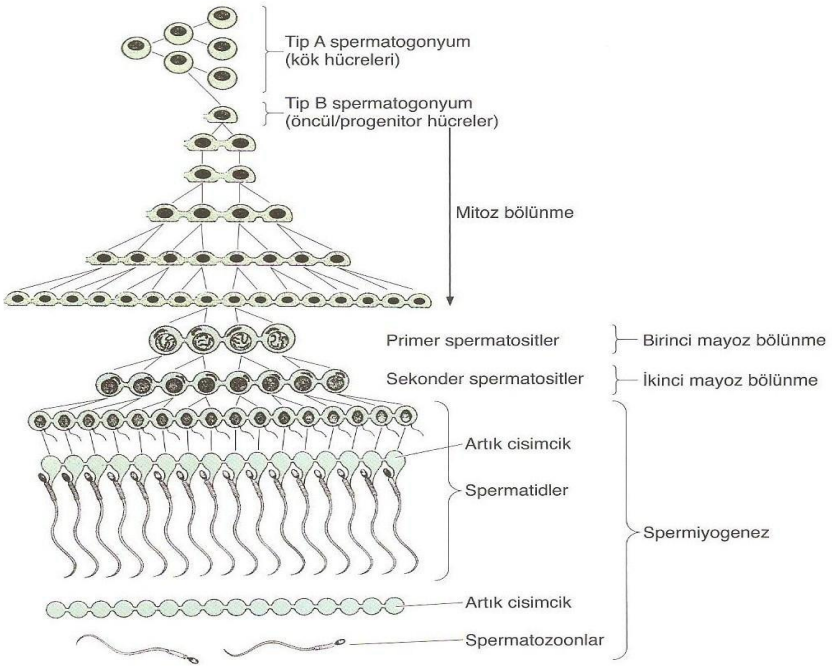
2.1.1.2.1. SeminiferTübüller

Kıvrımlı yapıya sahip tübüllerdir. Spermlerin üretiminin gerçekleştiği yerdir (Junqueria ve ark.,2009). Tübüllerin etrafı bazal membranla çevrilidir (Şekil 2) .

Seminifer tübüller modifiye çok katlı kübik epitel ile döşelidir. Seminifer epitelde hücre serisi olarak, spermatogenetik hücreler ve Sertoli hücreleri yer almaktadır. Spermatogenik hücreler bazal lamina ile lümen arasında yerleşim göstermektedir (Şekil 3).

Seminifer tübül epiteli bazal kompartıman ve adluminal kompartıman olarak tanımlanan iki kompartmandan oluşur. Bazal kompartmandaspermatogonyumlar yer alır. Bazal membrana yakın yerleşimli olan spermatogonyumlar mitoz bölünme aktivitesine sahiptir. Böylelikle spermatogenik kök hücreler olarak adlandırılmaktadırlar. Mitoz bölünme sonucu oluşan Spermatogonyum tip A hücreleri ökromatik çekirdeğe sahip hücrelerdir. Spermatogonyum tip A'nın mitoz bölünmesi sonucu spermatogonyum B hücreleri oluşur. Spermatogonyum tip B hücreleri, yuvarlak çekirdekli hücrelerdir.

Işık mikroskobik analizinde tip A ve tip B spermatogunyumların sitoplazmaları soluk boyanır. Spermatogonyum tip B hücrelerinin mitozu sonucunda primer spermatositler oluşur. Bu aşamada artık mitoz bölünme tamamlanmıştır. Primer spermatositler mayoz bölünme geçirir. I.mayoz bölünme sonrasında sekonder spermatosit hücreleri oluşur. Mayoz I'den sonra her biri haploid kromozoma fakat 2n DNA'ya sahip 2 adet sekonder spermatosit oluşur. Sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmeyi geçirmesi sonucunda ise spermatidler oluşmaktadır. II. mayoz bölünme öncesinde DNA replikasyonu gerçekleşmez. Bu nedenle bölünme sonrasında hücreler n sayıda DNA içerirler. Mitoz bölünme sürecine spermatositogenez denir (Şekil 4). Ardından mayoz I ve mayoz II gerçekleşir. Mayoz II sonucunda oluşan haploid yapıdaki spermatidler yuvarlak yapıda hücrelerdir. Bu hücrelerin normal sperm morfolojisine dönüşme sürecine spermiyogenez denir (Kuruş, 2020).



Şekil.4. Spermatogenez ve Spermiyogenez Evreleri

(Junqueıra, & Carneıro, 2009)

Spermiyogenez başlıca, golgi evresi, sentriyollerin yer değiştirmesi ve kuyruk oluşumu, sitoplazmik kayıp, mitokondriumların göçü ve nükleustaki değişiklikler olarak beş basamakta incelenir.

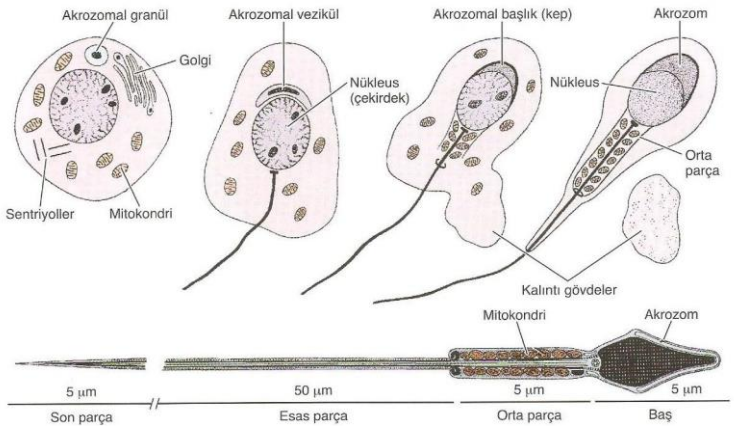
Golgi evresinde salgı granülleri birleşerek akrozomal kepi oluşturur. Salgı granüllerinin içinde bulunan litik enzimler spermin akrozomal kepinde bulunan enzimleri oluşturur. Akrozomal enzimler sayesinde sperm fertilizasyon anında korona radiata ve zona pellusida'dan geçer ve oosit içine girer (Şekil 5).

Sperm çekirdeğinin akrozom kepin oluştuğu kutbunun karşı tarafında sentriyoller yer alır. Çekirdek tarafındaki sentrioller proksimal sentrioldür. Proksimal sentriyol spermin kuruk bölümünde eksen fibrillerini oluşturur. Kuyruk uzadıkça dış fibriller oluşur. Dış fibriller kuyruk boyunca ilerler (Şekil 5).

Sitoplazmik kayıpta sitoplazmanın bir kısmı kuyruk ucuna doğru ilerler. Geri kalan kısmı spermin boyun kısmında boğum oluşturarak ayrılır. Boğumlanarak atılan artık sitoplazma sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (Şekil 5).

Mitokondriyonlar göç ederek kuyruğun ilk kısmında toplanır. Mitokondriyonlar enerji kaynağı organellerdir. Sperm hareketinin sağlanmasında ATP miktarı önemli rol oynar. Aynı zamanda harekt sağlanmasında dinein proteinleri de önemli rol üstlenir. Sperm nukleusunda kromatin yoğunlaşır. Nükleus çapı küçülür.

Son olarak sperm dişi genital sistemine girdiğinde spermde moleküler düzeyde değişiklikler görülür ve bu durum kapasitasyon olarak adlandırılır.

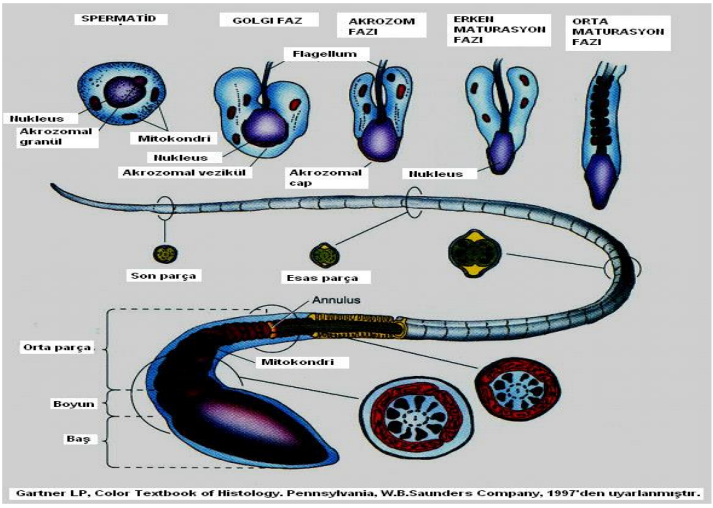


Şekil 5. Spermatidin Spermiyuma Farklılaşma Aşamaları

(Junqueıra, & Carneıro, 2009)

Olgun sperm baş, boyun, orta parça ve kuyruktan oluşur. Sperm başı, oval biçimlidir. Çekirdekte sıkıca paketlenmiş kromatin bulunur. Çekirdeğin bir kutbu akrozomal kep ile sarılıdır. Sperm başı az miktarda sitoplazma içerir. Spermin başı ve orta parçası arasında boyun bölgesi yer alır. Spermin boyun bölgesi 9+2 mikrotübül sistemi içerir.

Sperm kuyruğu esas parçadan ve son parçadan oluşur (Şekil 6). Kuyruk ortasında filum aksiyal ve etrafında dış fibriller bulunur. Filum aksiyal ve dış fibrilleri fibröz kılıf kuşatır. Kuyruğun uç kısmında mikrotubüller yer alır (Ross, 2003).



Şekil.6.a. Spermatidin Spermiyuma Farklılaşma Aşamaları ve Olgun Bir Spermiyumun Yapısı

(Gartner, & Hiatt, 1997)

Sertoli hücreleri prizmatik hücrelerdir. Spermin beslenmesi ve desteklenmesini sağlarlar. Sperm hücrelerinin korunmasında artık sitoplazmanın ve ölü hücrelerin temizlenmesinde önemli rol üstlenirler (Karagöz, 2002). Puberteye kadar seminifer epitelde sadece spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri bulunur. Puberteden sonra seminifer tübül epitelini oluşturan hücre topluluğunun küçük bir kısmını oluştururlar. Sertoli hücrelerinin membran sınırları düzensizdir. Böylelikle diğer hücrelere destek sağlarlar. Histolojik olarak dğerlendirildiğinde heterokromatin yapıda nükleusa sahiplerdir.

Sertoli hücrelerininsitoplazmaları, düz ve granüllü endoplazmik retikulumdan, mitokondriyonlardan, lizozomlardan, lipid damlacıklarından, gelişmiş bir golgi kompleksinden ve zengin bir hücre iskeleti yapısından oluşmaktadır (Akkoyun, & Özenci, 2006).

Bazolateral bölgelerinde okludens bağlantıları oluştururlar. Okludens bağlantıları sayesinde kan testis bariyeri oluşur. Kan testis bariyeri spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan koruyarak büyük bir rol üstlenirler (Carneiro, & Junqueria 2009;Pawlina, & Ross,2006)).

2.1.1.2.2.İnterstisyel Alan

Androjen üretiminin gerçekleştiği Leydig hücrelerinin bulunduğu alandır. Bu alan bağ dokusu, sinirler, kapillerler ve lenf damarları bakımından zengindir. Bağ dokusu alanlar fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar gibi hücreler barındırır. Puberteden sonra leydig hücreleri fonksiyon gösterirler (Carneiro, & Junqueria, 2009; Demir, 2006).

Leydig hücreleri testosteron üreten hücrelerdir (Ovalle ve ark., 2009).Leydig hücreleri, inter tübüler alanda bulunurlar. Yuvarlak şekilli hücrelerdir. Leydig hücrelerinin çekirdeği merkezde yer alır. Eozinofilik sitoplazmalarında küçük lipid damlacıklarının yanında mitokondrionlar, iyi gelişmiş endoplazmik retikulum, lipokrom pigmenti ve Reinke kristalleri bulunur (Carneiro, & Junqueria, 2009; Demir, 2006; Gartner, & Hiatt, 2016; Pawlina, & Ross, & 2006;).

2.1.1.2.3. Kan-Testis Bariyeri

İnsanlar da dâhil pek çok türde, Sertoli hücreleri tarafından sıkı bağlantı birimleri bulunur. Sertoli hücreleri arasında bulunan zonula okludensler germinal epiteli bazal ve adluminal kompartmanlara ayırır. Germinal epiteli iki bölüme ayıran bu kompleksler kan testis bariyerini oluşturur. Kan testis bariyeri; haploid erkek gamet için immünolojik bakımdan oluşabilecek reaksiyonlara karşı korunmuş bir alan oluşturur (Borgen ve ark.,1992).

2.1.1.2.4. İntratestiküler Kanallar

Her bir testis lobülünü oluşturan 1-4 adet seminifer tübül kıvrımları düzelerek tek bir kanal olan tübüli rektiye açılırlar. Bu kanallarda rete testise açılırlar. Tubuli rekti ve rete testis tunika albugineanın testis arka duvarında kalınlaşması ile oluşan mediastinum testisin içinde bulunurlar.

Bu kanallar testiküler sıvı iletimini sağlar ve aynı zamanda spermatozoanın epididime iletilmesini sağlar (Roosen ve ark.,1978). Böylelikle epididim duktusuna aktarım gerçekleşir.

Tubuli Rekti: Kıvrımlı seminifer tübüller mediastinuma yaklaştıkça düzleşirler. Düzleşen bu kanala tubuli rekti denir. Bu kanallar kısa ve dar bir yapıya sahiptir (Bustos, 1976). Tubulu rekti epitelinde spermatogenik seriye ait hücreler bulunmaz.. Sertoli hücrelerinden gelişen prizmatik hücreler bulundururlar. Histolojik olarak tek katlı kübik epitel ile döşelidir (Batislam, & Başar,2004).

Rete Testis: Mediastinum testis bölgesinde bulunur. Rete testis labirent biçimli kanalların birleşmesi ile oluşur. Tubuli rekti kanalları rete testise açılır. Histolojik olarak rete testis epiteli tek katlı kübik epitel ile döşelidir (Dym, 1972). Bu durum seminifer tübüllerden gelen sıvı ile rete testis kanallarında ki sıvının içeriğinin farkını oluşturur (Koskimies ve ark.,1971).

2.1.2. Ekstratestiküler Kanallar

2.1.2.1.Duktuli Efferentes

Duktuli efferentes, rete testisin açıldığı kanallardır. Duktuli efferentes prizmatik epitel ile döşelidir. Epitel hareketsiz spermlerin epididime doğru taşınmasını sağlayan sterosilyalı esas hücreler barındırır. Silyasız hücreler ise seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu geri emerler (Junqueira ve ark.,2009; Kierszenbaum, 2002).

2.1.2.2. Duktus Epididimis

Epididimisi oluşturan kanala duktus epididimis denilir. Duktus epididimis spermiumların depolandığı yerdir. Spermiumlar testiste üretildikleri zaman hareket yeteneklerine sahip değildir. Spermler hareket etme yeteneğini epididimiste depolanma sürecinde kazanırlar. Prostat salgısının eklenmesi de hareket yeteneğinde önemlidir (Dalley & Moore, 1995; Tosun, 1998).

2.1.2.3.Duktus Deferens

Duktus epididimis kalınlaşarak duktus deferensi oluşturur. Bu kanal prostatik üretraya doğru açılmaktadır.

Böylelikle spermatozoaların ürethraya iletilmesi sağlanır. Epididimiste olduğu gibi duktus deferenste de spermlerin büyük bölümü depolanır.

Duktus deferensin duvarı; tunika mukoza, tunika muskularis, tunika adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Tunika mukoza yalancı çok katlı prizmatik epitelden oluşur (Başar & Batislam ,2004).

2.1.2.4. Duktus Ejakülatoryus

Duktus Ejakülatoryus, prostatik uretraya açılır. Urethranın bubölümünde idrar ve ejakülat iletimi çift fonksiyonludur. Histolojik olarak bakıldığında kanalın epitel tabakası tek katlı prizmatikten çok katlı değişken epitele kadar değişmektedir (Başar, & Batislam, 2004).

2.1.3.Yardımcı Genital Bezler

2.1.3.1.Vesikula Seminalis

Tubüler yapıda bir çift bezdir. Ejakülat salgısının büyük bölümünü vesikula seminalis salgısı oluşturmaktadır. Salgısında bulunan fruktoz, sitrik asit, fibrinojen ve prostaglandin'ler spermatozoalarıaktive eder. Bununla birlikte bu salgı fertilizasyonda önemli bir rol üstlenir. Fruktoz, sperm'lerin temel besin kaynağıdır (Başar, & Batislam, 2004).

2.1.3.2. Prostat

Düz kas lifleri ve bağ dokusundan zengin bir organdır. Prostat bağ dokusu yalancı bir kapsül ile çevrilidir. Uretranın başlangıç bölümünü çevreler ve bu bölüm prostatik üretra olarak tanımlanır. Prostat salgısı ejakülatın %15-25 kadarını oluşturur (Başar, & Batislam, 2004).

2.1.3.3. Bulboüretral Bezler

Bulboüretral bez kanalları, spongioz ürethranın proksimal parçasına açılmaktadır. Muköz yapıda ki salgısı siyalik asit, galaktoz ve galaktozaminden zengindir.

Bulboüretral bez salgısı üretra içinde kalmış idrarı nötralize eder. Ejakülatın üretra'dan geçişini kolaylaştırır (Başar, & Batislam, 2004).

2.1.4. Penis

Penis, bir çift korpus kavernozum, bir adet korpus spongiozum olarak tanımlanan üç kavernöz yapıdan oluşur. Bu erektil dokular fibroelastik bağ dokusundan, damarlardan ve düz kas yapılarından zengindir. Sinüsleri endotel ile döşelidir. Penil urethra korpus spongiozumun ortasında yer almaktadır. Histolojik olarak bakıldığında penil uretra epiteli çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Uretranın sonu çok katlı yassı epitel ile devam eder. Epitelin bağ dokusu çıkıntılarına Littre bezleri denir.. Littre bezleri ejekülasyondan önce mukus salgısını oluşturur (Ovalle ve ark, 2009).

2.2. RUTİN SEMEN ANALİZİ

Semen (ejakulat) epididim, duktus deferens, vesikula seminalis, prostat ve bulboüretral bez salgılarından oluşan ve içinde spermleri bulunduran sıvıdır. Semenin ortalama hacmi 3-4 ml'dir. Normal şartlarda mililitrede 300-400 milyon sperm içermektedir. Spermler, ejakülatın yaklaşık %10'unu oluşturur. Geriye kalan kısmı seminal sıvı oluşturur. Vesikula seminalisten gelen salgı ejakülatın büyük kısmını oluşturur. Seminal sıvının büyük bir kısmı sudur, bununla birlikte içeriğinde farklı maddeler de bulunmaktadır. Seminal sıvının fruktoz içeriği fazladır ve C vitamini ile inositol de içermektedir (Başar, & Batislam, 2004).

Testiküler ekzokrin fonksiyon için ve genital bez salgı oluşum mekanizmasının değerlendirilmesi için semen analizi yapılır. Rutin semen analizinde eajkulatta bulunan spermin konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojik yapısı değerlendirilir. Semen analizi tüp bebek uygulamalarında tedavi planlanmasında en önemli değerlendirmedir. Rutin uygulamalarda 3-5 günlük abstinens süresinin ardından, hastadan mastürbasyon yoluyla elde edilir. Semen örneği öncelikle 15-60 dakika aralığında değişen likefaksiyon sürelerinde 37°C sıcaklıkta bulunan inkübatör içerisinde bekletilmektedir. Böylelikle semen homojen bir sıvı haline gelmekte ve spermlerin tamamı bağımsız olarak hareket etmektedir (WHO, 2010).

Eğer bu likefaksiyon süresine uyulmazsa, sperm hücreleri tam olarak hareketlilik kazanamazlar. Bunun sonucunda sperm analizinde değerlendirilen parametreler olan, sperm sayısı, sperm hareketliliği ve spermin morfolojik analizi doğru şekilde gerçekleştirilmemiş olur (Eliasson, 1978).

Tablo.1 Semenin Karakteristik Özelliklerinin Alt Referans Limitleri (WHO, 2010)

Semen Parametreleri	**Alt referans limiti**
Semen volümü(ml)	1,5 (1,4-1,7)
Sperm konsantrasyonu (10^6/ml)	15 (12-16)
Toplam sperm sayısı (10^6/ejakülat)	39 (33-46)
Toplam hareketlilik (%)	40 (38-42)
İleriye doğru hareketlilik (%)	32 (31-34)
Vitalite (%)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (%)	4 (3,0-4,0)
Diğer eşik değerler	
pH	≥ 7,2
Peroksidaz pozitif lökositler (10^6/ml)	< 1,0
MAR testi (%)	< 50
*İmmunobead*test (%)	< 50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	≥ 2,4
Seminalfruktoz (µmol/ejakülat)	≥ 13

Tablo.1.(Devamı) Semenin Karakteristik Özelliklerinin Alt Referans Limitleri (WHO, 2010)

Seminalnötralglikozidaz (mU/ejakülat)	≥ 20

2.2.1.Makroskobik Değerlendirme

Semen analizi, likefaksiyondan hemen sonra basit olarak makroskobik değerlendirme ile değerlendirilir. Sıcaklık değişikliği semen kalitesini olumsuz etkileyebileği için 30 dakika ile 1 saat aralığında semen değerlendirilmelidir (WHO, 2010).

2.2.2.Likefaksiyon

Toplama kabında ejakülasyonun hemen ardından semen, koagüle olarak bulunmaktadır. Likefaksiyon sonunda semen akışkan hale gelir, likefaksiyonun ardından semen pipetlenerek spermlerin seminal sıvı içinde homojen dağılımı sağlanır. Semen örneği ortalama 15 dakikada likefiye olmaktadır. Bu durum nadiren de olsa uzayabilir. Likefiye olmayan semen örneğinin makroskobik değerlendirilmesi zorlaşır (WHO, 2010).

2.2.3. Viskozite

Likefaksiyondan sonra semen pipetle çekilip, damlatıldığında oluşan iplikçik gözlenir ve numunenin viskozitesi değerlendirilir. Semen numunesi pipetten damla damla akar. Viskozite normal değilse semen numunesi pipetten verilirken uzun iplikçikler oluşturur (WHO, 2010).

2.2.4. Semen hacmi

Ejakülat hacminin çoğunu seminal bezler ve prostat gelen salgısı oluşturur. Az miktarını ise bulbouretral bezler ve epididimlerden gelen salgı oluşturmaktadır. Hacim ölçülürken semen numunesinin içinde toplandığı kapla birlikte tartılması gerçekleşir. Kabın ağırlığı çıkartılır.

Aynı zamanda numune dereceli camdan yapılmış geniş ağızlı bir ölçüm silindire (cam mezür) alınarak derecelendirilmesi okunarak hacim hesaplanması yapılabilir (WHO, 2010).

2.2.5. Semen pH Değeri

Semen pH'sı, farklı aksesuar bezlerden salgılanan sıvıların pH değerleriniifade etmektedir. pH ölçümü semenin alımından 30 dakika ve 1 saat aralığında gerçekleştirilmelidir. 6,0-10,0 aralığındaki pH kağıdı üzerinde değerlendirme yapılır. Alt sınır değeri pH'da 7,2 olarak belirlenmiştir (WHO, 2010).

2.2.6. Sperm Motilitesi

Semen içindeki spermin motilite yüzdesi, 30 dakikada ile 1 saat aralığında değerlendirilmelidir. Böylelikle pH ve sıcaklık değişikliklerinden motilitenin etkilenmesi minimalize edilir. Semen numunesi makler çemberde faz kontrast mikroskop altında x20 büyütmede incelenir. 200 adet sperm sayılarak ortalama değer alınır. Spermatozoanın hareketliliği derecelendirilir; İleri hareketli sperm (progresif motilite; PR) yerinde hareketli sperm (non progresif motilite; NP), hareketsiz sperm (immotilite; IM) olarak değerlendirilir.

2.2.7. Sperm Vitalitesi

Spermlerin canlılık derecesi hücre membranlarının bütünlüğüyle dikkate alınarak değerlendirilir. Canlı spermler, boyayı tutma veya hipotonik şişme özellklerine göre değerlendirilir. Canlı olmayan (ölü) hücrelerin membranları hasarlı olduğu için boyayı sitoplazmalarına alırlar ve bu hücreler ölü hücreler olarak değerlendirilir. Boyayı tutma analizinde eozin-nigrozin boyaması yapılır.

Vitalitenin referans alt sınırı %58'dir. Hipoozmotik şişme testinde de membran hasarı olmayan hücreler hipotonik ortamda şişerler ve böylelikle ayırt edilirler.

2.2.8. Sperm Sayısı

Sperm konsantrasyonu, birim semen hacmindeki spermatozoa sayısını ifade eder. Total sperm sayısı ise birim hacimdeki sperm sayısının semen hacim değeri ile çarpılması sonucu elde edilir (WHO, 2010).

Sperm sayımında kullanılan özel olarak üretilen Horwell veya Makler sayım kamaraları da kullanılabilir (Makler, 1978; Makler, 1980). Ejakülattaki total sperm sayısı için referans alt sınırı 39×10^6 spermdir.

2.2.9. Semen Mikroskobik İnceleme

Faz kontrast mikroskobu kullanılır. Numune ilk olarak x10 mikroskobik büyütme altında incelenir. Sperm agregasyonu veya aglütinasyonu ile spermatozoa dışında hücrelerin varlığının değerlendimesi gerçekleştirilir. Preparat daha sonra toplam x20 veya x40 büyütme altında değerlendirilerek, sperm hareketliliği ve sperm sayısı belirlenir.

Spermatozoanın Agregasyonu

Hareketli veya hareketsiz hücrelerin birbirlerine veya hareketli spermlerin, mukus iplikçikleri, sperm dışı hücreler ve hücresel atıklara bağlanması olarak tanımlanmaktadır.

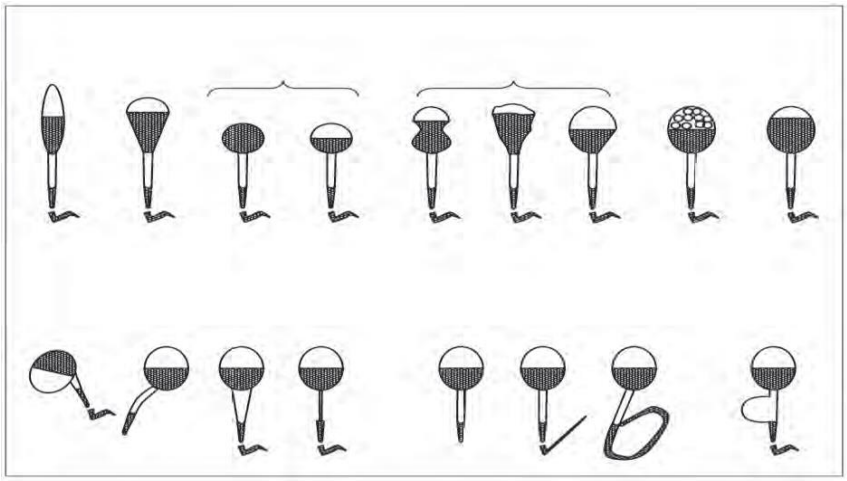
Spermatozoanın Aglütinasyonu

Aglütinasyon hareketli spermlerin birbirlerine yapışarak bir arada bulunması demektir. Aglütinasyonda sperm hareketliliği kısıtlanır. Aglütinasyon derecelendirilmesi izole, orta, geniş ve yoğun aglütinasyon olarak sınıflandırılmaktadır.

Sperm Morfolojisi

Sperm morfolojisi belirlenirken bir lam üzerine semen sürüntüsü yayılır ve preparat havada kurutulur ve fiksasyon gerçekleştirilir .

Fiksasyonun ardından boyama yapılır. Boyama aşamasında çekirdek ve sitoplazma boyaması amacıyla Papanicolaou, Shorr veya Diff Quick boyaları kullanılır. Aydınlık alan mikroskobunda, immersiyon yağında x100 büyütmede preparat incelenir. Normal veya anormal sperm yüzdesi belirlenir. Morfoloji değerlendirilirken, baş defektleri, boyun ve orta parça defektleri, sitoplazmik droplet ve kuyruk defektleri belirlenir (Şekil 7). Normal sperm yüzdesi alt referans değeri % 4 olarak belirtilmiştir.



Şekil 7. İnsan spermatozoasınınanormal formlarının şematik resmi

(Krugerve ark. 1993)

Tablo 2. Semen Kalitesine İlişkin Terminoloji (WHO,2010)

Aspermi	Semenin olmaması durumudur.
Astenozoospermi	İlerleyici (Progresif-PR) harekete sahip spermlerin yüzdesinin alt referans değerinden az olması durumudur.
Astenoteratozoospermi	İlerleyici (Progresif-PR) harekete ve normal morfolojiye sahip spermlerin yüzdesinin alt referans değerinden az olması durumudur.
Azoospermi	Semende hiç sperm bulunmaması durumudur.
Kriptozoospermi	Normal semende sperm görülmemesine rağmen santrifüj yapılmış semende sperm bulunması durumudur.
Hemospermi	Semende eritrosit bulunması durumudur.
Lökospermi	Semende sınır değerinin üstünde lökosit bulunmasıdurumudur.
Nekrozoospermi	Cansız spermlerin yüzdesinin canlı spermlerin yüzdesinden fazla olması durumudur.

Tablo 2.(Devamı). Semen Kalitesine İlişkin Terminoloji (WHO,2010)

Normozoospermi	Alt referans değerlerine eşit veya yüksek sperm konsantrasyonu ve ilerleyici (Progresif-PR) harekete ve normal morfolojiye sahip spermlerin bulunması durumudur.
Oligoastenozoospermi	Alt referans değerlerinden düşük sperm konsantrasyonu ve ilerleyici (Progresif-PR sahip spermlerin bulunması durumudur.
Oligoastenoteratozoospermi	Alt referans değerlerinden düşük sperm konsantrasyonu ve ilerleyici (Progresif-PR) harekete ve normal morfolojiye sahip spermlerin bulunması durumudur
Oligoteratozoospermi	Alt referans değerlerinde düşük sperm konsantrasyonu ve normal morfolojiye sahip spermlerin bulunması durumudur.
Oligozoospermi	Alt referans değerlerinde düşük sperm konsantrasyonunun bulunması durumudur.
Teratozoospermi	Alt referans değerlerinde düşük normal morfolojiye sahip spermlerin bulunması durumudur.

2.3. SPERM DNA BÜTÜNLÜĞÜ

Sperm DNA'sı, yoğun paketlenmiş kompakt yapıdadır. Spermiyogenez sırasında, sperm kromatininde öncelikle histonlar kaybolur ve histonların yerini geçiş proteinleri yer alır. En son protaminler ile bir dizi modifikasyon gerçekleşir .

İnsan spermi P1 ve P2 olmak üzere iki tür protamin içermektedir. P2 protaminlerinin sistein grubu azdır (Kierszenbaum, 2001). Bundan dolayı sperm DNA hasarına daha duyarlıdırlar (Carrell, & Liu, 2001).

Sperm hücrelerinin morfolojisi ve motilitesi iyi olmasına rağmen DNA hasarı olması mümkündür. Fragmantasyon, genellikle sperm DNA'sında tek ve çift sarmal kopması sonucu oluşur.

DNA hasarını etkileyen çevresel faktörlerden bir kaçı sigara kullanımı, radyasyon ve kemoterapidir. Bunun yanında lökospermi, varikosel ve kanser gibi patolojik ve fizyolojik durumlarda DNA hasarında etkilidir (Yüksel, 2019).Sperm DNA hasarı 4 başlık altında değerlendirilir. Bunlar; kromatin paketleme anormallikleri, oksidatif stres, apoptozis, kromozomal hasarlardır (Muratori ve ark., 2006).

2.3.1.Sperm Kromatin Bütünlüğü

Spermatogenez esnasında histonlar protaminlerle yer değiştiririr. Yer değiştirme esnasında kromatin, histon hiper asetilasyonu ile gevşetilir. Bu gevşetilmede topoizomeraz II rol almaktadır. Bu hiper asetilasyon spermiyogenesisden sonra Topoizomeraz II tarafından onarılır. Eğer bu çentikler onarılmaz ise, ejakülatta DNA hasarı içeren spermler bulunabilir (Laberge, & Boissonneault, 2005).

2.3.2. Sperm DNA Hasarı ve ROS

Sperm DNA hasarı, fazla mikarda oluşan ROS ile ilişkilendirilir. Düşük seviyelerdeki reaktif oksijen radikalleri, sperm olgunlaşmasında, kapasitasyonda ve akrozom reaksiyonunda etkilidir. Buna karşılık aşırı miktarda reaktif oksijen radikallerinin olması, hücresel hasara ve DNA hasarına neden olabilmektedir. Semendeki reaktif oksijen radikalleri oluşumunda lökositler ve spermler önemli bir rol üstlenir. Özellikle olgunlaşmamış, anormal morfolojik yapıya sahip olan spermler aşırı miktarda reaktif oksijen radikalleri oluşumuna sebep olurlar (Agarwal ve ark.,2014). ROS oluşumunda rol üstlenen dış faktörlere bakıldığında, semendeki lökositler, kimyasal/toksinler, beslenme eksikliği gösterilebilir (Agarwal ve ark., 2014).

2.3.3. Sperm DNA Hasarı ve Apoptozis

Testislerde hasarlı hücrelerin elimine edilmesi apoptoz ile gerçekleşmektedir (Sinha ve ark., 1999). Apoptotik yolak, Fas ligantının (FasL) Fas reseptörü ile etkileşimi sonucu indüklenir. Sperm parametreleri düşük olan erkeklerde, sıklıkla Fas ekspresyonunda artış olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Sakkas ve ark., 2003).

2.3.4.Kromozomal Aberasyonlar

Erkek infertilitesinde %30 olarak genetik etiyoloji etkilidir (Kupker, 1999). Y kromozomunda sperm yapımı ile ilişkili AZF (AZFa, AZFb, AZFc) gen bölgelerindeki mikro delesyonların oligospermi veya azospermiye neden olduğu bilinmektedir. Bu durum fertilite problemlerine neden olur (Kupker, 1999).

2.4. SPERM KROMATİNİ VE DNA ANALİZİ TESTLERİ

2.4.1.Sperm Kromatin Yapısı Tayini (Sperm Chromatin Structure Assay)(SCSA)

SCSA testi ile akridin turuncusunun renk değiştirmesine bağlı olarak sperm DNA'sının duyarlılığı ölçülür. Akridin turuncusunun asit eklendikten sonra renk değiştirerek yeşilden kırmızıya dönüşümü akım sitometri yöntemiyle ölçülmektedir. Böylelikle DNA denatürasyon genişliği saptanmaktadır (Darzynkiewicz ve ark.,1975; Evenson ve ark.,1980)

2.4.2.Akridin Turuncu Testi (AcridineOrange Test) (AOT)

SCSA testine benzer olarak akridin turuncusunun asitli ortamda yeşilden kırmızıya dönüşmesi prensibine dayanır. Böylelikle DNA denatürasyon genişliği SCSA'dan farklı olarak floresan mikroskopta değerlendirilir. SCSA testine göre daha basit, ucuz bir yöntemdir (Tejada ve ark.,1984). Ancak bazı, bulanık renkler, hızlı renk kaybolması ve heterojen boyanmalar gibi bazı limitasyonları mevcuttur (Chohan ve ark.,2006).

2.4.3.Terminal UridineNick- End Labeling (TUNEL) Yöntemi

TUNEL yönteminde DNA polimeraz enzimi kullanılır. DNA polimeraz tek veya çift zincir kırıklarına deoksiribo nükleotitler (dUTP) ekler(Robbins ve Coleman, 1988). Bağlanan deoksiribo nükleotitler daha sonra etiketlenerek flow sitometri ile ölçülür. Sonuçta sperm TUNEL pozitif veya negatif olarak sınıflandırılır. Sperm DNA hasarı yüzdesi belirlenir (Shamsi ve ark., 2011).

2.4.4.İn situ Nick Translasyon (NT Testi)

TUNEL yöntemine benzerdir. Bu yöntem ile tek zincir DNA kırıkları tespit edilir. DNA polimeraz I enzimi kullanılır. Enzimatik reaksiyonla elde edilen tek zincir DNA'nın 3'-OH ucundaki biotin veya flouresans ile işaretlenmiş dUTP miktarını ölçmektedir. NT işaretleme ile DNA'daki endojen çentiklerin saptanması sağlanmaktadır (Gosalves, 2011).

2.4.5.Halo Sperm Yöntemi-Sperm Chromatin Dispersion (SCD)

Sperm DNA kırıklarını direkt tespit eden bir testtir (Murielvd, 2006). Sperm numunesi, lam üzerinde agaroz jele daldırılır. Denatürasyon asit çözeltisi ile gerçekleştirilir. Daha sonra bir lizis tamponu ile proteinlerin uzaklaştırılması gerçekleşir. Sonuçta preparat ışık mikroskobu ya da floresan mikroskopda değerlendirilir. DNA hasarı olmayan spermlerde halo görüntüsü vardır. DNA hasarı olanlarda halo görüntüsü oluşmaz (Yiğit ve ark., 2015).

2.4.6.Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)

Bu yöntemle de sperm DNA hasarı direkt belirlenir. (Haines ve ark., 1998). Yoğunluğu azaltılmış spermler agaroz jele yüklenir. Floresan DNA bağlayan boya eklenmiş elektroforetik bir gradiente maruz bırakılıp görüntülenirler.

Düşük moleküler ağırlıklı olan, tek ve çift zincirli DNA parçaları elektroforez esnasında hareket eder. Kuyruklu yıldız görüntüsü oluştururlar (Klaude ve ark.,1996).

2.4.7.Sperm Kromatin Analizi

2.4.7.1.Anilin Mavisi Boyama

Bu boyama lizinden zengin histonlar ile sisteinden zengin protaminlerin ayrımına dayanmaktadır. Protein içeriğinde ki farklılıklar bu boyama ile göterilir. Histondan zengin immatür spermatozoa lizinden zengindir ve mavi boyanmaktadır. Sisteinden zengin spermatozoa boyanma göstermez.

Yüksek oranda lizin içeren proteinlerin oranı kromatin hasarı ile ilişkilendirilir (Güneş ve ark., 2013; Küçük, 2018; Yiğit, 2015).

2.4.7.2.Toluidine Mavisi Boyama

Kromatin hasarına karşı toluidine mavi boyası fosfat kalıntılarına bağlanarak yüksek afinite gösterir. Boyanan hücrelerde zayıf bir DNA bütünlüğünün olduğu tespit edilir (Rahiminia ve ark., 2017).

2.4.8. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Serbest radikal bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektronu bulunan atom ya da molekül olarak tanımlanmaktadır (Aitken & Clarkson,1988). Reaktif oksijen türleri DNA'da, yapısal değişikliklere neden olmaktadırlar. ROS'lar reperfüzyon hasarına ve inflamatuvar hastalıklara neden olabilmektedir (Lenzi ve ark., 1998). Semendeki epididim ve prostattan kaynaklı lökositler erkek genital sisteminde enfeksiyonun bir nedenidir (WHO,1999). Lökositler normal ve infertil erkeklerin semenlerinde görülebilir (Halliwell ve ark,1999).

ROS üretimi semen lökosit kontaminasyonuna sahip numunelerde fazladır. Bu kişilerde DNA hasarı anlamlı derecede artış göstermektedir (Alvarez ve ark., 2002). Semende lökosit konsantrasyonu 3 milyon/ml üzerindeyse fertilizasyon olumsuz etkilenir (WHO, 1999).

2.4.9. Reaktif oksijen radikalleri kaynakları

Seminal plazmada bulunan reaktif oksijen radikalleri eksojen ve endojen kaynaklara sahiptir. Ejakulatta matür ve immatür hücreler bulunur.

Spermatogenezin farklı aşamalarındaki hücreler, yuvarlak hücreler, lökositler ve epitelyal hücreler de ejekülatta bulunmaktadır. Bu hücrelerden özellikle lökositler ve immatür spermatozoalar reaktif oksijen radikallerinin ana oluşum kaynaklarıdır. Bunların yanında yaşam tarzı olarak, sigara kullanımı ve alkol kullanımı ROS oluşumuna sebeb olur. Aynı zamanda toksinler ve radyasyon da ROS kaynağıdır (Esteves, 2002; Gharagozloo, Aitken, 2011).

2.5. OKSİDATİF STRES

ROS ve antioksidan kapasite arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese neden olur (Saalu,2010). Spermatozoalar antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptirler. Gonadal hücreleri ve matür spermatozoaları reaktif oksijen radikallerine karşı korurlar.

Ancak patolojik durumlarda fazla miktarda ki reaktif oksijen radikalleri seminal plazma antioksidan kapasitesini aşar ve oksidatif strese neden olur (Henkel, 2011). Oksidatif stres etkileri çoğu zaman onarılabilir. Fakat matür spermatozoalar sitoplazmik enzim onarım sistemlerinden yoksun oldukları için reaktif oksijen radikalleri hasarlarını onaramazlar (Agarwal, & Saleh, 2002).

2.5.1.Oksidatif stresin ölçümü

Direkt Metodlar

Oksidatif stresin membran lipidleri ve DNA üzerindeki etkisiyle ortaya çıkan son ürünleri ölçen testlerdir.

Sıklıkla kullanılan yöntemler ise;

Thio barbitürik asit testi:

Lipid peroksidasyonu reaksiyonu sonrası malondialdehid (MDA) oluşur. Sperm veya seminal plazmada MDA düzeyi ölçülür. Sperm MDA düzeyi seminal plazmaya göre daha düşük olduğu için MDA düzeyini saptamak için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılır (HPLC) (Shang ve ark., 2004) Seminal plazmada MDA ölçümü spektrofotometri ile gerçekleşir (Tavilani ve ark., 2005).

8-OHdG ölçümü:

8-OHdG DNA' nın oksidatif hasarı sonrası oluşur. Ölçümü oksidatif stres hakkında bilgi vermektedir. Spermde veya seminal plazmada HPLC ile (Loft ve ark.,2003), veya enzim bağımlı immün absorbe yöntem (Nakamura ve ark., 2002) ile ölçülebilir.

İndirekt Metodlar

Kemoluminescene yöntemler:

Amin türevleri olan ‘Luminol’ veya ’Lucigenin’ probları semende reaktif oksijen radikallerini saptamak için kullanılır. Süperoksit anyonu ölçümünde luminol daha duyarlıdır (Fridovich, & Liochev, 1997). Ekipmanın pahalı olması ve kontaminasyon riski ise limitasyonlarıdır (Kobayashi ve ark., 2001).

Total antioksidan kapasitenin ölçümü:

Dışarıdan verilen oksidatif moleküller ile inseminal plazma antioksidanları nötralize edilerek analiz yapılır. Total antioksidan kapasitesi sıklıkla vitamin E analoğu (Trolox) antioksidan kapasitesi ile kıyaslanarak reaktif oksijen radikalleri – total antioksidan kapasite (ROS- TAC) skoru olarak ifade edilen oran olarak belirlenmektedir (Sharma ve ark., 1999).

Nitrobluetetrazolium (NBT) Oxi- Sperm yöntemi:

NBT, süperoksit anyonları ile reaksiyona girdiğinde mavi bir pigment olan ‘diformazan’ ortaya çıkaran suda eriyen sarı bir moleküldür. Semenin sahip olduğu oksidatif stres yüküne oranla ortaya çıkan renk koyulaşması prensibine dayanan oksidatif stres ölçüm yöntemidir (Baehner ve ark., 1976).

2.6.SPERMATOZOONDA ANTİOKSİDAN SİSTEMİ

Antioksidan savunma mekanizmaları hem intraselülar hem de ekstraselülerdir. Bazı serbest radikaller bu antioksidanlardan kurtulup, hasara yol açabilmektedirler (Halliwell ve ark,1999**;** Sikka ve ark, 2004). Seminal plazmada ki antioksidan kapasite belirlenmesinde katalaz ve total antioksidan kapasite (TAK) ölçümü önemlidir (Khosrowbeygi ve ark, 2004).

2.7. ABSTİNENS (CİNSEL PERHİZ) SÜRESİ VE SEMEN PARAMETRELERİ

Abstinens süresiWHO kılavuzunda yer alan bir parametredir. Dünya Sağlık Örgütü, 2–7 aralığındacinsel perhis önermektedir (WHO, 2010)

Matilsky ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma da, artan cinsel perhiz süreleri ile sperm sayısı ve semen volümünün arttığı gözlenmiştir (Matilsky M. ve ark.,1993). Yapılan farklı çalışmalarda da benzer şekilde uzun cinsel perhis süresinin, semen hacmini ve sperm konsantrasyonunu arttıracağı gösterilmiştir.

Sürenin uzamasının özellikle sperm hareketliliği ve canlılığı üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği vurgulanmıştır (De Jonge ve ark.,2004;Magnus ve ark.,1991) Bundan farklı olarakartmış cinsel perhis sürelerinin sperm konsantrasyonu düşük erkeklerin yararına olduğunu söylenmektedir. Çünkü sperm, epididimiste yedi gün veya daha fazla cinsel perhiz döneminde depolanarak birikir. Diğer taraftan, sperm konsantrasyonu yüksek olan erkeklerde sperm kanalları üç gün veya daha kısa bir süre içinde muhtemelen dolu olduğu için uzun cinsel perhiz aralıkları fayda yerine zarar getirebilir (Amann, 2009).

Eski çalışmalarda, DNA fragmantasyonu ve perhiz süreleri ilişkisini değerlendirildiğinde net standart perhiz süresi belirlenememiştir (Oldereid ve ark.,1984; Le Lannou ve ark.,1986). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise kısa abstinens süresi ile iyi kalitede sperm DNA'sının ilişkilendirildiği belirtilmiştir (Gosálvez J. ve ark.,2011; Pons I. ve ark.,2013) Reaktif oksijen radikalleriyle ilgili olarak, ejakulasyon sıklığının artması ile oksijen radikallerine maruziyetin azaldığı sperm fonksiyonları ve viabilitesinin arttığı öngörülmüştür (Marshburn ve ark., 2010).

2.8. SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİ

Temel olarak 3 ana sperm hazırlık yöntemi vardır; Basit yıkama yöntemi, direkt yüzdürme tekniği yöntemi *(swim-up)* ve kesintili dansite gradyanları yöntemi.

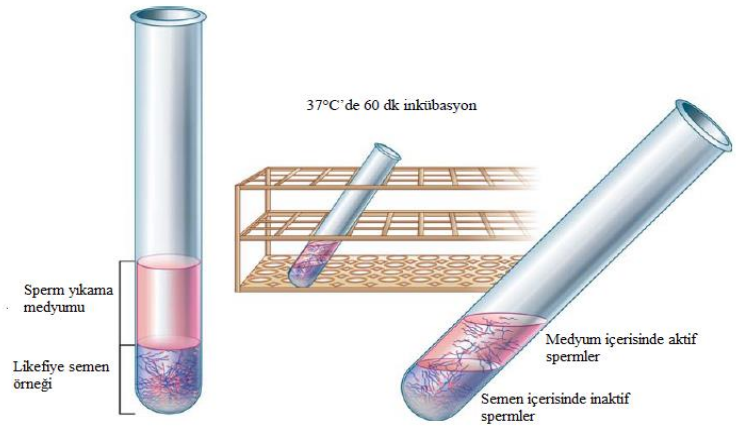
2.8.1. Basit yıkama

Bu yöntem yüksek miktarda sperm eldesi sağlar. Semen numunelerinin kalitesi iyiyse basit yıkama yöntemi yeterli olur. Semen numunesi iyice karıştırıldıktan sonra semen numunesi ve kültür medyumu 1:2 oranında seyreltilir. Seyreltilen süspansiyon santrifüj tüpüne alınır. 5 ile 10 dakika arasında 300–500 g'de santrifüjlenir. Üst tarafta kalan seminal plazma atılır.

Tüpün altında -kalan sperm pelletlerine 1 ml kültür medyumu eklenerek homojen hale getirilir. 3-5 dakika boyunca 300–500 g'de yeniden santrifüjlenir. Üst fazı dikkatlice atılır. sperm pelleti nazikçe pipetlenerek homojen hale getirilir (WHO, 2010).

2.8.2. Direkt yüzdürme tekniği (Swim-up)

Spermler seminal plazmadan dışarı, kültür medyumu içine yüzmesi sonrasında da seçilebilir Kültür medyumunu semen numunesi üzerine veya altına bir tabaka halinde ekleyerek direkt yüzdürme tekniği gerçekleştirilebilir. Böylelikle motil spermler kültür medyumu içine yüzerler. Bu yöntemle az sayıda sperm eldesi sağlanır. Ancak IVF ve ICSI uygulanacak olan gibi hareketli sperm yüzdesinin düşük olduğu durumlarda yararlıdır. Yüzdürme tekniğinde, semen numunesi iyice karıştırılır. Steril 15 ml'lik konik santrifüj tüpü içine 1 ml semen numunesi koyulur ve yavaşça üzerine 1,2 ml medyumu eklenir. Alternatif olarak kültür medyumu altına da semen eklenebilir. Semen-kültür medyumu ara yüzey alanını artırmak için, tüpü yatay düzlemle 45^{o} açı yapacak şekilde eğilir, 37°C'de 1 saat inkübatörde bekletilir. Birinci saatin sonunda tüp nazikçe dik duruma getirilir ve kültür medyumunun en üstteki 1 ml'lik kısımı ayırılır. Bu ayrılan kısım çok hareketli sperm hücrelerini içerir. Ayrılan çok hareketli sperm hücrelerini içeren kısım kültür medyumu ile (1,5–2,0 ml) seyreltilir. Beş dakika boyunca 300–500 g'de santrifüjlenir ve üst fazı atılır. Sperm konsantrasyonu, toplam motilite ve ileri hareketi değerlendirmek için, 0,5 ml kültür medyumu içinde sperm pelletini yeniden süspansiyon haline getirilir (Şekil 8). Tedavi veya araştırma amacıyla doğrudan işlenmemiş numune kullanılabilir (WHO, 2010).



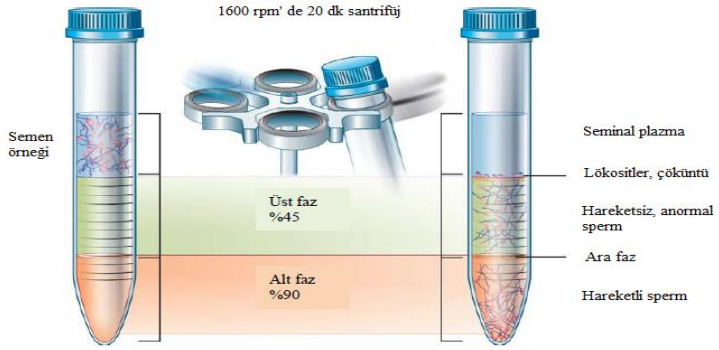
Şekil 8. Swim-upyöntemi (Beydola ve ark 2013)

2.8.3. Dansite Gradient Yöntemi

Semen parametrelerinin optimal olmadığı olgularda iyi kalitede spermlerin seçilmesini bu yöntem sağlar. Spermlerin seminal plazmadan, ölü hücrelerden ve diğer hücre tiplerinden ayırt edilebilmesini sağlayabilen yöntemdir. Swim up yöntemine göre daha doğru sonuçlar vermektedir. IVF ve ICSI için sperm edilmesi amacıyla bu teknik avantajlıdır. Bu yöntemde, kolloidal silika kaplı partiküller kullanılır.

Dansite gradient yöntemi için farklı ticari ürünler mevcuttur. Yıkama prosedüründe öncelikle bir ml %40 (v/v) dansite gradyan medyumunu bir ml %80 (v/v) dansite gradyan medyumu üzerine ekleyerek bir test tüpü içinde dansite gradyan medyumu hazırlanır (Şekil 9).

Semen numunesi karıştırılır ve 1 ml semen dansite gradyan medyumu üzerine eklenir. 15–30 dakika 300–400 g'de santrifüj edilir. Sperm pelletinden süpernatantın çoğu atılır. Nazikçe pipetleyerek, 5 ml takviyeli medyum içinde sperm pelleti homojenhale getirilir ve 4–10 dakika 200 g'de santrifüjlenir. Tekrar sperm pelletinden süpernatanın (üst fazın) çoğu atılır. Son oluşan pelleti kültür medyumu içinde nazikçe pipetleyerek yeniden homojenhale getirip, konsantrasyon ve motilitesi hesaplanır (WHO, 2010).



Şekil 9. DansiteGradiyentYöntemi (Beydola ve ark 2013).

2.9. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmada abstinens süresinin kısa tutulması semen parametrelerini, sperm kromatin ve DNA bütünlüğünü ve antioksidan kapasiteyi iyileştirici etki gösterir' hipotezinden yola çıkılarak, normozoospermik erkeklerde ardışık olarak alınan ejakulat örneklerinde kısa abstinens süresinin rutin semen parametrelerine, sperm kromatin ve DNA bütünlüğüne, oksidatif strese karşı gelişen antioksidan kapasiteye etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Hasta Seçimi

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarına Kasım 2020 ve Nisan 2021 tarihleri arasında rutin hastaya ait semen örnekleri çalışmaya dahil edildi. Çalışma kapsamında değerlendirilen semen örnekleri rutin spermiyogram testi yapıldıktan sonra artan ve normalde tıbbi atık olarak laboratuvar ortamından uzaklaştırılan numunelerden gerçekleştirildi.

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Uygulamalar Etik Kurulu' nun 14.10.2020 tarih 2020-18/18nolu izni ile çalışma gerçekleştirildi (EK-1). Çalışmaya katılan her hasta için bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ile izinleri alındı (EK-2).

Hastalara bilgilendirme yapıldıktan ve onam formu doldurulduktan sonra ejakulat numunesi alındı. Androloji laboratuvarında sperm konsantrasyonu değerlendirildi ve oligozoospermik (total progressifmotil sperm sayısı <15 milyon)- azospermik olgular ve mastürbasyon yoluyla ejakulat örneği alınamayan hastalar çalışma dışında tutuldu.

3.2.Semen Örneklerinin Eldesi

Spermiyogram analizi yapılmak üzere, semen örnekleri hastadan Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi Androloji laboratuvarı ile bağlantılı numune verme odasında mastürbasyon yöntemi ileelde edildi. Hastalar semen örneklerini üzerinde adı-soyadı ve protokol numarası yazılı steril, plastik kaplara koyarak laboratuvarımıza teslim ettiler.

Semen örnekleri 37°C sıcaklıktaki inkübatörde bekletilerek likefaksiyonlarının tamamlanması (15dk-60dk) sağlandı. Likefaksiyon sonrası rutin spermiyogram analizi yapıldı ve veriler kaydedildi. Spermiyogram sonrası kalan semen örneği çalışma kapsamında gerçekleştirilecek diğer tetkiklerin yapılması amacıyla ayrıldı.

3.3.Hasta Grupları

Çalışma kapsamında prospektif olarak, Bursa Uludağ Üniversitesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezinde spermiyogram analizi için başvuran 40adet normozoospermik (≥15mil/ml sperm konsantrasyonu) olgu çalışmaya dahil edildi. Her hastadan aynı gün birer saat arayla 2 kez ekajulat örneği alındı. Aynı hastalara ait örnekler;

Kontrol grubu; 2-5 günlük abstinens süresi sonrası alınan numuneler (n=36).

Çalışma grubu; 1 saat abstinens süresi sonrası alınan numuneler olarak gruplandı (n=36).

3.4.Semen Örneklerine Uygulanan İncelemeler ve İşlemler

Hastalardan alınan ejakulat örneklerinin rutin spermiyogram analizi gerçekleştirildi. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre standart semen analizi yapıldı (WHO, 2010).

Semen analizi öncesinde numuneler %5 CO2, % 99 nem ve 37ºC sıcaklıkta inkübatörde 15-60 dakika inkübe edilip likefaksiyonu gerçekleştikten sonra, ejakulat örneği pastör pipetiyle homojen dağılımın gerçekleşmesi için pipetlendi ve 15 ml'lik konik santrifüj tüpüne alınarak semen volümü kaydedildi. Ardından numune faz kontrast mikroskobunda incelendi, makler kamara yardımıyla sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve total motil sperm sayısı hesaplandı.

Kontrol ve çalışma gruplarını oluşturan tüm ejakulat örneklerinden yıkama öncesi 3'er adet yayma preparat hazırlandı.

Yayma preparatlarında;

1-Detaylı morfolojik değerlendirme (Diff Quick boyaması)

2-Viabilite değerlendirmesi (Eosin-Y testi)

3-Kromatin hasarının değerlendirmesi (Anilin mavisi boyaması) uygulandı.

Total antioksidan kapasitesini ve DNA fragmantasyon indeksini (DFI) değerlendirmek amacıyla her bir semen örneğinden 2 adet 0,5 ml'lik numune ayrıldı ve -20 ºC'de muhafaza edildi. Tüm numuneler toplandıktan sonra ticari kit kullanılarak enzime bağlı immünosorbent tahlil (ELİSA) yöntemiyle semen örneklerinin total antioksidan kapasitesi hesaplandı. DNA fragmantasyon indeksi TUNEL metodu kullanılarak analiz edildi.

Çalışmanın sonunda normozoospermik hasta grubunda, ardışık olarak alınan semen örneklerinde abstinens sürelerindeki farklılığa bağlı olarak ileri semen parametrelerine bakılarak kromatin bütünlüğü ve antioksidan aktiviteye etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Yapılan analizler daha detaylı olarak aşağıda açıklanmıştır.

3.4.1.Spermiyogram Testi

37°C sıcaklıkta inkübatörde yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra likefiye olan semen örneklerinin analizi yapıldı. Semen analizinde ilk olarak makroskobik inceleme yapılarak, semenin kokusu, görünümü, hacmi ve viskozitesi değerlendirildi.

Semen örneğinden10 µl hacminde alınarak Makler sayım kamerasının ortasına damlatıldı ve üzerine grid camı kapatıldı. Olympus CX31 ışık mikroskobunda 200X büyütme altında yapılan değerlendirme ile sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı ve hareketliliği değerlendirildi.

3.4.2.Basit Yıkama Yöntemi ile Sperm Eldesi

Swim-up yöntemi aşağıda basamaklarda tarif edilen biçimde gerçekleştirildi.

1- Likefiye olan 1ml semen örneği 15 ml hacimli falkon tüpü içerisine koyuldu.

2- İçerisinde semen örneği bulunan falkon tüpüne semen üzerine gelecek şekilde yavaşça 1 ml G-IVF yıkama mediumundan (G-ıvf Plus, Vıtrolıfe, Sweden) eklendi.

3- Falkon tüpü x300g'de 10 dakika santrifüj edildi.

4- Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatant kısmı atıldı.

5- Santrifüj sonrası dipte kalan 0,5 mlpellet 5 ml'lik tüp içerisinde alındı ve swim-up işlemi için üzerine 1 ml G-IVF yıkama mediumundan yavaşça (G-ıvf Plus, Vıtrolıfe, Sweden) eklendi. Tüp 45 derece eğimli olarak 37ºC'de yaklaşık 1 saat inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası tüpün içindeki kültür medyumunun en üstteki 1 ml'lik kısmı alındı. Bu kısım ileri hareketli spermleri içermektedir.

Kaliteli ve motil spermlerin bulunduğu 1 ml'lik kısımdan 10 µl makler kameraya damlatılarak sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi, total motil sperm sayısı hesaplandı. Numunenin geri kalan kısmı 0,5 ml'lik numune olarak ependorf tüplere ayrıldı ve -20ºC'de (ELİSA) yöntemiyle semen örneklerinin total antioksidan kapasitesi hesaplanması üzerine muhafaza edildi. Tüm işlemler kontrol ve deney grubu olarak ayrılan semen numunelerine uygulandı.

3.4.3. Spermlerin Morfolojik Değerlendirmesi

Kontrol (2-5 gün abstinens süresi) ve çalışma grubu (1 saatabstinens süresi) kapsamında tüm semen örneklerinde morfolojik değerlendirme yapıldı. Morfoloji değerlendirme yöntemi aşağıda basamaklarda tarif edilen biçimde gerçekleştirildi.

1- Likefaksiyon sonrası semen örneği pipetlenerek homojenize edildikten sonra cinsel perhis sürelerine göre (2-5 günlük/ 1 saatlik) elde edilen semen örneğinden 10 µl lam üzerine yayıldı.

2- Lamlar havada kurutuldu.

3- DIFF-3 Rapid Differential Stain Kit For Haematology & Microbiology adlı kit boyama için kullanıldı.

4- Preperatlar cam şale içinde 1-2 saniye sürecek şekilde 5 kez fiksatife daldırıldı.

5- 1 saniye süreyle Solüsyon A'ya 2-3 kez batırıldı.

6- 1 saniye süreyle Solüsyon B'ye 2-3 kez batırıldı.

7- Boyanan preperatlar distile suda yıkandı.

8- Havada kurulan preperatlar faz-kontrast mikroskopta (OLYMPUS CX31) X100'lik büyütmede incelendi.

Sperm morfolojik analizinde en az 200 sperm hücresinde aşağıda belirtilen Kruger kesin kriterlerine göre değerlendirme (Høst E. ve ark.,1999) yapıldı.

- Sperm başı sınırları belli oval yapılı olmalıdır.
- Sperm uzunluğu 4.0-5.0 µm, genişliği ise 2.5-3.5 µm olmalıdır.
- Akrozom bölgesinin başın %40-70 ini oluşturacak büyüklükte olmalıdır.
- Post-akrozomal alanda vakuol bulunmamalıdır.
- Orta parça ve kuyruk anomalisi bulunmamalıdır.
- Orta parça; ince, sınırları belli ve yaklaşık olarak sperm başı uzunluğunda olmalıdır.
- Orta parçanın ana ekseni sperm başının ana ekseniyle aynı hizada bulunmalıdır.
- Orta parça eni 1 mikron, uzunluğu baş uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır.
- Kuyruk boyunca genişlik aynı olmalıdır (WHO, 2010).

Tespit edilen baş, orta parça ve kuyruk anomalileri, droplet varlığı ve normal morfolojiye sahip olan sperm oranları yüzde olarak ifade edildi ve kaydedildi.

3.4.4.Spermlerin Vitalite Değerlendirilmesi

1. Likefaksiyon sonrası semen örneği pipetlenerek homojenize edildikten sonra cinsel perhis sürelerine göre (2-5 günlük/ 1 saatlik) elde edilen semen örneğinden 10 µl lam üzerine damlatıldı.

2.Semen drobunun üzerine l0 µl'lik eozine eklendi, bir pipet ucuyla çevirerek karıştırıldı ve homojen hale getirildi. Lamelle kapatıldı.

3.Preparatlar faz-kontrast mikroskopta (OLYMPUS CX31) x20 büyütmede incelendi.

4.Membran bütünlüğünü koruyan canlı hücrelerin eozine boyasını hücre içine almayan hücreler soluk renkte, membran harabiyeti nedeniyle eozinei hücre içine alan ölü hücreler pembe renkte boyandı.

5. Eozini hücre içine alma özelliklerine göre pembe (ölü) veya boyanmamış (canlı) hücreler sayıldı ve kaydedildi.

7. Her preparatta 200 sperm sayımı gerçekleştirildi.

8. Her numune için vitalite yüzde değeri hesaplandı ve kaydedildi.

3.4.5. Anilin Mavisi Boyama Yöntemi

1. Likefaksiyon sonrası semen örneği pipetlenerek homojenize edildikten sonra cinsel perhis sürelerine göre (2-5 günlük/ 1 saatlik) elde edilen semen örneğinden 10 µl lam üzerine yayıldı.

2. Yayma (smear) yapılan preparatlar havada kurutulup, oda sıcaklığında %90'lık methanol içinde 30 dakika fikse edilip kurutuldu.

3. Preparatlar 2x1 dk distile sudan geçirildikten sonra, % 4 asetik asit (pH 3.5) çözeltisi içinde % 5 anilin mavisi ile 10 dakika boyandı.

4. Boyama sonrası 3x2 dk distile su ile durulanan preparatlar havada kurutulup entellan ile kapatıldı.

5. Faz kontrast mikroskopta immersiyon yağı ile x100 büyütmede incelendi. Pozitif (mavi) ve negatif (soluk mavi) boyanan hücreler sayıldı. Her preparatta 100 sperm hücresi sayıldı ve sayılan total sperm sayısına pozitif boyanan hücreler orantılandı ve yüzde değer olarak sonuçlar kaydedildi.

3.4.6.Tunel Boyama Protokolü

Sperm DNA kırıklarını değerlendirmek amacıyla ApopTag Peroxidase InSitu Apoptosis Kit Detection kullanıldı.

1. Likefaksiyon sonrası semen örneği pipetlenerek homojenize edildikten sonra cinsel perhis sürelerine göre (2-5 günlük/ 1 saatlik) elde edilen semen örneğinden 10 µl lam üzerine yayıldı.
2. Yayma (smear) yapılan preparatlar havada kurutulup, oda sıcaklığında %90'lık methanol içinde 30 dakika fikse edilip kurutuldu.
3. Taze sulandırılmış 60 µl Proteinaz K içerisinde kesitler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
4. Distile suda 2x2 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi.
5. Sulandırılmış %3'lük Hidrojen Pereoksitte kesitler 5 dakika bekletildi.
6. PBS ile 2x5 dakika kesitlere yıkama işlemi yapıldı.
7. 75 µl EB solüsyonunda 20 saniye kesitler bekletildi.
8. Kesitlerin etrafındaki su toplandıktan sonra kesitlerin üzerine 55 µl Tdt enzimi eklendi. Nemli ortamda 37°C'de 1 saat inkübatörde bekletildi.
9. Kesitler 10 dakika oda sıcaklığında Stop Wash Buffer ile inkübe edildi.
10. Kesitlerin etrafındaki su toplandıktan sonra 65 µl Anti-Digoxigenin eklenerek nemli ortamda 30 dakika bekletildi.
11. PBS ile 2x5 dakika yıkandı.
12. Kesitlere 3-6 dakika 75 µl Peroxidan Substrat boyaması yapıldı. Optimal boyanma zamanını saptamak için kesitler kontrol edildi.
13. Distile suda 3x1 dakika yıkama işlemi yapıldı.
14. Alkol serilerinden geçirilip kuruduktan sonra entellan ile kapatıldı.

3.4.7 Elisa Protokolü

Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler hazırlandı. (2-5 günlük ve 1 saatlik semen numunelerine basit yıkama işlemi yapıldıktan sonra swim-up işlemi yapılmıştır. Swim up işleminden sonra kaliteli ve motil spermlerin bulunduğu kısım ependorfa ayrılarak -20ºC'de dondurulduu.) Bu analizde Human Total Antioxidant Status ELİSA Kit kullanıldı .

1. Dondurulan semen örnekleri oda sıcaklığında çözüldü.
2. Standart kuyuya 50µl standart eklendi. Standart çözelti biyotinlenmiş antikorlar içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmedi.
3. Numune kuyularına 40µl semen numunesi eklendi.
4. Numunelerin üzerine 10µl anti-TAS antikorları eklendi.
5. Numune kuyularına ve standart kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP ilave edildi.
6. Plaka bir kapatıcı ile örtüldü. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
7. 7.Kapatıcı çıkarıldı ve plaka yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Her yıkama için 30 saniye ila 1 dakika süreyle en az 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyular ıslatıldı. Otomatik yıkama için tüm kuyular aspire edildi ve yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı. Plaka kağıt havlu ile üzeri kurulandı.
8. Her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyuya 50µl substrat solüsyonu B eklendi. Yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plak 37°C'de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
9. Her kuyucuğa 50µl durdurma solüsyonu eklendikten sonra mavi renk hemen sarı renge döndü.
10. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroplaka okuyucu kullanarak her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.

4.BULGULAR

Bu çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarına Kasım 2020 ve Nisan 2021 tarihleri arasında rutin spermiyogram analizi için başvuran, çalışmaya katılmak için gönüllü olan 36 erkek hastaya ait semen örnekleri kullanıldı. Aynı hastalardan ardışık ejakulasyonla toplanan 72 semen örneği 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubu; 2-5 günlük abstinens süresi sonrası alınan numuneler (n=36) ve çalışma grubu; bir saat abstinens süresi sonrası alınan numuneler olacak şekilde ayrıldı(n=36). Farklı abstinens sürelerine bağlı olarak rutin sperm parametreleri, sperm kromatin bütünlüğü, DNA hasarı ve antioksidan aktivitenin karşılaştırmalı analizi yapıldı.

Hastaların demografik özellikleri olarak ortalama yaşları ve ortalama vücut kitle indeksi (BMI) değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Yaş ortalaması (yıl) 33,79±4,32 olarak, BMI ortalaması (kg/m^2) 26,48±2,29 olarak belirlendi. Hasta gruplarında kronik hastalıkları, cerrahi öyküleri ile sigara ve alkol kullanımları benzerlik gösterdiği için bu dört parametrede istatistiksel analize dahil edilmedi.

Tablo 3. Hastaların Demografik Özellikleri

Değişkenler	**Mean ± SD**
Erkek Yaşı (yıl)	33,79 ± 4,32
Erkek BMI (kg/m^2)	26,48 ± 2,29

4.1.Rutin Semen Parametreleri Sonuçları

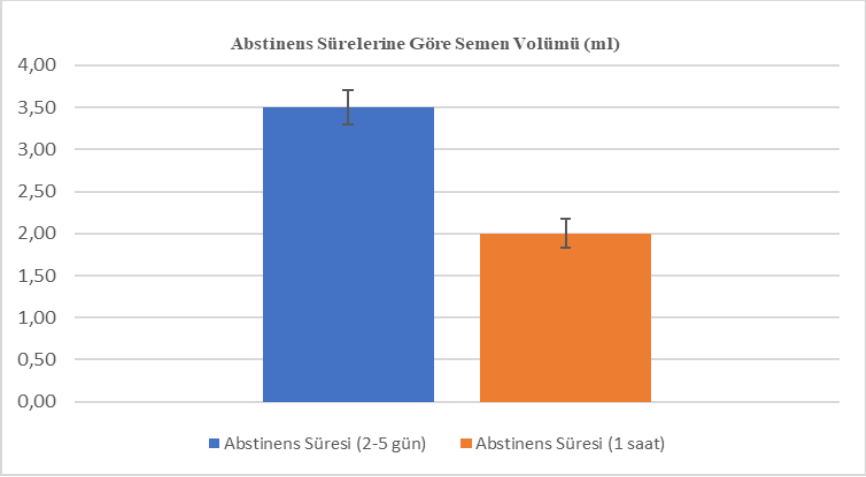
Farklı abstinens sürelerine göre yıkama öncesi ve yıkama sonrası rutin semen parametreleri değerlendirildi. Kontrol grubunda (2-5 günlük abstinens sonrası) semen volümü 3.5 milyon/ml (2.6-5.0), çalışma grubunda (1 saatlik abstinens sonrası) 2 milyon/ml (1.1-2.5) olarak bulundu. Semen volümünün abstinens süresindeki kısalma ile birlikte anlamlı olarak azaldığı görüldü.

Yıkama öncesi semen volümü ve total motil sperm sayısında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanırken (sırasıyla p=0.0001 ve p=0.0001), konsantrasyon, motilite, morfoloji ve vitalitede gruplar arası anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla p=0.161, p=0.851 ve p=0.807) (Tablo 4, Grafik 1).

Tablo 4. Farklı Abstinens Sürelerine Göre Yıkama Öncesi Semen Parametreleri

Değişkenler (Yıkama Öncesi)	**Abstinens Süresi (2-5 gün) (Median%25-%75 Percentiles)**	**Abstinens Süresi (1 saat) (Median%25-%75 Percentiles)**	***p* Değeri**
Volüm (ml)	3,5 (2,6-5,0)	2 (1,1-2,5)	**0,0001***
Konsantrasyon (mil/ml)	88 (49,2-133,7)	73,5 (32-121,7)	**0,161**
Motilite (%)	67 (53,2-80)	73,5 (49-83,3)	**0,851**
TPMS (mil.)**	191 (91,7-307,8)	98 (36,2-151,5)	**0,0001***
Morfoloji (%)	2 (1-3)	2 (1-3)	**0,244**
Vitalite(%)	80 (72-85)	80 (72,2-85,7)	**0,807**

***WilcoxonSignedRanks Test **TPMS: Total Motil Sperm Sayısı**



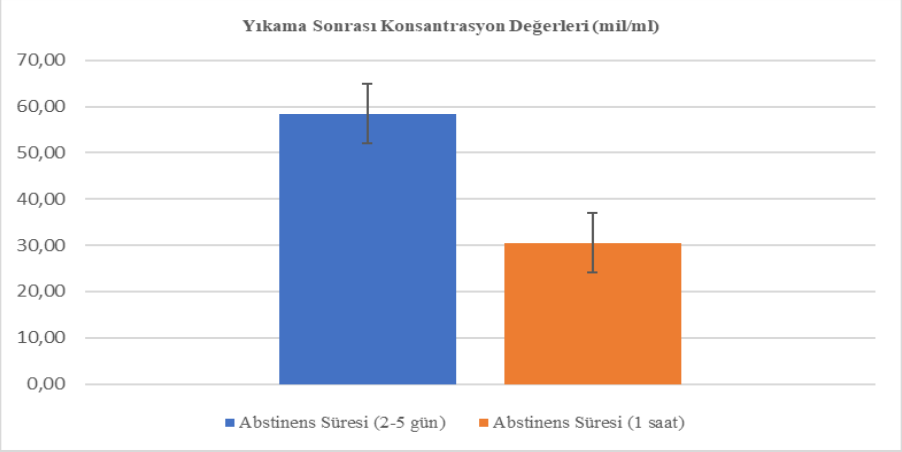
Grafik 1. Farklı Abstinens Sürelerine Göre Yıkama öncesi Semen Volümündeki Değişiklik

Farklı abstinens sürelerine göre yıkama sonrası rutin sperm parametreleri değerlendirildiğinde; konsantrasyonun gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülürken (p=0.0001), motilite değerlerinin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edildi (p=0.804) (Tablo 5, Grafik 2).

Tablo 5. Farklı Abstinens Sürelerine Göre Yıkama Sonrası Semen Parametreleri

Değişkenler (Yıkama Sonrası)	**Abstinens Süresi (2-5 gün) (Median%25-%75 Percentiles)**	**Abstinens Süresi (1 saat) (Median%25-%75 Percentiles)**	***p* Değeri**
Konsantrasyon (mil/ml)	58,5 (49,2-133,7)	30,5 (35,2-84)	**0,0001***
Motilite (%)	72,5 (60-87)	74,5 (64-83,7)	**0,804**

***Wilcoxon Signed Ranks Test**



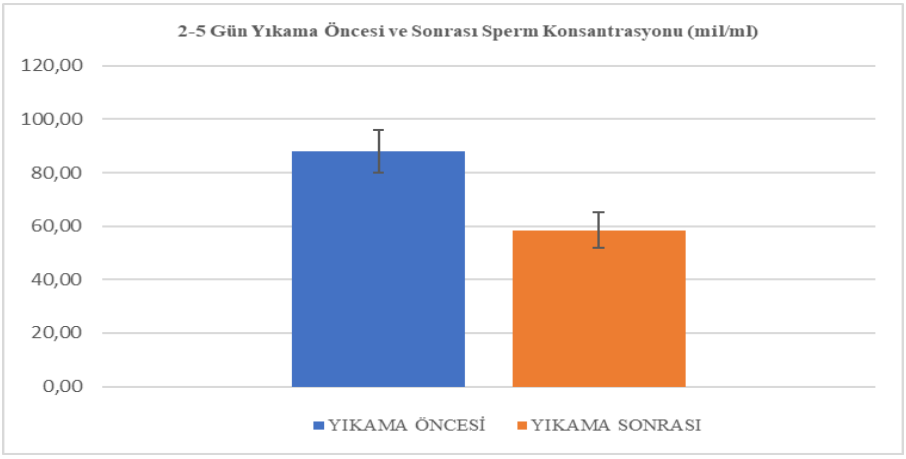
Grafik.2. Yıkama Sonrası Abstinens Sürelerine Bağlı Olarak Konsantrasyon Değerleri

Her iki abstinens grubunun kendi içinde yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm parametreleri sperm konsantrasyonu ve motilitesi açısından karşılaştırıldı. Kontrol grubunu oluşturan 2-5 günlük abstinens sonrası alınan numunelerde; yıkama öncesi ve yıkama sonrası (swim-up) sperm konsantrasyonu ve motilitesi değerlendirildiğinde, sperm konsantrasyonlarında yıkama öncesi grup lehine ve motilitelerinde yıkama sonrası grup lehine anlamlı farklılık tespit edildi (sırasıyla p=0.001 ve p=0.002) (Tablo 6, Grafik 3 ve Grafik 4).

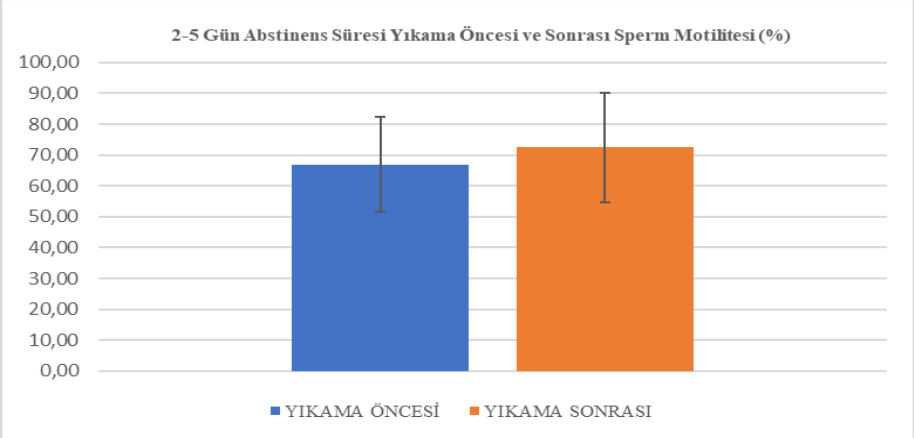
Tablo 6. 2-5 Günlük Abstinens Süresi Sonrası Yıkama öncesi ve Yıkama Sonrası Sperm Parametreleri

Değişkenler **(2-5 günlük abstinens süresi)**	**Median** **(Median%25-%75 Percentiles)**	***p*** **değeri**
Yıkama Öncesi Konsantrasyon (mil/ml)	88 (49,2-133,7)	**0,001***
Yıkama Sonrası Konsantrasyon (mil/ml)	58,5(35,2-84)	
Yıkama Öncesi Motilite (%)	67 (53,2-80)	**0,002****
Yıkama Sonrası Motilite (%)	72,5 (60-87)	

***Wilcoxon Signed Ranks Test** ****PairedSamples Test**



Grafik.3. 2-5 Günlük Abstinens Süresinin Yıkama Öncesi– Yıkama Sonrası Sperm Konsantrasyonları



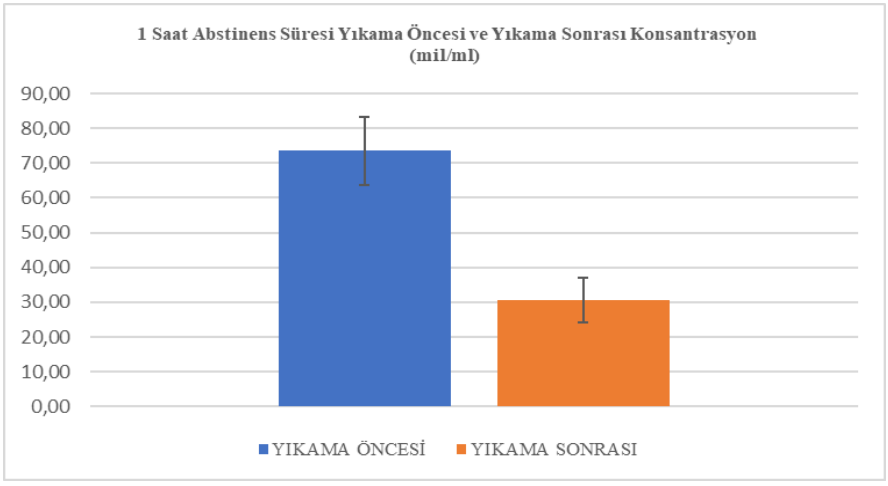
Grafik.4. 2-5 Günlük Abstinens Süresinin Yıkama Öncesi– Yıkama Sonrası Sperm Motiliteleri

Çalışma grubunu oluşturan 1 saatlik abstinens sonrası alınan numunelerde yıkama öncesi ve yıkama sonrası (swim-up) sperm konsantrasyonu ve motilitesi değerlendirildiğinde, sperm konsantrasyonlarında yıkama öncesi grup lehine ve motilitelerinde yıkama sonrası grup lehine anlamlı farklılık tespit edildi (sırasıyla p=0.0001 ve p=0.007) (Tablo 7,Grafik 5. ve Grafik. 6.)

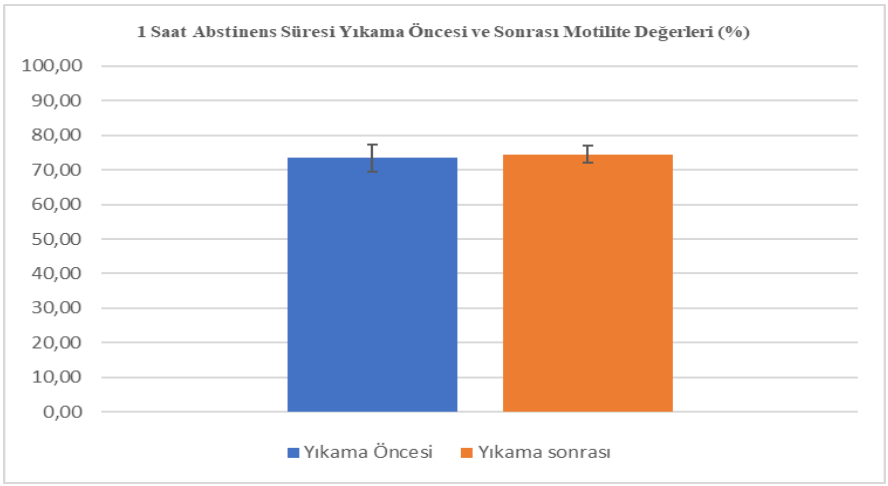
Tablo 7. 1 Saatlik Abstinens Süresine Göre Yıkama Öncesi ve Yıkama Sonrası Sperm Parametreleri

Değişkenler (1 saatlik abstinens süresi)	**Median (Median%25-%75 Percentiles)**	***p* Değeri**
YıkamaÖncesi Konsantrasyon	73,5 (32,0-121,7)	**0,0001***
YıkamaSonrası Konsantrasyon	30,5 (17,2-77,7)	
Yıkama Öncesi Motilite	73,5 (49-83,3)	**0,007***
Yıkama Sonrası Motilite	74,5 (64-83,7)	

***Wilcoxon Signed Ranks Test**

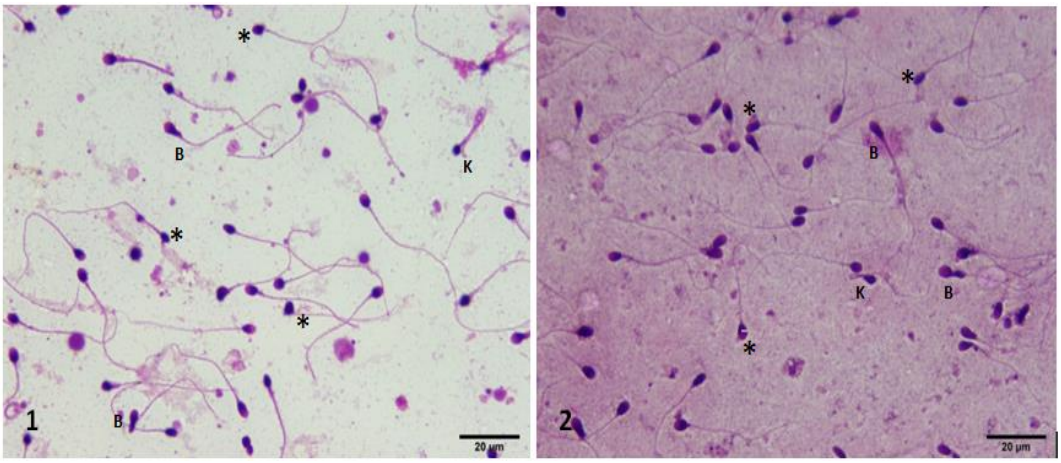


Grafik.5. 1 saat Abstinens Süresinin Yıkama Öncesi– Yıkama Sonrası Sperm Konsantrasyonları



Grafik 6. 1 saat Abstinens Süresinin Yıkama Öncesi– Yıkama Sonrası Sperm Motilitesi

Çalışma kapsamında her iki abstinens süresi sonrası toplanan numunelere yıkama öncesinde morfolojik değerlendirme yapıldı. Spermiyogram analizinde rutin morfolojik değerlendirmede kullanılan Diff Quick boyaması sonrası yayma preparatlar x100 objektif ile immersiyon yağı damlatılarak incelendi. Sperm morfolojileri baş, boyun kuyruk anomalileri dikkate alınarak sayıldı ve kaydedildi (Şekil 10). Normal morfolojili sperm oranında kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.244).

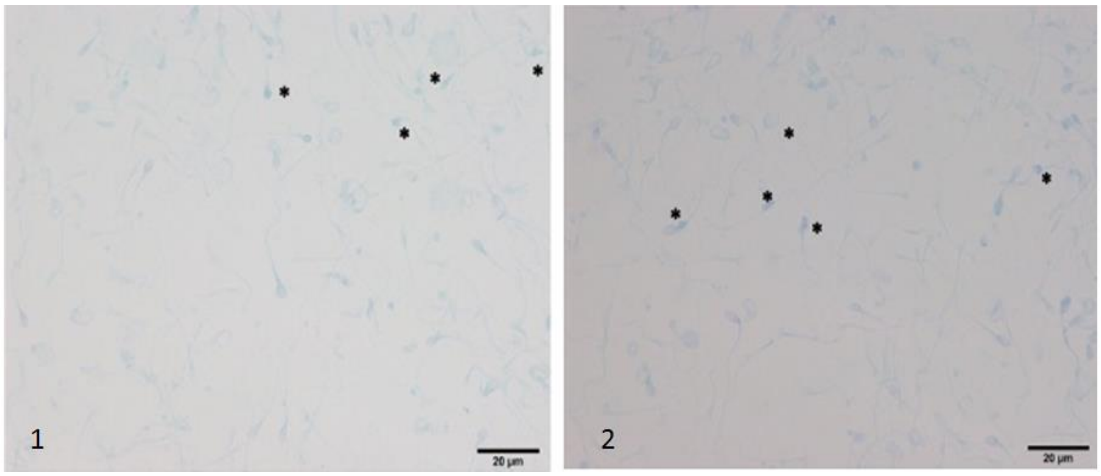


Şekil 10. Farklı Abstinens Sürelerine Göre (**10.1.** 2-5 Günlük Abstinens Süresi,**10.2.** 1 Saaatlik Abstinens Süresi) Diff Quick boyaması *:Baş Anomalisi, B: Boyun Anomalisi, K:Kuyruk Anomalisi

Sperm viabilitesini değerlendirmek amacıyla yapılan eozine boyaması sonucunda boyayı sitoplazmasına alan ve almayan hücreler sayıldığında kontrol ve çalışma gruplarından yıkama öncesi gerçekleştirilen viabilite analizinde her iki grupta da ortalama %80 viabilite saptandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p=0.807).

4.2.Sperm Kromatin Bütünlüğü, DNA Fragmantasyonu ve Antioksidan Aktivite Analizi Sonuçları

Kontrol ve çalışma gruplarına ait numunelerden yıkama öncesi hazırlanan yayma preparatlara sperm kromatin kondansasyon düzeyini değerlendirmek amacıyla yapılan anilin mavisi boyama sonuçlarında boyanmamış hücreler (anilin mavisi negatif-AB-(-)) kondanse olmuş kromatine sahip spermler olarak kaydedildi. Mavi boyanan hücreler (anilin mavisi pozitif-AB-(+)) kromatin kondansasyon anomalisine sahip spermler olarak kaydedildi (Şekil 17). Kontrol grubunda kromatin kondansasyon anomalisi %9 (7-11.7) olarak bulundu. Abstinens süresindeki kısalma sonucunda 1 saatlik abstinens sonrası kromatin kondansasyon anomalisi %5.5 (4-8.5) oranında saptandı (Tablo 7). Kısa abstinens süresinin kromatin hasarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı görüldü *(p=0.0001)* (Tablo 7, Şekil.11).



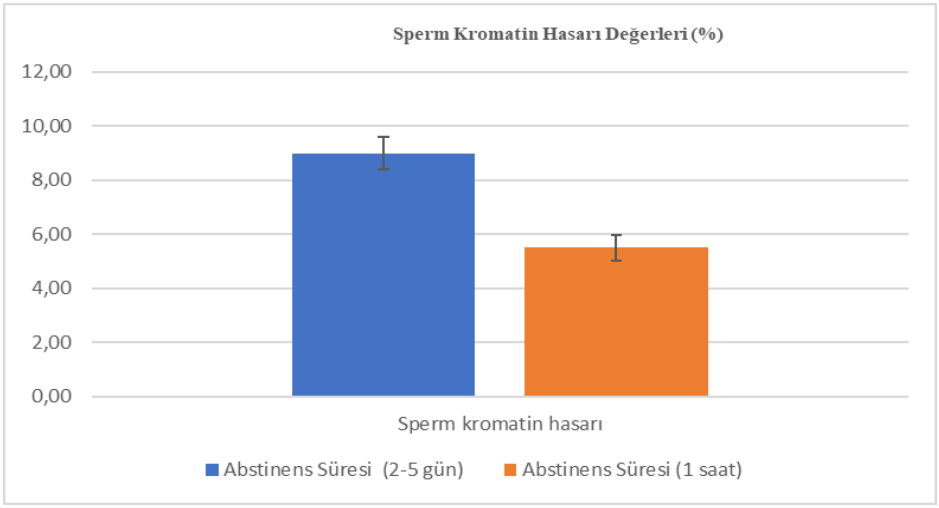
Şekil.11. Farklı Abstinens Sürelerine Göre (**11.1.** 2-5 Günlük Abstinens Süresi, **11.2.** 1 Saaatlik Abstinens Süresi) Anilin Blue boyaması*****:Sperm Kromatin Hasarına Sahip Hücreler

Tablo 7. Sperm Kromatin Hasarı ve Sperm DNA Fragmantasyon Yüzdesi İle Total Antioksidan Kapasite

Değişkenler	**Abstinens Süresi (2-5 gün) (Median%25-%75 Percentiles)**	**Abstinens Süresi (1 saat) (Median%25-%75 Percentiles)**	***p* Değeri**
Anilin Blue (%)	9 (7-11,7)	5,5 (4-8,5)	**0,0001***
TUNEL(%)	9,5 (5,5-12,2)	5,5 (4,2-7,7)	**0,002****
TAC (IU/ml)	3,1 (1,0-4,1)	2,9 (1,1-4,5)	**0,984**
TAC (IU/ml)	**3,1 (1,0-4,1)**	**2,9 (1,1-4,5)**	**0,984**

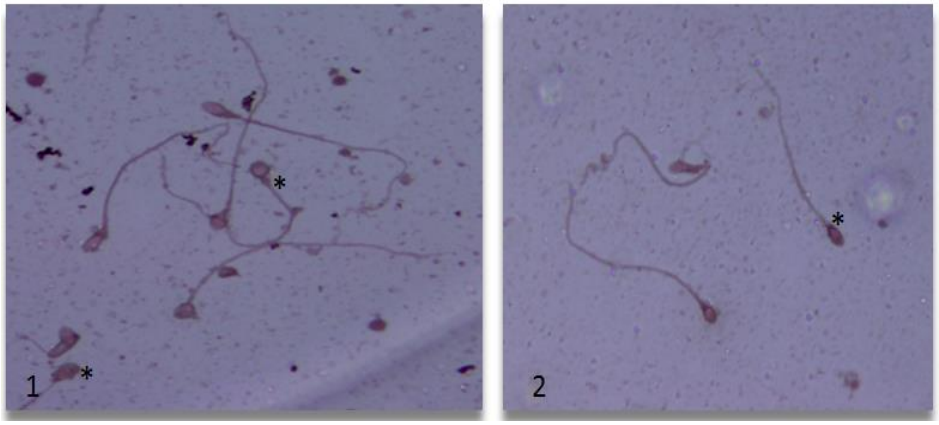
***Wilcoxon Signed Ranks Test ** PairedSamples Test**

TAC: Total Antioksidan Kapasite

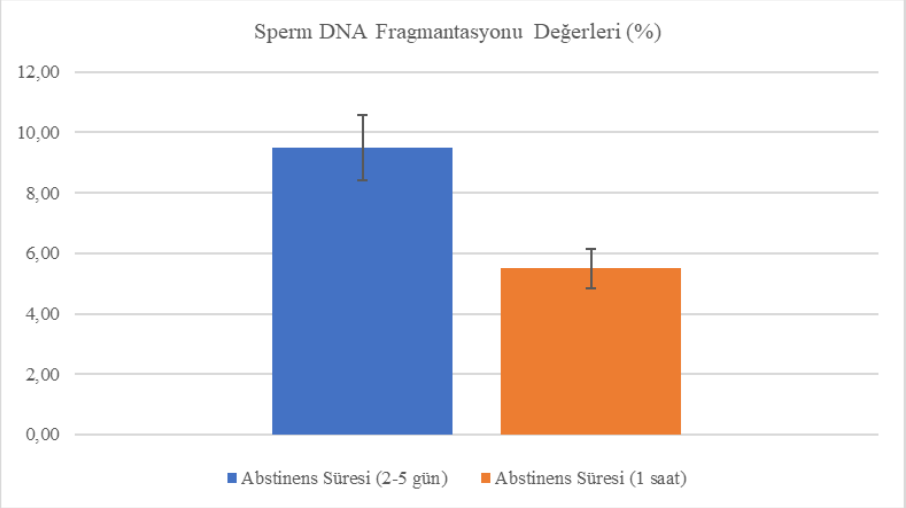


Grafik.7. Farklı Cinsel Perhis Sürelerine Göre Sperm Kromatin Hasarı Yüzdeleri

Yıkama öncesi sperm DNA kırıklarının TUNEL tekniği ile analizinde DAB kromojen ile koyu kahverengi boyanan çekirdeğe sahip spermler DNA fragmantasyonu pozitif (TUNEL pozitif- T(+)) olarak, açık kahverengi boyanan çekirdeğe sahip spermler normal DNA'ya sahip (TUNEL negatif-T(-)) spermler olarak kaydedildi (Şekil 12). Kontrol grubunda DNA fragmantasyon yüzdesi %9,5(5,5-12,2) olarak bulundu. Abstinens süresindeki kısalma sonucunda 1 saatlik abstinens sonrası kromatin kondansasyon anomalisi %5.5 (4,2-7,7) oranında saptandı (Tablo 7). Kısa abstinens süresinin sperm DNA fragmantasyon oranını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı görüldü (p=0.002) (Grafik 8.).



Şekil.12. Farklı Abstinens Sürelerine Göre (12.1. 2-5 Günlük Abstinens Süresi, 12.2. 1 Saatlik Abstinens Süresi) TUNEL boyaması *:Sperm DNA Hasarına Sahip Hücreler



Grafik 8. Farklı Abstinens Sürelerine Göre Sperm DNA Fragmantasyonu Yüzdeleri

Korelasyon analizlerine bakıldığında, yıkama öncesi volüm ve konsantrasyonun abstinens sürelerine bağlı olarak korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 8.)

Aynı zamanda yıkama öncesi sperm DNA fragmantasyonu ve sperm morfolojisi arasında ise korelasyon bulunmamıştır (Tablo 9).

Tablo 8. Farklı Abstinens Süresine Göre Volüm ve Konsantrasyon Korelasyon Analizi

Değişkenler (Yıkama Öncesi) Korelasyon Analizi	**Abstinens Süresi (2-5 gün) r değeri**	**Abstinens Süresi (1 saat) r değeri**
Volüm-Konsantrasyon	0,679	0,619
***p* Değeri**	**0,0001***	**0,0001***

***Pearson Test**

Tablo 9. 2-5 Günlük Abstinens Süresine Göre Sperm DNA Fragmantasyonu ve Sperm Morfolojisi Korelasyon Analizi

Değişkenler (Yıkama Öncesi) Korelasyon Analizi	**Abstinens Süresi (2-5 gün) r değeri**	***p* Değeri**
Sperm DNA Fragmantasyonu ve Sperm Morfolojisi	0,190	**0,554**

***Spearman Test**

Tablo 10.Yıkama Sonrası Abstinens Sürelerine Göre Konsantrasyon ve Motilite Korelasyon Analizi

Değişkenler (Yıkama Sonrası Korelasyon Analizi	**Abstinens Süresi (2-5 gün) r değeri**	**Abstinens Süresi (1 saat) r değeri**
Konsantrasyon- Motilite	0,220	**0,448**
***p* Değeri**	**0,197***	**0,006***

***Spearman Test**

Yıkama sonrası korelasyon analizlerine bakıldığında, 2-5 günlük cinsel perhis süresinde konsantrayon ve motilite değerleri arasında korelasyon görülmezken, 1 saatlik cinsel perhis süresinde konsantrasyon ve motilite değerleri arasında anlamlı korelasyon görülmüştür. (Tablo 10).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu prospektif çalışmada, ardışık ejakulasyonla elde edilen semen örneklerinde farklı abstinens sürelerinin rutin sperm parametreleri, sperm kromatin bütünlüğü, DNA hasarı ve antioksidan aktiviteye etkisi araştırılmıştır. Kısa abstinens süresinin sperm konsantrasyonunu ve total motil sperm sayısını azaltmış olmakla birlikte, antioksidan aktiviteyi değiştirmemiş, ardışık ejakulasyon sperm kromatin hasarı ve DNA bütünlüğünü iyileştirici etki göstermiştir.

Abstinens süresine bağlı olarak değişen sperm parametrelerinin başında semen volümü gelmektedir. Literatürde abstinens süresindeki kısalmanın semen volümünü azalttığını raporlayan retrospektif ve prospektif çalışmalar mevcuttur (Levitas ve ark.;2004; Pellestor ve ark.;1993; 2014; Sanche-Martin ve ark.,2013; Sunanda ve ark.). Kısa abstinens süresi nedeniyle semen volümünde oluşan azalmanın, seminal veziküller ve prostat gibi seminal sıvının kaynağı olan yardımcı genital bezlerin yeterli salgı yapamamasına bağlı olduğu bilinmektedir. Bu organların epitel dokuları, mRNA üretimini ve endoplazmik retikulumun sentez fonksiyonunu düzenleyen ve böylece seminal plazma proteinlerinin üretimini arttıran androjenler tarafından uyarılmaktadır.

Bunu destekler nitelikte,cinsel perhiz süresinin artışı ile serum testosteron seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2003).Bu çalışmada literatürü destekler nitelikte, semen hacmi cinsel perhiz süresi kısaldıkça anlamlı ölçüde azalmıştır.

Abstinens süresindeki kısalma semen volümünde negatif etki göstermekle birlikte, sperm konsantrasyonu, motilitesi, viabilitesi ve morfolojisinde olumlu ya da olumsuz bir etki göstermemiştir. Fakat semen volümü ile direkt ilişkili olan total progressif sperm sayısında da azalma görülmüştür. Diiğer bir semen parametresi olan sperm konsantrasyonu, semen kalitesinin kritik bir göstergesi ve fertilite potansiyeli için prognostik bir faktördür. Yapılan çalışmalara baktığımızda, cinsel perhiz süresi ile sperm konsantrasyonunun doğrusal bir ilişki içinde olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Carlsen ve ark.,2004; Guzick ve ark.,2001; Marshburn ve ark.,2010).

Buna karşılık yapılan iki çalışmada, uzun cinsel perhiz süresi sonrası sperm konsantrasyonunda hafif bir artış tespit edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı raporlanmıştır (Oldereid ve ark.,1984; Padova ve ark.,1988).

Bu çalışmada da benzer şekilde mililitre bazında sperm konsantrasyonu olumsuz yünde etkilenmemiştir, fakat tüm numune bazında değerlendirildiğinde total motil sperm konsantrasyonu anlamlı oranda azalmıştır.

Total motil sperm sayısının klinik başarıda belirleyici olduğu bilinmektedir. İntra uterin inseminasyon ve in vitro fertilizasyon uygulamalarında bu bulgu önemli olmakla birlikte, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulamalarında fertilizasyon başarısına olumsuz bir etkisi söz konusu olmayacaktır.

Cinsel perhiz süresine göre değişebilecek bir diğer parametre sperm motilitesidir. Çeşitli çalışmalar, cinsel perhiz süresi ile sperm motilitesi arasında ters korelasyon olduğunu göstermektedir (Lehavi ve ark.,2014 ; Levitas ve ark.;2004; Marshburn ve ark.,2010;). Cinsel perhiz süresi ile motilite arasında herhangi bir korelasyon olmadığını raporlayan çalışmalarda mevcuttur (De Jonge ve ark.,2004; Mayorga-Torres ve ark.,2016).Bu çalışmada abstinens süresindeki uzamanın sperm motilitesini olumlu ya da olumsuz etkilemediği görülmüştür.

Bununla birlikte, sperm konsantrasyonunda olduğu gibi, kısa abstinens süresi sonucunda semen volümü azaldığı için, volüm ile direkt bağlantılı olduğu için total motil sperm sayısında anlamlı azalma saptanmıştır.

Rutin semen parametrelerinden sperm morfolojisinin abstinens süresi ile korelasyonunu değerlendiren çalışmalarda anlamlı bir fark oluşturmadığı bildirilmiştir (Dupesh ve ark., 2020; Scarselli ve ark., 2019). Dupesh ve ark. yaptığı çalışmada farklı abstinens gruplarında değerlendirme yapıldığında, gruplar arasında değerlerin ortalama olarak birbirlerine yakın olduğu, en yüksek normal morfolojide sperm yüzdesinin 8-15 günlük perhiz sonrasında elde edildiği belirtilmiş, ancak istatistiksel anlamlılık göstermediğini belirtmişler. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaları destekler nitelikte normal sperm morfoloji yüzdesi ve cinsel perhiz süresi arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Abstinens süresi ve sperm canlılığı arasındaki korelasyonu değerlendiren bir çalışmada cinsel perhiz süresinin sperm canlılığı ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Abstinens süresinin sperm canlılığı yanında fertilizasyon yeteneğini de etkilenmediğini göstermiştir (Shi ve ark.,2018). Benzer bulgular bu çalışmada da elde edilmiştir.

Aynı zamanda sperm canlılığı ve cinsel perhis süresi arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Fazla örneklem grubuyla gerçekleştirilen (2458 semen örneği) bir çalışmada cinsel perhiz süresine göre sperm parametrelerinden volüm, konsantrasyon ve morfolojinin abstinens süresine bağlı olarak yapılan korelasyon analizinde, sperm volüm ve konsantrasyonunun abstinens süresi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisinin olduğu belirtilmiştir. Ancak sperm morfolojisi ve abstinens süresi arasında korelasyon tespit edilmemiştir (Comar ve ark., 2017). Bu çalışma küçük örneklem grubunda gerçekleştirilmekle birlikte, literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

İnseminasyon için kullanılacak spermin kalitesini tercih edilen sperm hazırlama yöntemleri değiştirmektedir. Semen yıkama metodlarında amaç konsantrasyon, motilite, morfoloji ve viabilite açısından kaliteli spermin eldesini sağlamaktır. Yıkama sonrası sperm motilitesi ve sperm konsantrasyonu semen parametrelerine göre yıkama metodunun uygunluğunu gösteren en önemli iki parametredir. Swim-up yöntemi sperm konsantrasyonunu azaltan bir yıkama metodu olmakla birlikte, sperm total ve progressif motil sperm sayısı, morfolojisi ve viabilitesi açısından en avantajlı yöntemdir (Inaudi ve ark.,2002; Ricci ve ark.,2009). Literatürde de desteklenen ve kabul gören bir yaklaşım olarak, kurumumuzun üremeye yardımcı tedavi merkezinde normozoospermik olgularda inseminasyon için sperm hazırlığında swim-up yöntemi tercih edilmektedir.

Bu nedenle normozoospermik olguları kapsayan bu çalışmada yıkama öncesi ve swim-up yıkaması sonrası sperm parametreleri iki farklı abstinens grubunda karşılaştırıldı. Literatür bilgisi ile uyumlu şekilde hem 2-5 günlük abstinens süresi grubu hem de 1 saatlik abstinens süresi grubunda, swim-up sonrası motilitenin anlamlı olarak arttığı görülürken, konsantrasyonun anlamlı olarak azaldığı tespit edildi.

Abstinens süresinin sperm kromatin bütünlüğü ve sperm DNA fragmantasyonu ile arasında ilişki olabileceğine dair görüşler mevcuttur. Abstinens süresi attıkça, epididimal depolanma sürecinde ROS'un (mitokondriyal hasar/lökosit sayısı) arttığı ve böylelikle sperm DNA hasarının ve dolayısıyla DNA Fragmantasyon yüzdesinin anlamlı olarak arttığı belirtilmiştir (Agarwal ve ark.,2016; Comar ve ark.,2017).

Benzer çalışmalar, daha kısa abstinens süresinin, üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında sperm DNA fragmantasyonu insidansında azalmaya ve gebelik oranlarında artışa neden olduğu raporlanmıştır (Gosálvez ve ark., 2011; Sánchez-Martín ve ark., 2013). Bu çalışmadada, 1 saatlik cinsel perhiz süresinin 2-5 günlük cinsel perhiz süresine göre DNA fragmantasyon yüzdesini anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. Kısa abstinens süresi, I. ve II. mayozunu tamamlamış spermin epididimiste depolanması sırasında granülositler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksik etkilerine daha az maruz kalma ile ölü hücre konsantrasyonunun azalması ve daha genç bir sperm popülasyonu ile sonuçlandığı raporlanmıştır (Du ve ark.,2010). Ardışık ejakulasyonlarda sürenin kısa olması spermlerin epididimisten geçişini hızlandırır ve sonuç olarak sperm ROS'un zararlı etkilerine daha az maruz kalır. ROS tarafından oluşan oksidatif strese maruziyetin azalması sperm kromatin bütünlüğünde bir iyileşmeye yol açar (Irvine ve ark., 2000). Sperm kromatin hasarının değerlendirildiği bir çalışmada, abstinens sürelerine göre 2-5 güne karşı, 1 saat sonra elde edilen ejakülatlar karşılaştırılmış ve 2-5 gün abstinens sonrası alınan ejakulat örneklerinde normal sperm kromatin yüzdesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Çalışmada çok kısa abstinens süresine (1 saat) bizim çalışmamızda olduğu gibi yer verilmiştir. Kısa cinsel perhis göz önüne alındığında olgun kromatin yüzdesinde 1 saatlik abstinens süresi grubunda artış olduğu vurgulanmıştır (Scarselli ve ark.,2019). Bu yorumlar göz önüne alınarak bizim çalışmamıza baktığımızda da cinsel perhis süresi azaldıkça sperm kromatin hasarının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.

Oksidatif stresin sperm hasarının en yaygın nedenlerinden biri olduğu ve fertilizasyon kapasitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir (Aitken ve ark., 2015). Oksidatif stres, spermin lipid ve protein yapılarına, DNA'sına zarar vermektedir (Aitken ve ark., 2016; Gavriliouk ve ark., 2015;).

Sperm hücrelerinin bu tür hasarı onarmak için kendi savunma mekanizmaları vardır ve bu mekanizmalar başarısız olduğunda üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) ile toplam antioksidan kapasite (TAC) arasında bir dengesizlik oluşur (Aitken ve ark., 2016). ROS üretimi ve TAC arasındaki dengesizlik sonucunda oluşan yüksek seviyelerdeki oksidatif stres, sonuçta sperm çekirdeğindeki DNA'ya zarar verir; erkek germ hücre hattındaki DNA hasarının ağırlıklı olarak oksidatif stresle indüklendiği ve bu hasarın bu tür strese karşı spermin savunmasızlığını yansıttığı düşünülmektedir (Aitken ve ark.,2017).

Yapılan çalışmalarda, rutinde kabul gören 4 günlük cinsel perhiz ile karşılaştırıldığında, kısa abstinens (1 gün) süresi ile total antioksidan kapasite arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir (Marshburn ve ark.,2014).

Abstinens süresinin, epididim veya diğer yardımcı genital bezlerinin ROS ortamı üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Abstinens süresini kısaltarak epididim veya vas deferenste yaşlı sperm nüfusu azaltılabilir. Böylelikle ROS oluşumuna sebep olan ölü ve anomalili sperm kaynağının önüne geçilerek TAC'ın koruyucu etkisini azaltılır (Marshburn ve ark.,2014). Bizim çalışmamızda da 2-5 günlük cinsel perhis süresinin 1 saatlik cinsel perhis süresine göre karşılaştırıldığında total antioksidan kapasitenin 1 saatlik grupta daha düşük olduğu, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Çalışmada örneklem sayısının az olması nedeniyle istatistiksel anlamlılığın elde edilemediği düşünülmüştür.

Bu çalışmada sperm fonksiyonu ve klinik etkinliği üzerine bir değerlendirme yapılmamakla birlikte, literatürde klinik anlamda baktığımızda oligozoospermik olgularda kısa abstinens sonrası elde edilen spermlerden elde edilen embriyolarda anöploidi oranının daha düşük olduğu raporlanmıştır (Scarselli ve ark.,2019).

Bu çalışmanın bir ön çalışma olduğu ve planladığımız araştırma projesinde; ardışık olarak aynı hastadan alınan ejakulat örneklerinde spermin kalitatif, kantitatif anlamda yapısal ve fonksiyonel kapasitesini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada abstinens süresindeki kısalmanın rutin semen parametrelerinde, sperm kromatin matürasyonu ve DNA bütünlüğünün korunmasında etkin olduğu gösterilmiştir. Anlamlı olmamakla birlikte, kısa abstinens süresi antioksidan kapasitede iyileştirici bir etki göstermiştir. Sperm konsantrasyonunu ve bununla bağlantılı olarak total progressif sperm sayısını azaltmakla birlikte, normozoospermik olgularda tercih edilen üremeye yardımcı tedavi yaklaşımına göre inseminasyonda kromatin ve DNA bütünlüğü açısından daha kaliteli sperm kullanılmasına imkan sağlayacaktır. Ardışık ejakulasyonun üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında laboratuvar sonuçlarını ve klinik başarıyı olumlu etkileyeceği kanaatindeyiz.

6.KAYNAKLAR

Abraham, L., Demir R. (2006). Üreme Sistemi Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık, 531-564.

Agarwal A. (2006). Sharma R.K., Nallella K.P., Thomas A.J., Alvarez J.G., Sikka S.C. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. Fertil Steril.86(4):878–885.

Agarwal A., Gupta S., Plessis S.D., Sharma R. , Esteves S.,Caroline Cirenza C.,Eliwa J., Al Najjar W., Kumaresan D.,Haroun N., Philby S., Sabanegh E.(2016). Abstinence Time and Its Impact on Basic and Advanced Semen Parameters.Urology. 94:102-10

Agarwal A., Varghese A.C., Sharma R.K. (2009). Markers of oxidative stres and sperm chromatin integrity. Methods Mol Biol.590:377-402.

Agarwal A., Virk G., Ong C., du Plessis S.S. (2014) Effect of oxidative stres on male reproduction. World J. Men's Health. 32:1-17.

Aitken R.J. (2017).Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. Mol Reprod Dev. 84;1039;1052.

Aitken R.J., Clarkson J.S. (1988).Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. 9(6):367-76.

Aitken R.J., Harkiss D., Buckingham D. (1993).Relationship between iron catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function, J. Reprod Fertil.98:257–265.

Aitken R.J., Smith T.B., Jobling M.S., Baker M.A., De Iuliis G.N. (2014) Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl.* 16:31–38.

Aitken R.J., Gibb Z., Baker M.A., Drevet J. (2016) Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *ReprodFertil Dev.* .28:1–10.

Alvarez J.G., SharmaR.K.,Ollero M.,Saleh R.A., Lopez ve ark. (2002). Increased DNA damage in sperm from leukocyto spermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril.78(2):319-29.

Amann R.P. (2009). Considerations in evaluating human spermatogenesis on the basis of total sperm perejaculate. J.Androl .30:62641.https://doi.Org/10.2164/ jandrol. 108.006817.

Baehner R.L., Boxer L.A., Davis J .(1976). The biochemical basis of nitro blue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes, Blood.48:309-13.

Bahadur G., Almossawi O., Zaid Z., Ilahibuccus A., Al-Habib A., Muneer A., Okolo S. (2015). Semen characteristics in consecutive ejaculates with short abstinence in subfertile males. Reprod Biomed Online.32:323–328.

Barratt C.L. (2007). Semen analysis is the cornerstone of investigation formale infertility. Practitioner..251:8-10, 12, 5-7.

Batislam E., M.Murad B. (2004). Erkek üreme sisteminin anatomisi. İçinde: Kadıoğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (editörler). *Erkek Reprodüktif Hastalıkları ve Tedaivisi*. 1. Baskı. İstanbul, Türk Androloji Derneği Yayınları,.25-34.

Beydola T., Sharma R., Agarwal A. (2013). Sperm preparation and selection techniques. In: Rizk BRMB ed. *Medical and Surgical Management of Male Infertility*. New Delhi; Philadelphia, Jaypee Brothers Medical Publishers. 244-251.

Borgen P.I., Wong G.Y., Vlaims V., Hoffmann B., Kinne D.W., Osborne M.P., McKinnon W.M. (1992). Current management of male breast cancer. *AnnSyrg.* 215(5): 451-457.

Bustos Obregon E., Holstein A.F. (1976).Therete testis in man: Ultrastructural aspects. *Cell Tiss. Res*. 175(1):1-15.

Carlsen E., Petersen J.H., Andersson A.M., Skakke baek N.E. (2004)..Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. Fertil Steril 2004;82:358–66. https://doi.org/10.1016/j. fertnstert. 01.039.

Carrell D.T., Liu L. (2001). Altered protamine 2 expression is un common in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. J. Androl, 22: 604-10.

Chohan K.R., Griffin J.T., Lafromboise M., De Jonge C.J., Carrell D.T. (2006).Comparison of chromatin assays for DNA fragmentatione valuation in human sperm. J Androl.27:53-9.

Comar A.V. , Petersen G.C. Mauri A.L.., Mattila M. , Vagnini L.D., Renzi A. Petersen B., Nicoletti A., Dieamant F., Oliveira J.B.A., Baruffi R.L.R., Franco Jr J.G. (2017). Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. JBRA AssistReprod. 21;306;312.

Cooper T.G., Keck C., Oberdieck U., Nieschlag E. (1993).Effects of multiple ejaculation safter extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as acces sory gland secretions, fromhealthy normal and oligozoospermic men. Hum Reprod..8:1251- 1258.

Özenci Ç. Akkoyun A. Spermatogenez. (2006) İçinde: *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Ramazan D. (Çeviri editörü). Histologyand Cell Biology, Kierszenbaum AL., 1. Baskı, Ankara Palme Yayıncılık.531-550.

Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T., Melamed M.R. (1997).Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automatedcy to fluorometry. Exp Cell Res.90:411-28.;337:115–120.40.

De Jonge C., La Fromboise M., Bosmans E., Ombelet W., Cox A., Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. (2004) .Fertil Steril . 82:57–65. https://doi.org/10.1016/j. fertnstert..03.014.

Donatella P., Giulia P., Francesco P., Fabiana F., Marianna P., Andrea Lenzi , Francesco L. (2019).Cytological and molecular aspects of the ageing sperm. Hum Reprod. Feb 1;34(2):218-227.

Du Plessis S.S., McAllister D.A., Luu A., Savia J., Agarwal A., Lampiao F. (2010).Effects of H(2)O(2) exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitricoxide levels. *Andrologia.* 42(3):206–210.

DupeshS., Pandiyan N.,Pandiyan R., Kartheeswaran J. and Prakash B. (2020) Ejaculatory abstinence in semen analysis: does it make any sense?Ther Adv Reprod Health.15;14: 2633494120906882.

Dym M. (1972). Them ammalian rete testis- a morphological examination. *Anat. Rec*, 186(4):493-523.

Eliasson R. (1978). Semen Analysis, Environ mental Health PerspectivesVol. 24, pp. 81-85.

Esteves S.C.(2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospectivestudy, Int Braz J Urol. 28:484-5.

Eşrefoğlu, M. (2004). Genel ve Özel Histoloji. Pelikan Tıp Yayıncılık, 305–308, Ankara.

Evenson D.P., Derzynkiewicz Z., Melamed MR. (1980).Relation of mammalian sperm chromatin heterogenity to fertilty. Science. 210:1131-3.

Francavilla F., Barbonetti A., Necozione S., Santucci R., Cordeschi G., Macerola B., Francavilla S. (2007).Within-subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages. Int J Androl.30:174–181.

Fujii J., Iuchi Y., Matsuki S., Ishii T. (2003).Erkek üreme dokularında oksidatif strese karşı antioksidan ve redoks sistemlerinin işbirliği işlevi. Asya androloji dergisi.; 5 (3): 231–242.

Gartner L.P., Hiatt J.L. (1997).Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W. B. Saunders Company.493-98.

Gartner L.P. ve Hiatt JL. (2016) .Color Textbook of Histology (2. Baskı).

Gavriliouk D., Aitken R.J. (2015). Damageto sperm DNA mediated by reactive oxygen species: it simpact on human reproduction and the health trajectory of off spring. *Adv Exp Med Biol.* 868:23–47.

Gharagozloo P., Aitken R.J. (2011)The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy, Hum Reprod.26:1628-40.

Gosalvez J., Gonzalez-Martinez M., Lopez-Fernandez C., Fernandez J.L., Sanchez-Martin P. (2011). Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. Fertil Steril.96:1083- 1086.

Guzick D.S., Overstreet J.W., Factor-Litvak P., Brazil C.K., Nakajima S.T., Coutifaris C., et al. (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med.345: 1388-93. https://doi.Org/10.1056/NEJM oa003005.

Güneş S., Sevgili E., Aşçı R. (2013). Sperm DNA Hasarı Mekanizmaları ve Değerlendirme Yöntemleri. Turkiye Klinikleri J. Urology, 4(3): 107-14.

Haines G., Marples B., Daniel P., Morris I. (1998). DNA damage in humanand Mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. Adv Exp Med Biol. 444:79-91.

Halliwell B.& Gutteridge J.M.C.(1999).Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition. Oxford University Press. ISBN;1-29.

Hamilton, D.W., Olson G.E., Cooper T.G. (1977).Regional variation in the surface morphology of the epithelium of the rat ductuli efferentes, ductus epididymidis and vas deferens. *Anat. Rec*.188(1):13-28.

Henkel R.R. (2011) .Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility, Asian J. Androl. 13: 43-52.

Hoffer A.P. (1972).The fine structure of the ductuli efferentes in mouse and rat. *Anat Rec*. 172:331-332.

Høst E. , Lindenberg S., Ernst E., Christensen F. (1999).Spermmorphology and IVF: embryoquality in relationto sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria.Acta Obstet GynecolS cand.78;526;9.

Ikeda Y. (1996) .SF-1: a keyregulator of development and function in the mammalian reproductive system. Acta Paediatr Jpn .38(4): 412-419.

Irvine D.S., (2000). Twigg J.P., Gordon E.L., Fulton N., Milne P.A., Aitken R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relation ships with semen quality. *J Androl.* 21(1):33–44.

Jiang M., Xin J., Zou Q., Shen J.W. (2003).A research on the relationship between ejaculation and serum testosterone level in men. J Zhe jiang Univ Sci. 4:236–40.

Jørgensen N., Andersen A.G., Eustache F., Irvine D.S., Suominen J., Petersen J.H., Andersen A.N., Auger J., Cawood E.H., Horte A.et al. (2001).Regionaldifferences in semen quality in Europe. Hum Reprod. 16:1012–1019.

Jørgensen N., Joensen U.N, Jensen T.K, Jensen M.B., Almstrup K., Olesen I.A., Juul A., Andersson A.M., Carlsen E., Petersen J.H. et al. (2012).Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population based study of 4867 men. BMJ Open;2:e000990.

Junqueira C.L., Carneiro J., Kelley R.O. (2009).Basic histology, Text& Atlas, 11. edition. Editors: Luiz Carlos Junqueira, Jose Carneiro. Çeviri editörleri: Seyhun Solakoğlu, Yener Aytekin. Nobel Tıp Kitabevi.;418-33.

Junqueria, L.C., Carneiro, J. (2009). Temel Histoloji. Çev. Aytekin, Y. Solakoğlu, S. 10. Baskıdan Çeviri, Nobel Tıp Kitabevleri, 419, İstanbul.

Kadioglu A. (2011). WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi Beşinci baskı, ISBN: 978-975-00112-4-5.

Karagöz, E.(2002). Özel Histoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını, 196-199, Isparta.

Khosrowbeygi A., Zarghami N., Deldar Y. (2004). Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. Iranian J Reprod Med. 2(2):58-64.

Kierszenbaum A.L. (2002).Histology and Cell Biology. 1st. Edition. Editor: Kierszenbaum AL. Missouri, Mosby, Inc., Çeviri editörü: Demir R.;531-64.3.

Kierszenbaum A.L. (2001).Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. Mol Reprod Dev. 58: 357-8.

Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnstrom G.(1996).The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutat Res; 363:89-96.

Kobayashi H., Gil-Guzman E., Mahran A.M., et al.(2001). Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay, J Androl. 22:568–574.

Koskimies A.I., Kormano M., Lahti A. (1971).A difference in the immunoglobulin content of seminifer ous tubule fluidan drete testis fluid of therat. *Reprod. Fertil*.27(3):463-465.

Kruger T.F. et al. (1993). The self teaching programme for strict sperm morphology. Bellville, South Africa, MQ Medical.

Kucuk N. (2018) .Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm. Turk J Urol,; 44: 1-5.

Kupker W., Schwinger E., Hiort 0., Ludwing M., et al. (1999).Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up. Hum Reprod. 14: 124-37.

Laberge R.M.(2005).Boissonneault G. On the natüre and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. Biol Reprod.73: 289-96.

Le Lannou D., Colleu D., Boujard D., Le Couteux A., Lescoat D., Segalen J., (1986).Effect of duration of abstinence on maturity of human spermatozoa nucleus, Arch Androl.17:35–8.

Lee M.M., Donahoe P.K. (1993).Mullerian.inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. EndocrRev 14(2): 152-164.

Lehavi O., Botchan A., Paz G., Yogev L., Kleiman S.E., Yavetz H., Hauser R. (2014). Twenty-four hours abstinence and the quality of sperm parameters. Andrologia.46:692–697.

Lenzi A.Gandini L., Picardo M. (1998). A rationale for glutathione therapy. Hum Reprod. Jun;13(6):1419-22.

Levitas E., Lunenfeld E., Weiss N., Friger M., Har-Vardi I., Koifman A., Potashnik G. (2005).Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. Fertil Steril.83:1680–6.https://doi.org /10.1016/j.fertnstert.2004.12.045.

Liochev S.I., Fridovich I., (1997). Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as amediator of superoxide on production, Archives Biochem Biophysics.337:115–120.

Loft S., Kold-Jensen T., Hjollund N.H., Giwercman A., Gyllemborg J., Ernst E., Olsen J., Scheike T., Poulsen H.E., Bonde J.P. (2003).Oxidative DNA damage in human sperm influences time topregnancy, Hum Reprod.18: 1265–1272.

Magnus O., Tollefsrud A., Abyholm T., Purvis K. (1991). Effects of varying the abstinence period in the same individuals on sperm quality. ArchAndrol;26:199–203.

Makkar G, Ng E.H., Yeung W.S., Ho P.C. (2001).A comparative study of rawand prepared semen samples from two consecutive days. J. Reprod Med .46:565–572.

Makler A. (1978).A. New chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil Steril*. 30(3):313-318.

Makler A. (1980).The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril*. 33(3):337-338.

Marshburn P.B., Alanis M., Matthews M.L., Usadi R., Papadakis M.H., Kullstam S., Hurst B.S. (2009).A short period of ejaculatory abstinence before intrauterine insemination is associated with higher pregnancy rates. Fertil Steril 2010;93: 286–8.

Marshburn P.B. , Giddings A. , Causby S., Matthews M.L.,Usadi R.S., Steuerwald N., Hurst B.S. (2014).Influence of ejaculatory abstinence on seminal total antioxidant capacity and sperm membrane lipid peroxidation. Fertil Steril. 102;705;10.

Matilsky M., Battino S., Ben-Ami M., Geslevich Y., Eyali V., Shalev E. (1993).The effect of ejaculatory frequency on semen characteristics of normozoospermi can oligozoospermic men from an infertile population, Hum Reprod.8:71–3.

Mayorga-Torres J.M., Agarwal A., Roychoudhury S., Cadavid A., Cardona-Maya W.D. (2016).Can a Short Term of Repeated Ejaculations Affect Seminal Parameters? J Reprod Infertil.17:177–83.

Kuruş M. (2020). Histoloji. Hücre,Doku, Sistemler.*Teknik Moleküller- Laboratuvar-Klinik Yönleriyle yaklaşımlar* (1. baskı) (s.49- 91). Ankara: Akademisyen Kitabevi.

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.

Mortimer D., Templeton A.A., Lenton E.A., Coleman R.A. (1982).Influence of abstinence and ejaculation to analysis delay on semen analysis parameters of suspected infertile men. Arch Androl.8:251–256.

Muratori M., Marchiani S., Maggi M., Forti G., et al. (2006).Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. Front Biosci. 11: 1491-9.

Muriel L., Garrido N., Fernandez J.L., Remohi J., et al. (2006).Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level as measured by the sperm chromatin dispersion test in the out come of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 85: 371–8.

Nakamura H., Kimura T., Nakajima A., Shimoya K., Takemura M., Hashimoto K., et al. (2002).Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.105:155–160.

Oldereid N.B., Gordeladze J.O., Kirkhus B., Purvis K. (1984). Human sperm characteristics during frequent ejaculation. J. Reprod Fertil.;71:135–40.

Ovalle W.K., Nahirney P. (2009).Netter's Essential Histology. 1st Edition. Editor: Ovalle W.K. Çeviri editörleri: Muftuoglu S, Kaymaz F, Atilla P. Saunders Elsevier,;377-98.

Ovalle, W.K., Nahirney, P.C. (2009). Netter's Essential Histology. Çev. Müftüoğlu, S. Kaymaz, F. Atilla, P. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.

Padova G., Tita P., Briguglia G., Giuffrida D. (1988). Influence of abstinence length on ejaculate characteristics. Acta Eur Fertil.19:29–31.

Pellestor F., Girardet A., Andreo B. (1993).Effect of long.abstinence periods on human sperm quality. Int J. Fertil Menopausal Stud.39:278–82.

Pons I., Cercas R., Villas C., Braña C., Fernández-Shaw S. (2013).One abstinence day decreases sperm DNA fragmentation in 90% of selected patients. J. Assist Reprod Genet. 30(9):1211–8. https://doi: 10.1007/ s10815-013-0089-8.

Rahiminia T., Hosseini A., Anvari M., Ghasemi-Esmailabad S., et al. (2017).Modern human sperm freezing: Effect on DNA chromatin and acrosome integrity. Taiwan J Obstet Gynecol. 56: 472-76.

Richthoff J., Spano M., Giwercman Y.L., et al. (2002).The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structureassay (SCSA). Hum Reprod.17:3162-3169.

Robbins D.J., Coleman M.S. (1988).Initiator role of double stranded DNA in terminal transferase catalyzed polymerization reactions. Nucleic Acids Res.16: 2943–57.

Roosen-Runge E.C. (1978).Holstein A.F. The human rete testis. Cell Tissue Res 189(3): 409- 433.

Ross, M.H. Pawlina, W. (2006). Histology- A Textand Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 5.Baskı, Lippincott W&W, Philadelphia.

Ross. M. H. (2003).Histology a Textand Atlas with Cell and Molecular Biology, Fourth Edition, Lippincott Williams &Wilkins.

Saalu LC.2010.The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation, Pak J. BiolSci.13:413-22.

Sakkas D., Seli E., Bizzaro D., Tarozzi N., et al. (2003).Abnormal spermatozoa in the ejaculate:abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. Reprod Biomed Online.7: 428-32.

Saleh R.A., Agarwal A.(2002).Oxidative stres and male infertility: from research bench to clinical practice, J. Androl. 23:737-52.

Sanchez-Martin P., Sanchez-Martin F., Gonzalez-Martinez M., Gosalvez J. (2013). Increased pregnancy after reduced male abstinence. Syst Biol Reprod Med.59:256–60 https://doi.org/10.3109 /19396368.2013.790919.

Scarselli F., Cursio E. ,Muzzì S., Casciani V., Ruberti.A.,GattiS. , Greco P.,Varricchio M.T. , Minasi M.G. , GrecoE. (2019). How 1 h of abstinence improves sperm quality and increase sembryo euploidy rate after PGT-A: a study on 106 sibling biopsied blastocysts. J Assist Reprod Genet.36:1591-1597.

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). NewYork, Raeven.753-836.

Shamsi M.B., Imam S.N., Dada R. (2011).Sperm DNA integrityassays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. J. Assist.Reprod.Genet. 28: 1073–85.

Shang X.J, Li K., Ye Z.Q., Chen Y.G., Yu X., Huang Y.F.(2004).Analysis of lipid peroxidative levels in seminal plasma of infertile men by high performance liquid chromatography, Arch Androl. 50:411–416.

Sharma R.K., Agarwal A. (1996).Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology. 48(6):835–850. https://doi: 10.1016/S0090-4295(96)00313-5.

Sharma R.K., Pasqualotto F.F., Nelson D.R., Thomas Jr. A.J., Agarwal A, (1999).There active oxygen species-total antioxidant capacityscore is a new measure of oxidative stress to predict male infertility, Hum Reprod.14:2801–2807.

Shi X. , Shan Chan C.P., Waters T. , Chi L., Leung Chan D.Y., Li T.C. (2018).Life style and demographic factors associated with human semen qualityand sperm function. Syst Biol Reprod Med. 64;358;367.

Sikka C.S. (2004). Role of oxidative stres andantioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J.Androl.25:1.

Sinha Hikim A.P., Swerdloff R.S. (1999).Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. RevReprod. 4: 38-47.

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

Sunanda P., Panda B., Dash C., Padhy R.N., Routray P. (2014).Effect of age and abstinence on semen quality: A retrospective study in a teaching hospital. Asian Pac J. Reprod.3:134–41.

Tavilani H., Doosti M., Saeidi H.(2005).Malondi aldehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermi can its relationship with semen parameters, Clin Chim Acta. 356:199–203.

Tejada R.I., Mitchell J.C., Norman A., Marik J.J., Friedman S.(1984).A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril.42:87-91.

Tosun.M.(1998).İnsan Gonadlarının İntrauterin Gelişiminin Histolojik Değerlendirilmesi. (Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji Tıp Anabilim Dalı).

Wang C., Swerdloff R.S. (2014).Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newertests. Fertil Steril. 102:1502-1507.

WHO. (1999). World Health Organization Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus instruction. 4th Ed. New York: Cambridge University Press.

WHO.(2010). Laboratory Manual Forthe Examination and Processing of Human Semen 5 th ed.ISBN: 978 92 4 154778 9.

World Health Organization. (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Yiğit A.(2015).IUI olgularında sperm fonksiyon testlerinin gebeliği öngörmedeki değeri. (Yüksek Lisans Tezi, Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Yüksel Ş.(2019). İnfertilite Çiftlerde Sperm Genomik Stablitesinin Belirlenmesinde DNA Fragmentasyonu Analiz Yöntemleri. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi.7 (1): 67-80.

7.SİMGELER VE KISALTMALAR

SRY: Y Kromozomu Üzerinde Cinsiyet Belirleyen Bölge

TDF: Testis Belirleyici Faktör

FSH: FollikülStimüleEdici Hormon

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

AMH : Anti-Müllerian Hormon

LH : Luteinizan Hormon

PR: ProgresifMotilite

NP: NonProgresifMotilite

IM : İmmotilite

Topo II : Topoizomeraz II

ROS : Reaktif Oksijen Radikalleri

TDT: Terminal DeoksinükleotidTransferaz

NT: İn SituNickTranslasyon Testi

TUNEL: TerminalUridinNick- EndLabeling Yöntemi

SCD: Sperm Chromatin Dispersion

COMET: Tek Hücre Jel Elektroforezi

MDA: Malondialdehid

8-OHdG: 8-oxo-7,8- dihidro 2’ deoksiguanozin

TAC: Total Antioksidan Kapasite (ROS- TAC) skoru

NBT: NitroBlue Tetrazolium

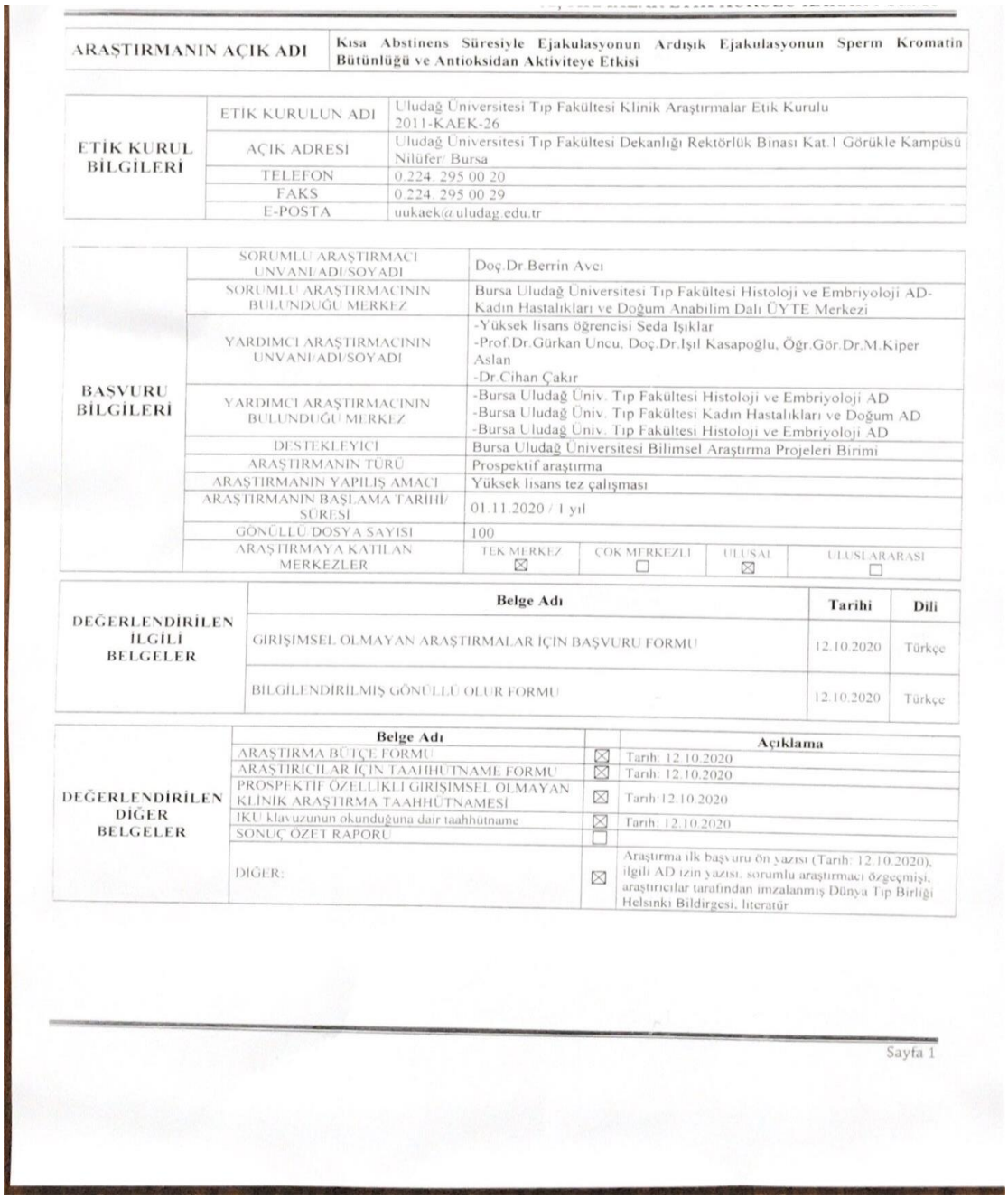
DFI: DNA Fragmantasyon İndeksi

BMI: Vücut Kitle İndeksi

DAB: Di-amino-benzidine

8.EKLER

EK-1



ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kısa Abstinens Süresiyle Ejakulasyonun Ardışık Ejakulasyonun Sperm Kromatin Bütünlüğü ve Antioksidan Aktiviteye 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 ve Embriyoloji AD-Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ÜYTE Merkezi			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Yüksek lisans öğrencisi Seda Işıklar -Prof.Dr.Gürkan Uncu, Doç.Dr.Işıl Kasapoğlu, Öğr.Gör.Dr.M.Kiper Aslan -Dr.Cihan Çakır			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	-Bursa Uludağ Üniv. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD -Bursa Uludağ Üniv. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD -Bursa Uludağ Üniv. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD			
	DESTEKLEYİCİ	Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif araştırma			
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez çalışması			
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	01.11.2020 / 1 yıl			
	GÖNÜLLÜ DOSYA SAYISI	100			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Dili
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	12.10.2020	Türkçe
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	12.10.2020	Türkçe

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	☒	Tarih: 12.10.2020
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	☒	Tarih: 12.10.2020
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	☒	Tarih:12.10.2020
	İKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	☒	Tarih: 12.10.2020
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐	
	DİĞER:	☒	Araştırma ilk başvuru ön yazısı (Tarih: 12.10.2020), ilgili AD izin yazısı, sorumlu araştırmacı özgeçmişi, araştırıcılar tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür

Sayfa 1

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kısa Abstinens Süresiyle Ejakulasyonun Ardışık Ejakulasyonun Sperm Kromatin Bütünlüğü ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi

Karar No: 2020-18/18 **Tarih: 14 Ekim 2020**

KARAR BİLGİLERİ

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak değerlendirildi.

1-Araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde yapılmasının uygun olduğuna, ilgili kurumlardan alınacak izin yazılarının kurulumuza iletilmesine,

2-Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kaşesi bulunan "Onam" formlarının kullanılması ve bu formun çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına.

3-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine,

4-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırıcılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

ÜYELER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	U.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.M.Sertaç YILMAZ Üye	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji AD.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	U.Ü.T.F. Halk Sağlığı AD.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doktor Öğretim Üyesi Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk	U.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Başka bir toplantıda
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	U.Ü.T.F. Biyofizik AD.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Derste
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	U.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Selen MİGAL Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* Toplantıda Bulunma

EK-2

LÜTFEN BU DÖKÜMANI DİKKATLİCE OKUMAK İÇİN ZAMAN AYIRINIZ

Sayın .....

Sizi Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi ***"Kısa abstinens süresiyle ardışık ejakulasyonun sperm kromatin bütünlüğü ve antioksidan aktiviteye 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: Cinsel perhiz süresindeki farklılıkların sayısal, yapısal ve fonksiyonel olarak sperm kaltesine etkisini değerlendirmek amaçlandı.

İzlenecek Olan Yöntem ve Yapılacak İşlemler:
Ejakülat örneklerinin alınma zamanı
Eşine yumurta toplama işlemi yapılacak hastalardan;
1.grubu oluşturmak üzere; eşinize yumurta toplama işlemi yapılacağı günden bir gün önce sizden (2-5 günlük cinsel perhiz süresine sahipken) ilk ejakülat örneği mastürbasyon yoluyla alınacaktır. Yumurta toplama gününde (24 saatlik cinsel perhiz süresine sahipken) ikinci ejakülat örneği alınacaktır.
2.grubu oluşturmak üzere; eşinize yumurta toplama işlemi yapılacağı gün sizden (2-5 günlük cinsel perhiz süresine sahipken) ilk ejakülat örneği mastürbasyon yoluyla alınacaktır. İlk örneğin verilidiği saatten bir saat sonra ikinci ejakülat örneği alınacaktır.

Spermiyogram analizi yapılacak hastalardan,
1.grubu oluşturmak üzere; spermiyogram analizi için merkezimize geldiğiniz gün yani tetkik günü sizden (2-5 günlük cinsel perhiz süresine sahipken) ilk ejakülat örneği mastürbasyon yoluyla alınacaktır. Spermiyogram analizinizin yapıldığı günden bir gün sonra (24 saatlik cinsel perhiz süresine sahipken) ikinci ejakülat örneği alınacaktır.
2.grubu oluşturmak üzere; spermiyogram analizi için merkezimize geldiğiniz gün yani tetkik günü sizden (2-5 günlük cinsel perhiz süresine sahipken) ilk ejakülat örneği mastürbasyon yoluyla alınacaktır.
İlk örneğin verildiği saatten bir saat sonra ikinci ejakülat örneği alınacaktır. Semen örneklerinde sperm sayısına, hareket kabiliyetine, hücrelerin şekilsel olarak normal ve canlı olup olmadığına bakılacaktır. İleri tetkik olarak sperm kromozom yapısı değerlendirilecektir.

Araştırmanın Yapılacağı Yer(ler):
BUÜTF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi
BUÜTF Histoloji ve Embriyoloji AD

Araştırmaya Katılan Araştırıcılar:
Yüksek Lisans Öğrencisi Seda IŞIKLAR
Doç.Dr.Berrin AVCI
Prof.Dr.Gürkan UNCU
Doç.Dr.Işıl KASAPOĞLU
Uzm.Dr.Kiper ASLAN
UzmDr.Cihan ÇAKIR

Araştırmanın Süresi: 1 yıl

Katılması Beklenen Gönüllü Sayısı: 100

Size Getirebileceği Olası Faydalar:
Farklı cinsel perhiz sürelerinin sperm kalitesine etkisi değerlendirilerek, üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında yumurtayı dölleyebilme yeteneği en yüksek olan spermlerin elde edileceği zamanın belirlenmesi sağlanacaktır.
Başarılı bir gebelik ve sonuçta sağlıklı bir canlı doğumun gerçekleşmesi için daha kaliteli spermin elde edilmesi mümkün olacaktır.

Size Getirebileceği Ek Risk ve Rahatsızlıklar:
Spermiyogram analizi veya merkezimizde tüpbebek uygulaması için vereceğiniz ejakulat örneğini iki kez vermeniz dışında size ek risk ve rahatsızlık oluşturmamaktadır.

Katılma ve Çıkma:

Bu araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz. Ayrıca sorumlu araştırıcı 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:
Çalışmaya katılan hastalardan ek ücret talep edilmeyecektir.

İletişim Kurulacak Kişi(ler):
Doç.Dr.Berrin AVCI
Yüksek Lisans Öğrencisi Seda IŞIKLAR

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 ayrılabileceğimi 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 bigilerin (*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 araştırıcı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırıcı 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 araştırıcı tarafından saklanacaktır

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 Doç. 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. Semiha ERSOY'a 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. Özhan EYİGÖR ve Prof. Dr. Zehra MİNBAY'a teşekkür ederim.

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

Tez çalışmam boyunca zaman ayıran her zaman yanımda olan tezimin deney aşamalarında yardımlarını esirgemeyen sabrı ve tecrüleriyle destek olan Uzm. Dr. Cihan ÇAKIR, Ögr. Gör. Dr. Ayşen ÇAKIR, Araş. Gör. Göktan KUŞPINAR'a teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince bana yardımcı olan arkadaşlarım Araş. Gör. Ceren OY, Araş. Gör. Nursel HASANOĞLU AKBULUT, Zülal HALK, Gözde KORKUSUZ'a ve Bursa Uludağ Üniverisitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında destelerini esirgemeyen 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 Yurtgül IŞIKLAR, babam Süleyman IŞIKLAR ve abim Öğr. Gör. Sefa IŞIKLAR'a sonsuz teşekkür ederim.

10.ÖZGEÇMİŞ

Seda IŞIKLAR, 1994 yılında Tokat'ta doğdu. İlk ve orta ögrenimini Tokat'ta tamamladı. 2008 yılında başladığı Mudanya Ahmet Rüştü Anadolu Lisesin'den 2012 yılında mezun oldu. 2012-2016 yıllları arasında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik bölümünü dereceyle bitirdi. 2018-2021 yıllları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bilimsel hazırlık eğitimi ile birlikte yüksek lisans öğrenimini tamamladı.