

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
(TIP) ANABİLİM DALI

**FARKLI SEMEN ÖRNEKLERİNDEKİ HYALURONİK ASİDİN
SWİM-UP TEKNİĞİNDE KULLANIMI VE SPERM
PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

ASLIHAN ŞAYLAN

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. SELÇUK DUMAN

KONYA- 2015

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
(TIP) ANABİLİM DALI

**FARKLI SEMEN ÖRNEKLERİNDEKİ HYALURONİK ASİDİN
SWİM-UP TEKNİĞİNDE KULLANIMI VE SPERM
PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

ASLIHAN ŞAYLAN

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. SELÇUK DUMAN

KONYA- 2015

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi ASLIHAN ŞAYLAN'ın "Farklı Semen Örneklerindeki Hyaluronik Asidin Swim-Up Tekniğinde Kullanımı Ve Sperm Parametrelerine Etkisi" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/ 15.01.2015

Tez Danışmanı

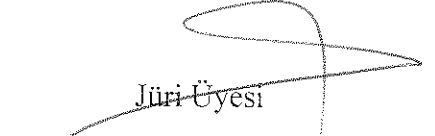
Prof. Dr. Selçuk Duman

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.


Jüri Üyesi

Prof. Dr. Aydan CANBİLEN

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.


Jüri Üyesi

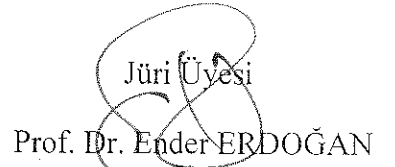
Prof. Dr. Tahsin Murad AKTAN

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.


Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sabiha Serpil KALKAN

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.


Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11.02.2015. tarih ve ...05...01... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “Usage Of Hyaluronic Acid On Swim Up For Different Seminal Plasma Samples and It’s Effect On Sperm Parameters ” by “ASLIHAN ŞAYLAN” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “**Histology-Embryology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya, Turkey/ 15.01.2015

Principal Advisors

Professor Selçuk Duman

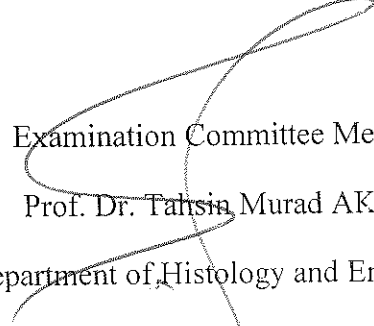
Department of Histology and Embryology



Examination Committee Member

Prof. Dr. Aydan CANBİLEN

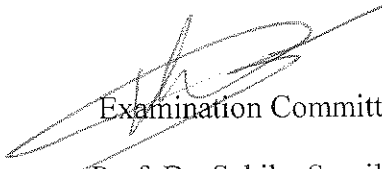
Department of Histology and Embryology



Examination Committee Member

Prof. Dr. Tahsin Murad AKTAN

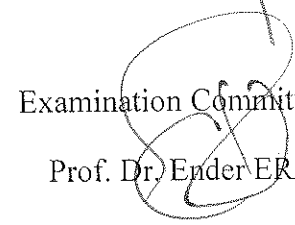
Department of Histology and Embryology



Examination Committee Member

Prof. Dr. Sabiha Serpil KALKAN

Department of Histology and Embryology



Examination Committee Member

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Department of Histology and Embryology

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



Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

BEYANAT

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

Tarih: 14.01.2015

Öğrencinin Adı Soyadı: Aslıhan şAYLAN

İmzası:

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan Cüce'ye, Öğretim Üyesi hocalarım Prof. Dr. Serpil Kalkan, Prof. Dr. Aydan Canbilen ve Prof. Dr. T. Murad Aktan'a, Laboratuvar aşamasındaki yardımları için Meram Tıp Fakültesi Tüpbebek Ünitesi Laboratuvar Sorumlusu Prof. Dr. Selçuk Duman'a, Biyolog Hüseyin Akbulut'a, ünite çalışanlarına ve eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Approval</i>	<i>iii</i>
<i>Tez Beyan Sayfası</i>	<i>iv</i>
<i>Önsöz</i>	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	<i>viii</i>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Erkek Üreme Sistemi</i>	2
2.1.1. <i>Spermatogenez</i>	2
2.1.1.1. <i>Spermatositogenez</i>	3
2.1.1.2. <i>Mayoz</i>	4
2.1.1.3. <i>Spermiyogenez</i>	5
2.1.2. <i>Spermatogenezin Hormonal Regülasyonu</i>	7
2.1.3. <i>Sperm Hücresinin Yapısı</i>	7
2.1.4. <i>Sperm Hücresinin Kapasitasyonu</i>	9
2.1.5. <i>Akrozom Reaksiyonu</i>	10
2.2. <i>Semen Analizi</i>	10
2.2.1. <i>Semenin Genel Özellikleri</i>	11
2.2.1.1. <i>Makroskobik İnceleme</i>	12
2.2.1.2. <i>Mikroskobik İnceleme</i>	13
2.3. <i>Erkek İnfertilitesine Bakış</i>	16
2.4. <i>Sperm Hazırlama Teknikleri</i>	18
2.4.1. <i>Sperm Yıkama</i>	18
2.4.2. <i>Sperm Yüzdürme (Swim-up)</i>	19
2.4.3. <i>Sperm Yüzdürme (Swim-Down)</i>	20
2.4.4. <i>Dansite Gradient Santrifügasyon</i>	20
2.5. <i>Apopitozis</i>	21
2.5.1. <i>Apopitozisi Düzenleyen Dış ve İç Uyarımlar</i>	22
2.5.2. <i>Apopitozisin Gen Regülasyonu</i>	22

2.5.3. Apoptozisin İndüklenmesi.....	23
2.5.4. Sperm DNA Hasarının Önemi ve Apoptozis.....	23
2.5.5. Sperm DNA Bütünlük Testleri.....	26
2.5.5.1. Morfolojik Yöntemler.....	28
2.5.5.2. İmmünohistokimyasal Yöntemler.....	30
2.5.5.3. İmmünolojik Yöntemler.....	31
2.5.5.4. Biyokimyasal Yöntemler.....	31
2.6. Fertilizasyonda Rol Oynayan Unsurlar.....	32
2.7. Hyaluronik Asit.....	35
2.7.1. Tarihçe.....	35
2.7.2. Hyaluronik Asit'in Özellikleri.....	36
2.7.3. Hyaluronik Asit'in İşlevleri.....	36
2.7.4. Hyaluronik Asit'in İnsan Vücudundaki Dağılımı.....	38
2.7.5. Hyaluronik Asit'in Fertilizasyon ile İlişkisi.....	39
2.7.6. Hyaluronik Asit'in Biyosentez ve Metabolizması.....	41
2.7.7. Hyaluronik Asit'in Yıkımı.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Semen Örneklerinin Hazırlanışı.....	43
3.2. Rutin ve Hyaluronik Asit Katkılı Swim-up Metodu ile Sperm Eldesi.....	44
3.3. Sperm Apoptozisinin Değerlendirilmesi (Annexin V Boyama).....	44
3.4. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
7. ÖZET.....	63
8. SUMMARY.....	64
9. KAYNAKLAR.....	65
10. EKLER.....	77
11. ÖZGEÇMİŞ.....	79

SİMGELER ve KISALTMALAR

CK: Sitokeratin

ECM: Ekstrasellüler Matrix

FSH: Folikül Stimulan Hormon

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

HA: Hyaluronik Asit

HB: Hyaluronik Asite Bağlanma

HE: Hematoksilen Eosin

HSA: Human Serum Albumin

HTF: Human Tubal Fluid

ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection

IMSI: Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection

IUI: Intra Uterin Insemination

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

LH: Luteinizan Hormon

PS: Fosfatidil Serin

SKK: Sperm Kreatinin Kinaz

TdT: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri

ZP: Zona Pellusida

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yıllardır uygulanan İntrauterin İnseminasyon (IUI) ve İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) yöntemleri infertilite tedavisinde umut kaynağı olmuştur. İnfertilite üreme çağındaki erkeklerin yaklaşık olarak %8'ini etkileyen bir problemdir. Erkek infertilitesine sebep olan parametreler arasında sperm hücrelerinin sayı ve hareketliliklerinin yanında morfolojik bozuklukları da ayrı bir önem taşımaktadır ve erkeklerde infertiliteye yol açan önemli sebeplerden biridir. Erkeklerde, fertilizasyon potansiyellerinin göstergelerinden biri semen analizidir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO, 2010) göre yapılan standart semen analizleri spermlerin sayı, hareket ve morfoloji tetkiklerini kapsar. Ancak bir semen analizi sadece geniş teşhis kategorileri sağlamaya yardımcı olur. Geleneksel semen analizinin yanında bu analizlerde yer almayan sperm DNA bütünlük testleri ve antisperm antikollarının değerlendirilmesi gibi spermatik anomalileri ve işlevsel bozuklukları tanımlayan ek testler de geliştirilmiştir. Yardımcı Üreme Teknikleri'nden IUI ve ICSI'de kullanılan spermler, embriyoda hasarlı DNA'nın oluşmasına yol açabilir. Bu nedenle, hasar görmemiş sperm hücresi için bir markır bulmak önemlidir ve bu durum ejakulat sperminin hücre ölüm mekanizmalarını anlamayı gerektirir.

Oositi çevreleyen kumulus hücreleri arasındaki ekstrasellüler matriksin temel maddesinde bulunan hyaluronik asit (HA) fertilizasyonda matür spermin oosite ulaşması sürecinde bir labirent sistemi oluşturarak kumulus hücrelerini birarada tutar. Maturasyon defekti olan sperm hücrelerinde HA bağlanma bölgeleri oluşmaz ve spermler kumulus hücrelerini geçip zona pellusidaya bağlanamadığından hem spontan koit hem de in-vitro tedavilerde fertilizasyon başarısızlığına neden olurlar. Hyaluronik asitin doğal fertilizasyon sürecinde fertilizasyon kapasitesi yüksek sperm seçiciliğinde rol oynadığı yönünde ilişkilendirilen mekanizmalar, yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Bu gerekçelere dayanarak yaptığımız çalışmada semen parametrelerinden konsantrasyon, hareketlilik ve morfolojiye göre apoptotik ve nekrotik sperm hücrelerini belirlemek ve olası değişimlerini istatistiksel olarak değerlendirmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi; skrotumla sarılı bir çift testis, iç ve dış genital duktuslar, yardımcı bezler ve kopulasyon organı penisten oluşur. İç genital duktus sistemini oluşturan epididimis, vaz deferens, ejakülatuar duktus ve erkek üretrası dışarıya sperm hücrelerinin taşınmasından sorumludur. Yardımcı bezler olan bir çift seminal vezikül, tek prostat bezi ve iki bulboüretal bezlerin (cowper bezleri) salgıları sperm hücrelerini besler ve semeni oluşturur. Ayrıca bu salgının kadın üreme sistemi içine taşınmasında rol oynar (Demir 2006).

Testisler, skrotum içinde yerleşmiş yaklaşık 4-4,5 cm boyutlarında, 20-30 gr ağırlığında üreme organlarıdır. Testisler, tunika albuginea adı verilen bağ dokusu ile çevrilidirler. Spermatogenezin gerçekleştiği bu organ septumlarla bölümlere ayrılmıştır. Bu bölümlerde seminifer tübüller bulunmaktadır. Seminifer tübüller serbest olan iki ucuyla rete testislere bağlanırlar. Rete testisler, leydig hücrelerinin bulunduğu intersitisiyel doku ile çevrelenmiştir. Rete testisler bir araya gelerek duktuli eferentleri oluştururlar. Duktuli eferentler de epididimise açılırlar. Seminifer tübülleri saran adventisya tabakasının altında bulunan bazal membranda sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler bulunur. Sertoli hücreleri spermatogenik hücrelerin korunması ve beslenmesini sağlarken aynı zamanda kan-testis bariyerini de meydana getirirler. Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerde meydana gelir ve spermatogonyumdan başlayarak olgun sperm hücresi oluşuncaya kadar gerçekleşen olaylar dizisinden (çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşım evreleri) oluşur. Spermatogenezin tamamlanması insanda ortalama 70-74 gün sürer (Speroff ve Fritz 2011).

2.1.1. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonial hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır (Levy ve Seifer-Aknin 2001; Liu ve ark 2004). Spermatogenez, sürecinde germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozomlu diploid halden 23 kromozomlu haploid hale gelirler ve yine 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresi ile birleşerek 46 kromozomlu yeni bir

bireyin oluşmasına olanak sağlarlar. Her aşamada hücreler spermatogonia, spermatozoid, spermatid gibi farklı isimler alırlar (Arslan 2008). Spermatogenez süreci üç bölüme ayrılır. Her evrenin kendine has özellikleri ve sorumlulukları vardır (Junqueira ve ark 1998).

1) Spermatositogenez

2) Mayoz

3) Spermioyogenez

2.1.1.1. Spermatositogenez

Primordial germ hücreleri embriyonik hayatta yolk kesesinde allantois yakınında bulunan endodermal hücrelerden köken alırlar. İntrauterin hayatın 5. haftasından itibaren genital kabartıya doğru göç ederler. Farklılaşmamış gonadlar Y kromozom varlığında testislere dönüşür. Seminifer kordların oluşumundan sonra bu hücreler gonadosit adını alırlar ve seminifer tübülün bazal kısmına yerleşerek spermatogonyum adını alırlar. Puberteye yakın spermatogonyumlarda mitotik aktivite artar ve her bir testiste yaklaşık 600 milyon spermatogonia bulunur (Sharma ve ark 2001).

Seminifer tübül bazal membranı üzerinde oturan spermatogonyumlar, küçük diploid germ hücreleridir, puberteye kadar bölünmezler. Spermatositogenez pubertede başlar, spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalarak, yerlerine yeni gelecek spermatogonyumları ve sonunda primer spermatozoidleri oluşturur. Spermatogonyumlar ışık mikroskopik incelemede çekirdeklerinin belirgin koyu görünümüyle ayırt edilir. İnsan spermatogonyumları rutin histolojik preparatlardaki görünümüleri temel alınarak üç tipe ayrılmıştır:

1) Koyu Tip A Spermatogonyumlar: Seminifer epitelin kök ya da rezerv hücreleri olarak değerlendirilirler. Düzensiz aralıklarla bölünerek, hem yeni koyu Tip A spermatogonyumları, hem de açık Tip A hücreleri meydana getirirler.

2) Açık Tip A Spermatogonyumlar: Koyu Tip A hücrelerle aynı özelliklere sahiptirler. Testosteronun etkisiyle mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve yeni açık Tip A hücreleri ve Tip B hücreleri meydana getirirler.

3) Tip B Spermatogonyumlar: Açık Tip A spermatogonyumlara benzerler, mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler. Bir koyu Tip A spermatogonyumun bölünmesi ile oluşan yeni hücreler ince sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı olarak kalırlar, çekirdekleri tam olarak bölünse de, sitoplazmaları tam anlamıyla ayrılmaz. Bu yüzden meydana gelen hücreler, inci dizileri gibi birbirine bağlıdırlar. Bu sitoplazmik bağlantılar, spermatid olgunlaşmasının son dönemlerine kadar devam eder ve bir orjinal koyu Tip A hücreden her bir kopyalamanın senkronize gelişimi ve hücrelerin birbirleriyle iletişimi için yaşamsal önem taşır. Ayrıca bu köprülerin hücreler arasında RNA ve protein değişimini kolaylaştırdığı da düşünülmektedir (Aras 2009).

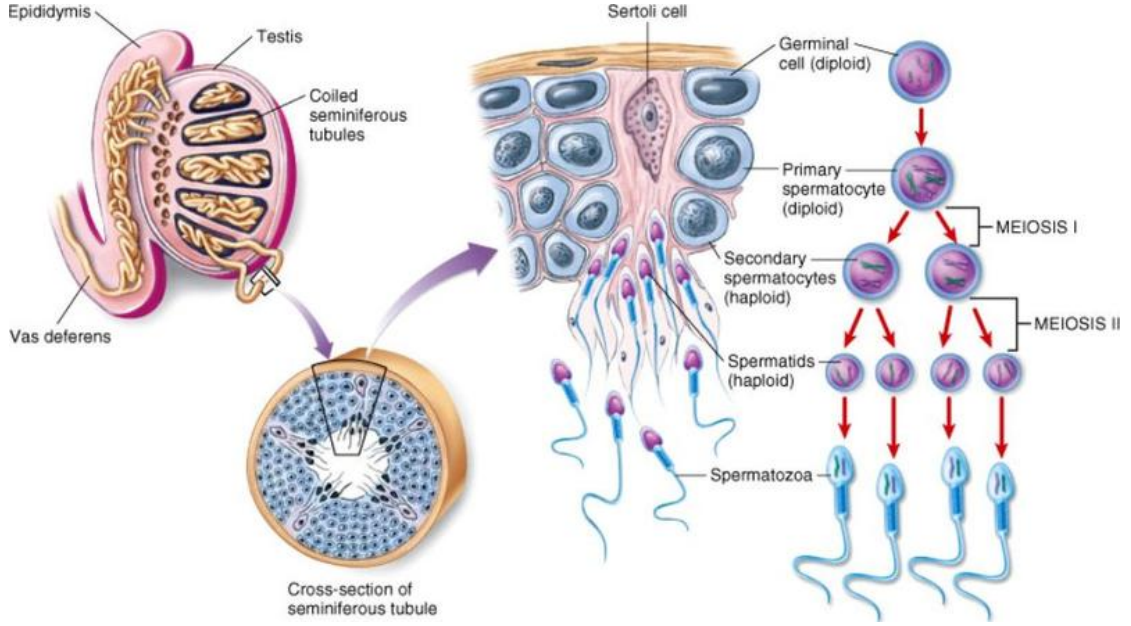
2.1.1.2. Mayoz

Tip-B spermatogonia mayotik profazın başladığını gösteren iki adet preleptoten spermatosite mitoz bölünmeyle farklanır. Bu hücreler bazal membrana yakın dururlar, fakat leptoten ve zigoten spermatositler kan-testis bariyerinden hareket ederek lümene doğru taşınırlar. Preleptoten, leptoten, zigoten spermatositler seminifer tübülün özgün evrelerinde yer alırlar ve rutin mikroskopla tanımlanabilirler. Mayoz bölünme, spermatogenezin uzun bir dönemidir. Seminifer tübüldeki germ hücre bölünmeleri 12 evrede meydana gelen üç bölümde incelenir:

1) Mayoz I, 4n hücrelerin bölünmesi,

2) Birincil spermatositlerden daha büyük olan ikincil spermatositlerin düzenlenmesi (2n),

3) Mayoz II, 2n ikincil spermatositlerin haploid (n) yuvarlak spermatidlere bölünmesi (Junqueira ve ark 1998).



Resim 2.1. Spermatogenez (contraceptionformen.wordpress.com 18.11.2014).

2.1.1.3. Spermijogenez

Spermatidler 8µm çapında, küçük yuvarlak haploid hücrelerdir. Tek bir açık Tip A spermatogonyumdan meydana gelen bütün spermatidler, hücreler arası köprülerle birbirlerine bağlıdır. Bir spermatid oluşuktan sonra, bir daha bölünme olmaz. Haploid spermatidler, olgun spermijumu meydana getirecek olan ve spermijogenez olarak adlandırılan bir farklılaşma sürecine girerler. İnsanlarda bu aşama yaklaşık 16-22 gün sürer. Spermatidlerin farklılaşması 4 evreyi içermektedir;

a) Golgi Evresi:

Spermatidin granüllü endoplazmik retikulumunda oluşan hidrolitik enzimler, Golgi komplekslerinde modifiye olur ve küçük pre-akrozomal granüller olarak paketlenir. Glikoproteinden zengin olan bu granüller birbirleriyle birleşerek akrozomal vezikülü oluştururlar. Çekirdek membranı ile ilişkili olan bu vezikülün yerleşimi, gelişen sperm hücresinin ön kutbunu belirler. Aynı zamanda sentrioller jukstanükleer bölgeden akrozomal vezikülün zıt kutbuna, yani spermatidin posterior kutbuna göç ederler. Sentriyollerin biri, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan 9 periferik ve 2 sentral mikrotübül oluşumunu başlatırken, diğeri nükleus ile kuyruğu birleştiren bağlantı parçasını meydana getirir.

b) Cap (Kep-Şapka) Evresi:

Bu aşamada boyutu büyüyen akrozomal vezikül, çekirdeğin ön yarısı üzerine doğru yayılarak akrozomal kep adını alır. Akrozomal kep, altındaki nükleer membranla kısmen ilişkilidir, bu bölgedeki membran normalde varolan nükleer porlarını kaybeder ve kalınlaşır.

c) Akrozomal Evre:

Bu aşamada spermatid morfolojisinde birçok değişiklik meydana gelir. Çekirdek ve üzerindeki akrozom, üstteki plazma membranının hemen altına doğru hareket ederken, sitoplazma posterior tarafa doğru yer değiştirir. Sitoplazmadaki hücre iskeleti elemanı olan mikrotübüller, manşet adı verilen silindirik bir yapı oluştururlar. Gelişen kuyruğu saran plazma membranı arkaya doğru hareket ettikçe manşet kaybolur. Mitokondriler sitoplazmanın arka kısmına doğru hareket ederek heliks şeklinde fibrilleri sarar. Sperm hücresinin hareketi için gereken enerjinin sağlanmasında mitokondriler anahtar rol oynar. Bu bölge sperm kuyruğunun orta parçasıdır. Mitokondrial kılıfın oluşumu sırasında, nükleusla birlikte spermin bağlantı parçasını meydana getirecek olan sentriolden, aksonemin etrafında yerleşen dokuz adet dış koyu kılıf meydana gelir. Bu bölge sperm kuyruğunun orta parçasıdır. Orta parçanın distalinde, iki longitudinal piramit ve çok sayıda bağlantı biriminden oluşan fibröz bir kılıf, esas parçanın 9 longitudinal fibrilini sarar ve hemen hemen kuyruğun sonuna kadar uzanarak esas parçayı oluşturur. Fibröz kılıfın distalinde kalan kısa kuyruk parçası ise son parça adını alır.

d) Olgunlaşma Evresi:

Spermatid şekillenmesinin bu son aşaması, fazla sitoplazmayı azaltmaya yönelik bir işlemdir. Sertoli hücreleri, artık cisim olarak adlandırılan bu fazla sitoplazmayı fagosite eder. Yeni oluşan bu sperm hücresi hareketsizdir ve henüz fertilize etme yeteneğine sahip değildir. Spermiyasyondan sonra sperm hücresi 2-4 haftalık bir evreden geçerek epididimise ulaşır. Bu süre içinde sperm daha ileri olgunlaşmaya uğrar, hareketlilik kazanır ve sitoplazmasının tamamını kaybeder. Sperm hücresi epididimise peritübüler myoid hücreler ve testis kapsülünün kasılması ile sağlanan seminal sıvı akıntısı tarafından taşınır. Epididim özgüleşmiş epitel

hücreleri ile kaplıdır ve kasılabilen kas hücreleri ile sarmalanmıştır. Androjen bağımlı olarak gelişen ve fonksiyon gösteren epididimis boyunca sıvı osmolaritesi, elektrolitler ve birçok küçük molekülün konsantrasyonlarında değişiklik olur. Epididimal ve seminifer tübül sıvıları tarafından sağlanan proteinler spermin zarlarına bağlanır ve hareketlilik ve dölleme becerilerini artırır. Epididimisin ilk bölümünde spermatozoanın hareket kabiliyeti yoktur. Ancak epididimise geldikten 18-24 saat sonra hareket yeteneğini kazanmaktadır (Junqueira ve Carneiro 1998; Aras 2009).

2.1.2. Spermatojenin Hormonal Regülasyonu

Spermatojenin gerçekleşmesinde FSH (Folikül Stimulan Hormon), LH (Luteinizan Hormon), testosteron ve androjen taşıyıcı proteinlerin önemli rolü vardır. Spermatojenin başlatılması ve devamlılığı için en önemli hormon testosterondur. Pubertede, hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan LH, testisin intersitisyel dokusunda bulunan leydig hücrelerini uyararak testosteronun salgılanmasına neden olur. Seminifer tübüllere gelen testosteronun androjen taşıyıcı protein ile oluşturduğu kompleks, spermatogoniumları etkileyerek çoğalmayı başlatır. Testisteki yüksek testosteron seviyesi sperm üretiminin devamlılığını sağlamaktadır. Hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan FSH, seminifer tübüllerde sertoli hücrelerinin çoğalmasını ve bu hücrelerde androjen taşıyıcı proteinlerin sentezlenmesini sağlar. LH ve testosteron ise sürekliliği için gereklidir. Spermatojenin başlamasından 72 gün sonra spermler kaudal epididimise ulaşırlar. İmmotil olan ve fertilizasyon kapasitesi düşük spermler epididimis içerisinde gelişimini tamamlayıp hareket kabiliyeti kazanırlar. Bu sırada optimal fonksiyonlar için yeterli düzeyde testosteronun yanısıra düşük ısıya ihtiyaç vardır (Speroff ve Fritz 2011).

2.1.3. Sperm Hücresinin Yapısı

İnsan sperm hücresi ortalama 60 µm uzunluktadır. Baş, boyun, orta parça ve kuyruktan oluşur. Oval ve yassı olan baş bölgesi; 4,5 x 3 µm boyutundadır. Başın büyük kısmını nükleus kaplar. Başın 2/3 ön kısmı akrozom denen bir kılıf ile örtülüdür. Akrozomun dış ve iç olmak üzere iki tabakası vardır. İç akrozomal membran nükleusa sıkıca tutunurken dış akrozomal membran da plazma membranı yanındadır. Sperm ovuma yaklaştığında plazma membranı ile dış akrozom kılıfı

birleşir ve açılarak enzimlerini salar. Bu enzimler ovumun etrafındaki hücre tabakalarını ve zarları eritir. Kumulusu eriten hyaluronidaz, korona radiatayı eriten korona penetrasyon enzimi ve zona pellusidayı eriten ise akrozin enzimidir. Sperm başı ovum sitoplazması içine girdikten sonra zonadaki açıklığın tekrar onarılması için gerekli nöraminidaz enzimi de akrozomdan salgılanır (Aras 2009; Speroff ve Fritz 2011). Kuyruğun içinde ise aksonem bulunur. Aksonem, orta ve esas parçalarda dış yoğun fibriller denen hücre iskeleti organelleri ile kuşatılmıştır. Orta parçada mitokondriler, en aktif kısım olan esas parçada ise fibröz kılıf bulunur. Fibröz kılıf esas parçanın başladığı yerde başlar ve son parçada kesilir. Son parça ise fibröz kılıfın sonlandığı yerde başlar (Junqueira ve Carneiro 1998; Arslan 2008).

Sperm kuyruğu 4 parçadan oluşur (Resim 2.2);

- 1) Sperm bağlantı parçası
- 2) Orta bölüm
- 3) Esas parça
- 4) Son parça

1. Sperm Bağlantı Parçası (Boyun): Uzunluğu yaklaşık 0,3 μm olup, yapısında segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriol bulunur.

2. Orta Bölüm: Çapı yaklaşık 1 μm ve uzunluğu 7 μm 'dir. Yapısında aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibriller ve mitokondrial tabaka yer alır.

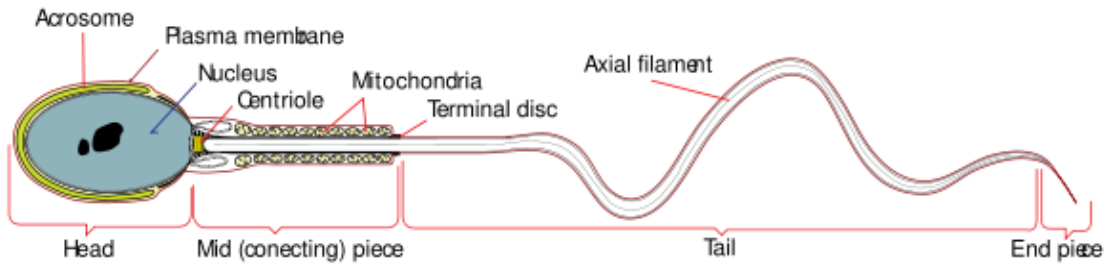
3. Esas Parça: Çapı yaklaşık 0,5 μm ve uzunluğu 40 μm 'dir. Yapısında aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibriller, fibröz tabaka ve plazma membranı bulunur.

4. Son Parça: Kuyruğun son kısmına 5-7 μm kala kalın fibriller ve fibröz tabaka kaybolur (Kuyucu 2006).

Spermin baş kısmında bulunan akrozom, fertilizasyon için gerekli enzimleri içermektedir. Orta parçada yer alan mitokondri, spermin hareketliliği için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Kuyruk yapısında yer alan aksonem hareketliliğin

sağlanmasında önemlidir. Sonuç olarak sperm hücresi oosit hücresini fertilize edip, genetik materyalini oosite aktarmak için özelleşmiştir (Ok 2005).

Ejekülasyondan sonra semen, jel halindeyken prostattan salınan enzimlerin etkisiyle 20-30 dakika içinde likefiye olur. Semen alkalı pH'sı spermeleri bir süre için vajinanın asit ortamından korur. Spermeler servikal mukusa vardıklarında küçük gözeneklerden aktif itme hareketi ile geçerler. Spermde motilite bozukluğu ya da baş anomali varsa bu engelden geçemeyeceklerdir. Uterus kontraksiyonları ile yukarı doğru itilen spermeler fallop tüplerine gelerek oositle etkileşime geçerler. Koitus sonrası spermelerin 80 saat kadar fallop tüplerinde bulunduğu gösterilmiştir (Speroff ve Fritz 2011).



Resim 2.2. İnsan Spermatozoa (<http://commons.wikimedia.org> 05.11.2014).

2.1.4. Sperm Hücresinin Kapasitasyonu

Spermin oositi dölleyebilmesi için kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun oluşması gerekir. Kadın genital sistemine gelen sperm hücreleri öncesinde dölleme yeteneğine sahip değildir. Spermeler dölleme yeteneklerini, kadın genital kanalında ilerlerken kazanırlar. Bu olaya kapasitasyon denir. Kapasitasyon esnasında özellikle uterus ve fallop tüplerinde bulunan salgıların etkisiyle akrozom bölgesini örten hücre membranı üzerindeki glikoproteinler ve seminal plazma proteinleri tamamen uzaklaştırılır. Sperm oosite yaklaştığında ya da folliküler sıvı ile muamele edildiğinde daha ileri değişimler ortaya çıkar. Kapasitasyon işlemi dışı genital kanalda gerçekleşmesine rağmen in-vitro şartlarda medyumlarda da kısa bir inkübasyon süresi sonrasında kapasitasyon sağlanabilir. Kapasitasyondan sonra akrozom reaksiyonu başlar.

2.1.5. Akrozom Reaksiyonu

Sperm hücreleri kapasitasyonları tamamlandıktan sonra hücre membranlarında bulunan yüzey reseptörleri ile ampullada bulunan sekonder oositi yakalarlar. Sekonder oositin zona pellusidasında, spermlerin yüzey reseptörleri için bağlanma bölgeleri bulunur. Spermlerin bu bölgelere bağlanmasıyla Ca^{+2} iyonlarının sperm hücrelerine alınması hızlanır ve akrozom reaksiyonu başlar. Akrozom reaksiyonunda plazma membranı ve dış akrozom membranı erir. Akrozomun dış membranı, spermin hücre membranı ile kaynaşır. Bu olay sperm nükleusunu bir başlık gibi saran yapı içindeki enzimlerin salınımına sebep olur. Eriyerek açılan bu bölgelerden, akrozom enzimleri (hyaluronidaz, akrozin, proteaz, glukuronidaz, nöroaminidaz benzeri faktör, kumulus penetrasyon enzimi) dışarı çıkar. Bu bölgelerdeki hücre zarı ve akrozomun dış zarı tamamen erir, geriye sadece iç akrozom zarı kalır. Bu olaya akrozom reaksiyonu adı verilir (Speroff ve Fritz 2011).

2.2. Semen Analizi

Semen analizi; erkek üreme sağlığı ile ilgili çok önemli klinik bilgiler sunan bir laboratuvar testidir. Erkek genital sistemi ile ilgili tanısal değerin bulunmasının yanında, özellikle fertilité sorunu yaşıyan erkeklerde en önemli ve temel test olması özelliğini korumaktadır. Yardımcı üreme tekniklerindeki (YÜT) gelişmelere paralel olarak 20. yüzyılın son çeyreğinde infertilite alanındaki çalışmalar hızla artmış ve semen özellikleri ile ilgili tüm dünyadan veriler toplanabilmiştir. Dünya sağlık Örgütü (World Health Organization,WHO) semen analizinde standardizasyonun sağlanabilmesi için ilk kez 1980 yılında ve daha sonra da 1987, 1992 ve 2002 yıllarında “İnsan semeni ve insan semeni servikal mukus etkileşimlerinin incelenmesi için laboratuvar el kitabını yayınlamıştır. Ancak son yıllarda YÜT ve androloji biliminde yaşanan hızlı gelişmeler ve laboratuvarlarda standardizasyona verilen önem artışı nedeniyle WHO; 2010 yılında yeni kanıtlar ve veriler ışığında, yeniden bir değerlendirme yaparak beşinci baskıyı (Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen) çıkarmıştır. 2002 kriterleri ile 2010 kriterleri kıyaslandığında özellikle mikroskopik inceleme sonuçlarında farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu el kitabındaki referans değerler 8 ülkeden, son 12 ayda ya da daha kısa sürede eşi gebe kalan fertil erkeklerden, 2-7 günlük perhizle, önceki el kitabına uygun kriterler uygulanarak elde edilmiştir. Bir semen analizi kişinin semen

kalitesini değerlendirmek için yeterli değildir. Bu nedenle temel verileri elde edebilmek için iki veya üç örneğin incelenmesi gerekmektedir.

Spermiogramın makroskobik ve mikroskobik olarak standartlara uygun değerlendirilebilmesi için zamana bağlı takip edilmesi gereken basamaklar şunlardır:

İlk 5 dakika: Mastürbasyon ile laboratuvara yakın bir odada, standartlara uygun temiz ve kapaklı bir kaba alınan sperm örneğinin likefiye olması için inkübatör (37°C) veya ısıtılmış yüzeye yerleştirilmesi.

30-60 dakika arası: Semen görünümünün, viskozitesinin, hacminin, pH'sının, likefaksiyon süresinin değerlendirilmesi ve sayı, canlılık, hareket, morfolojik özellikler ve gerekli ise immünolojik değerlendirme için mikroskobik incelemenin yapılması.

3-4 saat arası: Gerekliyse örneğin mikrobiyoloji ve/veya biyokimya laboratuvarlarına gönderilmesi ve morfolojik değerlendirmenin tamamlanması (Özçınar 2014; Tapısız ve ark 2012; Katie ve ark 2012).

Spermiyogram tetkiki 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası yapılmalıdır. Bunun yanısıra 10 günü aşan cinsel perhiz motiliteyi değiştirmektedir. Ayrıca doğru sonuca ulaşmak için 1-2 ay aralarla en az 3 defa tekrarlamak gereklidir. Analiz sonuçları birbirine %20 yakınlıkta ise ilave örneklere gerek yoktur.

2.2.1. Semen Genel Özellikleri

Semen sıvısı; sperm hücreleri dışında prostat, epididimis, seminal vezikül, vas deferens, cowper ve üretral bezlerden gelen çeşitli oranlardaki salgılardan oluşmaktadır. Seminal vezikül semen hacminin %60'ını içerir. Seminal sıvı spermlerin temel besini olan fruktozu içerdiği gibi semenin koagülasyonunu sağlayan çeşitli maddeleri de bulundurur. Prostat salgısı semen hacminin %20'sini oluşturur. Hafif asit özelliği olup sitrik asit içerir. Asit fosfataz ve proteolitik enzimler açısından da zengindir. Proteolitik enzimler koagüle semenin sıvılaşmasını sağlar (Kayıkçı ve ark 2002).

2.2.1.1. Makroskopik İnceleme

a) Likefaksiyon (Sıvılaşma Süresi):

Örnek alınmasını takiben genellikle ilk 15 dakikada görülür ancak 60 dakikaya kadar uzayabilir. Nadiren sıvılaşma olmayabilir, mekanik veya enzimatik çözme gerekebilir.

b) Viskozite:

Likefaksiyondan sonra geniş ağızlı bir pipet ile örnek; yerçekimi etkisiyle damlamaya bırakılır, pipet ile damla arasındaki mesafe 2 cm'yi geçmemelidir, geçmesi durumunda artmış viskozite söz konusudur.

c) Renk ve Koku:

Görünümü mat beyaz renktedir. Ancak perhiz süresi uzun olursa renk değişerek sarımsı hal alabilir. Kendine özgü kokusu perhiz süresine ve enfeksiyon varlığına bağlı olarak değişebilir. Koku özelliğinin prostat salgılarından kaynaklanan sperm oksidasyonu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.

e) Hacim:

Kabın tartılması ideal olmakla birlikte, ölçülü silindirler veya pipetler ile de hacim ölçülebilmektedir. Semen hacmi için en düşük referans değeri 1,5 ml'dir (Tablo 1). Semen hacmindeki anormal değerler, önemli klinik patolojilere işaret edebildiği için örneğin tamamının alınmış olması önemlidir. Hasta özellikle bu konuda bilgilendirilmelidir (Kayıkçı ve ark 2002; Özçınar 2014).

f) Semen pH'sı:

Örnek iyice karıştırıldıktan sonra bir damla semen pH kağıdı üzerine konur ve 30 sn içindeki renk değişimi kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılır. Normal bir örnek için alt referans değeri 7,2'dir.

2.2.1.2. Mikroskopik İnceleme

Makroskopik incelemeyi takiben, faz-kontrast mikroskobu ile geliştirilmiş Neubauer hemositometresi veya özellikle YÜT merkezlerinde olduğu gibi Makler sayım kamarası kullanılarak sperm konsantrasyonu, motilite özellikleri, sperm dışı hücreler, agregasyon veya aglütinasyon varlığı açısından ilk mikroskopik değerlendirme yapılır. Morfolojik inceleme için boyama işlemi yapılmak üzere temiz bir lam üzerine ince yayma şeklinde sperm yayılıp kurumaya bırakılır.

Makler kamarası ile sayım: İkili optik cam sistemi esasına göre x20 objektifli mikroskopta kullanılır. Kamara derinliği 10 µm'dir. Üst camın üzerinde 0,1x0,1 mm'lik 100 kareden oluşan bir ızgara ile direkt olarak hareketli spermier fikse edilmeden sayılır. Izgara üzerinde 10 adet karede sayılan sperm sayısı milyon olarak ml başına düşen sperm sayısını verir. Aynı sayım 4 kez 10 farklı karede tekrarlanır, daha sonra ortalaması alınır.

a) Sperm Agregasyonu

Hareketsiz spermierin birbirleri ile ortamdaki mukus iplikleri gibi debris materyali ile veya sperm dışı hücreler ile yapışması sonucu gözlenebilir.

b) Sperm Aglütinasyonu

Hareketli spermierin birbirine baş-baş, kuyruk-kuyruk veya karışık olarak yapışarak birarada bulunmasıdır. Grade 1 (İzole): Aglütinasyon başına ayrılmış sperm <10 spermatozoa, spermierin çoğu serbesttir. Grade 2 (Orta): Aglütinasyon başına 10-50 sperm görülür. Grade 3 (Geniş): Aglütinasyon başına >50 spermatozoa, bazı spermatozoalar serbest. Grade 4 (Bütün): Bütün spermatozoalar aglütine olmuştur ve bağlantılar arası aglütinasyon görülür.

c) Sperm Konsantrasyonu

Makler sayım kamarası ile sayım yapıldığında 10 tane orta boy karedeki toplam sperm sayısı milyon/ml olarak kaydedilir. Normal bir semende alt referans değeri 15×10^6 /ml'dir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Semen Analizi İçin Normal Referans Değerler

PARAMETRELER	2010 DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ
Semen Hacmi	1.5
Total Sperm Sayısı (10^6 /ejekülat)	39 (33-46)
Sperm Sayısı/ml (10^6 /ml)	15 (12-16)
Total Motilite (%)	40 (38-42)
Progresif Hareketli (%)	32 (31-34)
Canlılık (Vitalite) Testi (%)	58 (55-63)
Normal Morfolojide Sperm (%)	4 (3.0-4.0)
pH	≥ 7.2
Peroxidaz Pozitif Lökosit (10^6 /ml)	<1

d) Total Sperm Sayısı

Tüm ejakülattaki toplam sperm sayısıdır ve alt referans değeri 39×10^6 /ml'dir. Sperm konsantrasyonunun total hacim ile çarpımından elde edilir. İlk mikroskopik incelemede sperm hücresi görülmemiş ise tüm ejakülat 3000g ile 15 dakika santrifüj edilerek dip kısımdan (pellet) damlalar yapılarak lam-lamel arası incelenir, sperm hücresi görülürse (kriptoospermi), toplam sayı, motilite karakteri ve belirgin bir morfolojik özelliği varsa kaydedilir. Tüm pellette sperm hücresi görülememişse azospermi raporu düzenlenir (Tapısız ve ark 2012; Özçınar 2014).

e) Sperm Hareketi (Motilite)

İlk 30 dakikada, oda ısısında veya 37°C 'de Faz-kontrast mikroskobu ile genellikle x200 büyütmede birden fazla örnek damlası ile hareketlilik değerlendirilir.

Spermiler progresif hareketli, nonprogresif hareketli ve hareketsiz şekilde sınıflandırılır. Progresif hareket eden sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket etmektedir. Nonprogresif hareket eden sperm hücresi ilerleyici hareket etmeyip küçük dairesel veya yerinde hareket etmektedir. Sperm hücresinde hiç hareket gözlenmiyorsa hareketsiz olarak sınıflandırılır. Total hareketlilik için en düşük referans değeri %40, progresif hareket için ise %32'dir.

f) Sperm Canlılığı (Viabilite)

Sperm hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm hücresi oranı < %40 olduğu durumlarda sperm canlılık testleri özellikle önem kazanır. Eozin-nigrosin veya Eosin-Y testinde membran bütünlüğü hasarlanmış sperm boyayı alır ve boyanmış olarak gözlenir, hipoozmotik şişme testinde ise membran bütünlüğü olan sperm hipoozmolar sıvıyı hücre içine alarak şişer ve kuyrukları kıvrık izlenir. Sperm canlılığı için en az 200 sperm hücresi sayılmalıdır. Sperm canlılığı testleri en düşük referans değeri %58'dir.

g) Sperm Dışı Hücreler

Ejekülatta genitoüriner sisteme ait epitel hücreleri, immatür germinal hücreler ve lökosit hücreleri de gözlenebilir. Normal ejakülatta yuvarlak hücre ve lökosit sayısının < 1×10^6 /ml olması gerekir. Lökosit dışındaki hücrelerde artış saptanırsa lökosit peroksidaz testi veya lökosit belirteçleri çalışılmalı, lökosit olup olmadıkları tanımlanmalıdır.

h) Sperm Morfolojisi

İnsan sperminde morfolojik olarak değişkenlik gözlenebilmesine rağmen, postkoital mukus içi spermilerin ve zona pellusida yüzeyinden elde edilen spermilerin morfolojik özellikleri incelendiğinde normal bir sperm morfolojik kriterleri tanımlanabilmiştir (Tablo 2.2). Semen smear preparatı havada kuruduktan sonra sperm boyaları (Papanicolaou, Shorr ve Diff-Quick) ile boyama yapılır, immersiyon yağı kullanılarak 10x100 büyütmede en az 200 sperm hücresi incelenerek baş, orta kısım-boyun, kuyruk ve normal morfolojideki spermilerin yüzdesi hesaplanır. Normal

morfolojik özelliklere sahip sperm için en düşük referans değer %4'tür (Özçınar 2014).

Tablo 2.2: Normal Sperm Morfolojik Değerler

PARAMETRELER	2010 DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ
Baş	
Genişlik	2.8 µm
Uzunluk	4.1 µm
Boy/En	1.5 µm
Akrozomal Bölge	Başın %40-70'ini kaplamalıdır.
Boyun ve Orta Parça	
Genişlik	0.6 µm
Uzunluk	4.0 µm
Sitoplazmik Artıklar	< Normal baş alanı 1/3'ü.
Kuyruk	
Uzunluk	45 µm
Genişlik	<orta parça

2.3. Erkek İnfertilitesine Bakış

İnfertilite, çiftlerin bir yıl süre ile korunmasız olarak cinsel ilişkiye girmesine rağmen çocuk sahibi olunamaması durumu olarak tanımlanmaktadır. Bu durumdaki çiftlerde ilk olarak infertilitenin nedenini araştırmaya yönelik bir takım araştırmalar yapılır. Bu araştırmalar jinekolojik, endokrinolojik, ürolojik, anatomik, genetik ve psikolojik incelemeleri içerir. İnfertil çiftlerin %50'sinde kadın, %40'ında erkek

sorumludur. İnfertilitenin nedeninin tam olarak anlaşamadığı durum olan açıklanamayan infertilite durumu ise toplam infertilite vakalarının %10'unu kapsamaktadır. İnfertilite tanısı koyulduktan sonra çiftin, özellikle yaşı, infertilite nedeni, infertilite süresi, daha önceden uygulanan tedaviler ve gebelik öyküsü gibi birçok faktör değerlendirilerek uygulanacak tedavi yöntemine karar verilir. Bu tekniklerin tümüne Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) adı verilir (Gardner 2006).

İnfertilite üreme çağındaki erkeklerin yaklaşık olarak %8'ini etkileyen bir problemdir (Lipovac ve ark 2014). İnfertil bir erkeğin değerlendirilmesi için kapsamlı bir öykü, fizik muayene ve semen analizi gereklidir. Semen analizi, temel bir laboratuvar değerlendirmesidir ve hastanın germinatif yapısı, epididimis ve aksesuar bezlerin fonksiyonları hakkında önemli bilgiler verir. Ejakülat semeni sperm yokluğundan sperm parametrelerindeki ciddi değişikliklere kadar sperm parametreleri hakkında önemli bilgiler verir. Geleneksel semen analizinin yanında bu analizlerde yer almayan spermatik anomalileri ve işlevsel bozuklukları tanımlayan ek testler de geliştirilmiştir. Sperm DNA bütünlük testleri ve antisperm antikollarının değerlendirilmesi gibi. DNA bütünlüğünün seviyesi erkek fertilitate potansiyeli ile ilişkilidir (Esteves ve Schneider 2011).

Louis Brown'un 1978 yılında in-vitro fertilizasyon (IVF) yöntemiyle dünyaya gelmesi infertilite tedavisinde atılan devrim niteliğindeki adımlardan biri olmuştur. IVF uygulamalarında, anormal parametrelere sahip semen örnekleri kullanıldığında fertilizasyon başarısı düşmektedir. İn-vivo ortamda ve IVF uygulamalarında oositi polispermi ve fiziksel hasarlardan koruyan zona pellusida, düşük sayıda ve/veya kötü kalitede spermin varlığında fertilizasyon aşamasında engel oluşturmaktadır. Fertilizasyonun ilk basamaklarından olan spermelerin zona pellusidaya penetrasyonunda oluşan başarısızlık; motilitenin yetersizliği, anormal kapasitasyon ve/veya akrozom reaksiyonundaki bir problemin sonucudur (Delilbaşı 2008).

Gebelik meydana getirme amacıyla yapılan insan oosit, sperm ya da embriyo ile ilgili tedavi ya da prosedürler YÜT kategorisine dahil edilmiştir. Erkek infertilitesindeki major yenilikler ICSI, sperm-embriyo kriyoprezervasyonu ve azospermik hastalarda epididimis ya da testisten sperm elde edilmesidir (Esteves ve Schneider 2011).

YÜT’de Sperm Defektlerinin Etkileri

Geleneksel olarak, erkek faktöre dayalı infertilite anormal sperm konsantrasyonu (oligozoospermia), düşük sperm motilitesi (astenozoospermia) ya da morfolojisi (teratozoospermia) olarak tanımlanır. Bu olguların kombinasyonları ise oligoastenozoospermia, oligoteratozoospermia, astenoteratozoospermia ya da oligoastenoteratozoospermia olarak isimlendirilir. Santrifüj sonrası ejakülatta sperm yokluğu ise azoospermia olarak tanımlanır (Balaban ve ark 2001).

2.4. Sperm Hazırlama Teknikleri

Tanısal fonksiyon testleri, inseminasyon ve YÜT için tedavi amaçlı sperm eldesi gibi çeşitli nedenlerle spermelerin seminal plazmadan ayrılması gerekebilmektedir. Seminal plazma; IUI veya IVF gibi yardımcı üreme tekniklerinde elimine edilmesi gereken ejakulat kısmıdır. Klinik uygulamada; hücre döküntüleri, germ dışı hücreler ve ölü spermelerden arınmış yüksek yüzde morfolojik olarak normal ve hareketli hücreler elde etmek amacıyla, insan spermeleri seminal plazmadan ayrıştırılır. Aynı zamanda sperm kapasitasyonu tamamlanır. Sperm hazırlama tekniğinin seçimi semen numunesinin özelliklerine göre belirlenir. Bir sperm seçim tekniğinin etkinliği genellikle; mutlak sperm sayısı, toplam hareketli sperm sayısı veya morfolojik olarak normal hareketli spermeler olarak ifade edilmektedir (Henkel ve Schill 2003; Kadioğlu 2010; WHO Manual 2010).

Semen numuneleri belli bazı zararlı enfeksiyon etkenleri içerebildiğinden, teknisyenler bu numuneleri çok dikkatli biçimde ve biyolojik olarak tehlikeli maddeler olarak ele almalıdır. Enfeksiyon etkenlerini semenden ayırmada, sperm hazırlama tekniklerinin %100 etkili olduğu düşünülemez. Laboratuvar güvenliğinin temelini iyi laboratuvar uygulamaları oluşturmaktadır.

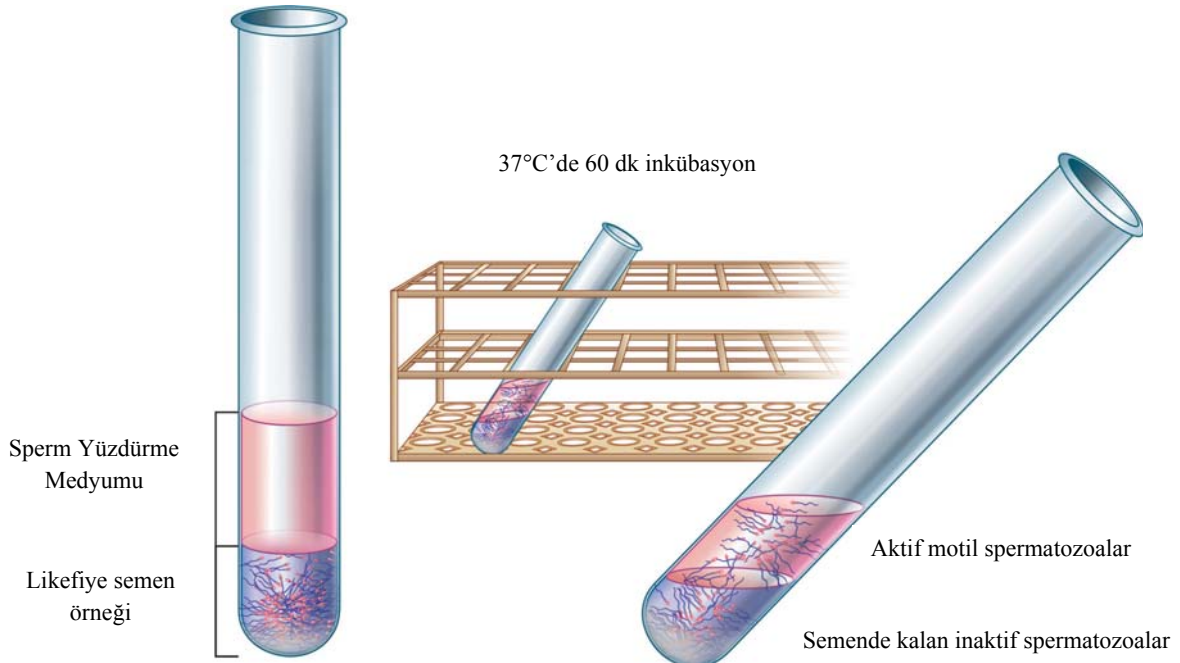
2.4.1. Sperm Yıkama

Bu basit yıkama işlemi en yüksek oranda sperm eldesi sağlamakta olup, semen numunelerinin kalitesi iyi olduğu takdirde yeterli olmaktadır. Sıklıkla intrauterin inseminasyon için spermeleri hazırlama amacıyla kullanılır (Boomsma ve ark 2011). Sperm yıkama yöntemi; semenin albumin içeren steril bir medyum ile yıkanması olarak tanımlanır. Miktarına göre tüplere ayrıştırılır ve yaklaşık 10 dk 300 g’de

santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır ve pellet homojenize edilip tekrar 300 g'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant tekrar uzaklaştırılır ve pellet homojenize edilip kullanılır (Kadioğlu 2010; Natali 2011; Beydola ve ark 2013).

2.4.2. Sperm Yüzdürme (Swim-up)

Sperm yüzdürme prosedürü eğer semen normospermik ise IVF teknikleri içinde en yaygın kullanılanıdır. Spermiler seminal plazmadan dışarı, kültür medyumu içine yüzmeye yetilerine göre seçilebilir. Bu yaklaşım swim-up tekniği olarak bilinmektedir. Kültür medyumu likefiye olmuş semen üzerine 45°'lik açıyla sızdırılarak eklenir ve yine 45°'lik açıyla inkübatörde 30-60 dk spermilerin üstteki medyuma yüzmesi beklenir. Açının 45° olması semen ve medyum arasındaki yüzeyi artırarak sperm yüzmesini kolaylaştırır. Daha sonra, hareketli spermier kültür medyumu içine doğru yüzerler. Bu prosedür; yıkama yöntemine göre daha az sayıda sperm eldesi sağlarsa da, spermier arasında motiliteye göre seçim yapıldığı için semendeki hareketli sperm yüzdesinin düşük olduğu durumlarda (örn; IVF ve ICSI için) uygun değildir (Kadioğlu 2010; Natali 2011).



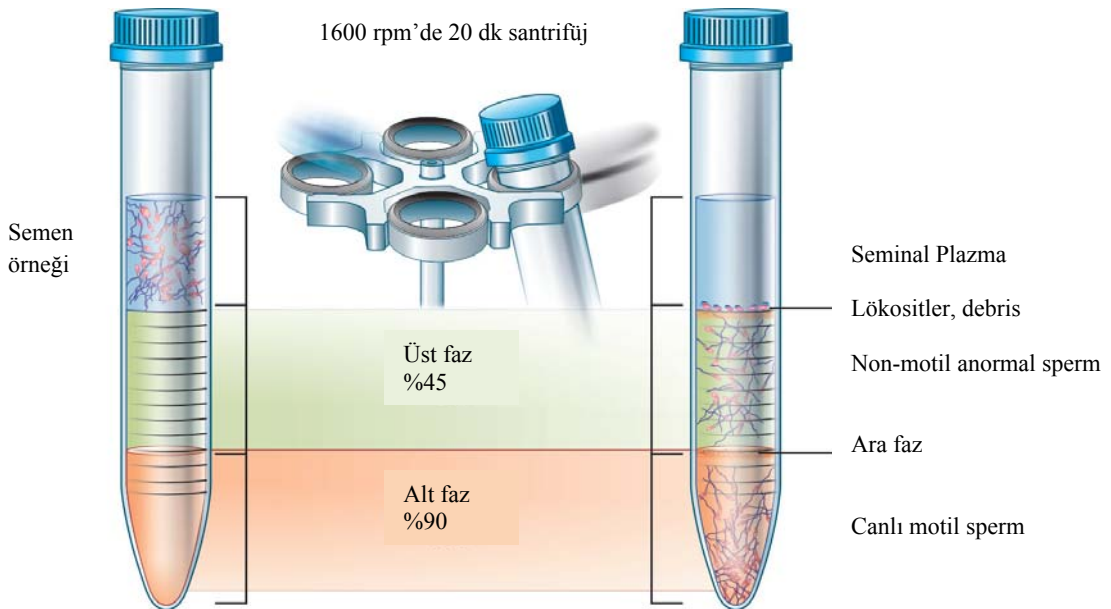
Resim 2.3. Swim-up Tekniği. Swim-up medyumu, dikkatlice sperm içeren medyumun üstünde tabaka olacak şekilde sızdırılarak eklenir ve 45°'lik açıyla 60 dk inkübe edilir. Aktif motil sperm hücreleri üst tabakaya doğru yüzmeye başlar ve sonrasında üst sıvı aspire edilir (Beydola ve ark 2013'den uyarlanmıştır).

2.4.3. Sperm Yüzdürme (Swim-Down)

Bu teknik de sperm hücrelerinin doğal hareketine dayanılarak uygulanmaktadır. HSA (human serum albumin) içeren medyum hazırlanır, bu medyum üstten alta düşük konsantrasyonlu progresif harekete sebep olur. Semen örneği, medyumun üstüne doğru yer değiştirir. 37°C’de 1 saat beklenir. Migrasyon sırasında en motil spermeler gradient içine doğru aşağı yönde hareket eder (Beydola ve ark 2013).

2.4.4. Dansite Gradient Santrifügasyon

Dansite Gradient yöntemi şiddetli oligozoospermia, teratozoospermia ya da astenozoospermia olgularında çok sayıda motil sperm elde etmek için tercih edilen bir tekniktir. Bu teknikte kaliteli spermeler ölü spermelerden lökositlerden ve diğer seminal plazma komponentlerinden kesintisiz yoğunluk gradienti oluşturularak separe edilir. Farklı dansite ve motilitedeki hücreler santrifüj sırasında koloidal silika tarafından seçilir. Bu yöntemde yüksek motilite ve iyi morfolojideki spermeler tüpün alt kısmına toplanır ve ölü spermelerden lökosit ve debrislerden ayrılır (Natali 2011).



Resim 2.4. Dansite Gradient Santrifüjleme (Beydola ve ark 2013’den uyarlanmıştır).

2.5. Apoptozis

Apoptozis diğ er adıyla programlanmış hücre ölümü, normal fizyolojik şartlar altında meydana gelen bir hücre ölümüdür. Apoptozis sayesinde fonksiyonları bozulmuş ya da ihtiyaç kalmayan hücreler organizmadan uzaklaştırılırlar. Apoptoziste hücrenin kendisi aktif rol oynar, hücreler kendi otonom mekanizmalarına göre programlanmış ölümü gerçekleştirirler. Apoptozis hücre membran bütünlüğünün korunduğ u, kontrollü bir ölüm şeklidir. Böylece komşu hücrelere zarar verilmez. Diğ er bir hücre ölüm şekli nekrozdur. Nekroz patolojik bir durumdur ve plazma membranını hasarlayan ya da hücreye zarar veren, uygunsuz fiziksel ya da kimyasal şartlarda (hipoksi, hipotermi, toksinlere maruz kalma, viral invazyon) meydana gelir. Aş ırı mitokondri şişmesi ve hasarı, plazma membranının hemostazisini kaybetmesiyle fonksiyonunun kaybedilmesi, hücre şişmesi ve lizisi nekrozun en karakteristik özellikleridir (Israels ve Israels 1999). Hücre hasarının bir sonucu olarak hücre membranının zarar görmesi ve enerji depolarındaki azalma ekstrasellüler iyonların ve suyun girişine izin verir. Mitokondrilerin şişmesiyle hücre membranı integritesini kaybeder. Plazma membranının parçalanmasıyla lizozomal enzimleri içeren sitoplazmik kısım hücre dışına sızar. Böylece nekrotik hücre ölümü doku zararına ve ş iddetli inflamatuvar yanıtı sebep olur (Erdoğan ve Uzaslan 2003; Tomatır 2003). Apoptozis iç ve dış sinyaller ile aktive edilir. Apoptozise uğ rayan hücreler morfolojik ve biyokimyasal değı ş iklikler gösterirler. DNA fragmentasyonu, nükleusta meydana gelen hücreyi ölüme götüren irreversibl bir olaydır. DNA fragmentasyonu, Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağı mlı endonükleazlarla DNA'nın 180-200 baz çiftlik küçük oligonükleozomal fragmentlere bölünmesiyle gerçekleşir. Nükleus, nükleer kromatinin agregasyonu ile nükleer zar tarafından sınırlandırılarak küçük fragmentlere bölünür (Israels ve Israels 2001; Öktem ve ark 2001).

Hücre hacmindeki azalma sitoplazmanın bü zülmesiyle gerçekleşir. Hücre iskeletine ait yapılar hücre yüzeyine paralel olarak yığı larak yeniden organize olurlar. Ribozomlar sitoplazma içinde kümelenirler, granüllü endoplazmik retikulum konsantrik sarmal yapılar olarak gözlenir. Mitokondrial membran kanallarındaki değı ş iklikler sonucu mitokondrial fonksiyon kaybı meydana gelir. Mitokondri bütünlüğü bozular; elektron transport zinciri parçalanır. Sitokrom C gibi proteinler, kaspaz adı verilen proteolitik enzimleri aktive etmek için intermembranöz boşluktan

sitoplazma içerisine bırakılırlar. Sitokrom C'nin salınımı Bcl-2 proteinleri tarafından gerçekleşir. Hücre membranındaki değişiklikler sonucu blebler oluşur. Bu değişiklik sitoplazmanın yüzeyinden plazma membranının dış yüzeyine doğru bazı moleküllerin (fosfolipidlerin) göçüne bağlıdır. Plazma membranındaki fiziksel ve kimyasal değişiklikler membran integritesi değişmeden bleblerin oluşmasına sebep olur. Son aşama apoptotik cisimlerin oluşmasıdır. Bu membranla çevrili veziküller organel ve nükleik materyal içerirler. Hemen fagositoza uğradıkları için inflamatuvar bir yanıt oluşmaz (Gewies 2003; Ross ve ark 2003).

2.5.1. Apoptozisi Düzenleyen Dış ve İç Uyarılar

Apoptozis, hücreye gelen dış uyarılar ya da çeşitli iç sinyaller yoluyla tetiklenebilir (Erdoğan ve Uzaslan 2003). Apoptozisi tetikleyen dış uyarıların bazıları şu şekilde sıralanabilir: Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi Ca^{+2} miktarındaki artış, tümör nekroz faktör, koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü, Fas/FasL sisteminin aktive olması, serbest radikaller, ultraviyole ışın, ilaçlar ve çeşitli antijenler. İç uyarılar arasında ise onkogenler, p53 gibi tümör supresörler ve beslenme yetersizliği sayılabilir (Öktem ve ark 2001).

2.5.2. Apoptozisin Gen Regülasyonu

Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı p53 genini aktive eder. p53 proteini, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptozise yönlendirir. Ayrıca p53'e bağlı hücre döngüsünün G1'de durması için p21 gereklidir (Öniz 2004). Apoptozisin regülasyonunda önemli bir rol oynayan Bcl-2/Bax gen ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik olmak üzere iki bölüme ayrılır. Hücrenin canlılığını sürdürebilmesi, bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin oranına bağlıdır. Bcl-2 mitokondri dış membranında bulunur ve iyon geçişini düzenler. Bax ise sitoplazmada bulunur ve apoptotik bir sinyal alınması halinde mitokondri membranına yerleşerek por oluşumunu sağlar (Ulukaya 2003). Kaspazlar, sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzim olup apoptozis için gereklidirler. Tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu 2002). Apoptozisin son devresindeki hücresel substratların

degradasyonundan sorumlu olup, apoptozisin başlatılmasında da kritik önemleri vardır (Bilgici 2014).

2.5.3. Apoptozisin İndüklenmesi

Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü hücre ölüm reseptörleri olarak adlandırılır ve hücre membranında bulunurlar (Akşit ve Bildik 2008). Bu reseptörler; ligantlarıyla ölüm domainleri olarak adlandırılan bir proteine bağlanırlar ve bu proteinler sitoplazma ile interaksiyon sağlar. Bu ölüm domainlerini içeren protein yapıları, kaspaz 8'in aktivasyonu ile direkt olarak apoptozisin başlamasına neden olurlar (Erdoğan ve Uzaslan 2003; Tomatır 2003; Bilgici 2014).

2.5.4. Sperm DNA Hasarının Önemi ve Apoptozis

Erkek faktörüne bağlı infertilitede fertilizasyon başarı oranını arttırmak için tercih edilen ICSI yöntemi sırasında; motilite ve morfoloji temelli sperm seçimi yapılmaktadır. Günümüzde normal değerlere sahip spermelerin DNA bütünlüğü bilinmemekte ve ICSI yöntemi ile bu tip spermelerin seçimi risk oluşturmaktadır (Avendano ve Oehninger 2011). İnfertil erkeklerin %15'inin normal spermiyogram bulgularına sahip olması, rutinde kullanılan parametrelerin, sperm kalitesini değerlendirmede yetersiz kaldığını göstermektedir. Sperm morfoloji ve motilite anomalilerinin DNA hasarı ile ilişkili olduğu (Shamsi ve ark 2011; Sharbatoghli ve ark 2012), hasarlı DNA'ya sahip sperm hücrelerinin fertilizasyonu negatif yönde etkilediği (Huang ve ark 2005; Avendano ve ark 2010), embriyo kalitesini bozduğu ve düşük oranında artışa sebep olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Zhang ve ark 2012). İn-vivo fertilizasyon sırasında anomalili sperm eliminasyonunun, ICSI yöntemi sırasında gerçekleşmemesi nedeniyle DNA hasarına sahip sperm kullanıma riski bulunmaktadır (Zini ve ark 2011). Bu riski minimize edebilmek için, sperm morfoloji anomalileri ile DNA hasarını ilişkilendiren birçok çalışma yapılmıştır (Daris ve ark 2010; Menkveld ve ark 2011).

Çoğunlukla morfolojiye dayalı seçim ile elde edilen başarı oranı arasındaki ilişki, sperm faktörü ve ooplazmik maturasyon ile ilgili bilinmeyenleri öngörmektedir. DNA hasarlı sperm örneğinde fertilizasyon oranının, motilite anomalisine göre düşük olması, ICSI seçimi sırasında motiliteye dayanan seçimden

ziyade DNA hasarına sahip olmayan sperm seçiminin önemine işaret etmektedir (Simon ve Lewis 2011). ICSI öncesi oosite enjekte edilecek spermde DNA hasarını tespit etmeye yönelik non-invaziv, pratik bir yöntemin olmaması nedeniyle, halen sperm morfolojisi, sperm seçiminde kullanılan en yaygın yöntemdir. Spermde DNA hasarı 6 ana mekanizma ile indüklenmektedir:

- 1) Spermatogenez sırasında apoptozis
- 2) Spermiyogenezde kromatin remodellingi sırasında oluşan kol kırıkları
- 3) Erkek reproduktif traktında ilerlerken serbest oksijen radikalleri ile indüklenen post-testiküler DNA fragmentasyonu
- 4) Endojen endonükleazların indüklenmesi
- 5) Radyoterapi ya da kemoterapi ile indüklenme
- 6) Sigara içimi ya da hava kirliliği gibi çevresel faktörler ile oluşan DNA hasarı (Robinson ve ark 2012).

Anormal kromatin kondensasyonu, reaktif oksijen ürünleri ve apoptozis DNA bütünlüğünü bozan en önemli faktörlerdir. Testiste apoptozis, aşırı gamet oluşumunu önlemekte ve proliferasyonun kontrolünü sağlamakta, hasarlı DNA'ya sahip germ hücre proliferasyonunu önlemektedir. Serbest oksijen radikalleri normal hücre metabolizması sırasında fizyolojik olarak oluşmaktadır. Ancak yüksek düzeyleri sperm kalite ve fonksiyonu üzerine zararlı etkilerde bulunmaktadır. Bununla birlikte artmış serbest oksijen radikallerinin hasarlandırıcı etkisi aktive olan lökositlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Bu sırada 8-OHdG oluşumu (8-hidroksi 2-deoksiguanozin) oksidatif DNA hasarında anahtar rol oynamaktadır. Oksidatif stres, sperm kromatin bütünlüğünü etkilemekte, tek ya da çift zincir kırıkları, baz modifikasyonu, delesyon, çerçeve kayması, çapraz bağlanma ve yeniden kromozomal düzenleme ile sonuçlanmaktadır (Shamsi ve ark 2008).

DNA hasarı, tek ya da her iki DNA iplik kırığı ile nükleotidlerinin modifikasyonunun bozulması şeklinde tanımlanır. Spermatogonial germ hücrelerinden ejakulat spermine kadar transformasyonun herhangi bir basamağında

gelişebilmesi nedeniyle, testiküler spermde, epididimal spermde ve ejakulattaki spermde DNA hasarı meydana gelebilir. Mitoz geçirmiş spermatogoniumun mayozdaki spermatosite transformasyonunda çift DNA iplik kırığı normalde tanınıp çaprazlanma sonrası bağlanır. Eğer tamir edilmezse, ejakulatta hasarın gerçekleştiği fazın hücresi tespit edilir. Spermiyogenez sürecinde protaminler ile histonlar yer değiştirir ve genomun kompaksiyonu gerçekleşir. Kromatin paketlenmesinde oluşan hata, sperm DNA'sının hasara daha yatkın olmasına sebep olur. Epididimal maturasyon sürecinde protamin disülfid çapraz bağlanması tamamlanır ve sperm kromatininin kompakt yapısı sağlanır. Eğer disülfid çapraz bağlanması eksik olursa suboptimal kompaksiyon sonucu DNA hasarına neden olur. Epididimiste sperm depolanması ve geçişi sırasında yada ejakülasyon sonrası gelişen DNA hasarında, spermiyogenez sonrası transkripsiyon ve translasyonun öneminin olmaması nedeniyle tamiri yapılmamaktadır (Shamsi ve ark 2011).

Spermiyogenez başlıca 2 faza ayrılmaktadır; birinci fazda, nükleus yuvarlak olup başlıca nüklear proteini histonlardır. İkinci fazda kromatin yapısında, nüklear şekilde değişim gelişir ve kromatin kondanse hale gelip histonların yerini protaminler alır. Böylece kromatin remodellingi tamamlanır ve bu sırada DNA kırıkları oluşabilir (Andrabi 2007). Protaminler sperm kromatininin sıkıca paketlenmesini sağlarken rezidüv histonlar spesifik DNA dizilerine bağlanarak daha gevşek kromatin paketlenmesine neden olurlar. İnfertil erkeklerde, fertil erkekler ile karşılaştırıldığında histon/protamin oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Zini ve Sigman 2009).

Ejakulat sperminde kaspaz aktivasyonu, fosfotidilserinin eksternalizasyonu, mitokondrial membran potansiyel değişimi ve DNA fragmentasyonu apoptozis belirteçleri olarak bulunmuştur. Çalışmalar infertil erkeklerin fertil olanlarla karşılaştırıldığında daha yüksek oranda apoptotik sperme sahip olduğuna işaret etmektedir. Sperm DNA hasarı fertilitate potansiyelini tahmin etmede önemli bir göstergedir (Franco ve ark 2012; Manochantr ve ark 2012; Shukla ve ark 2012). Embriyonik gelişim sırasında ve sonrasında hücrel apoptozis normal bir süreçtir. Apoptozis yolu ile germ hücre kaybı spermatogenez sırasında baskın olup p53, p21, kaspazlar, bcl-2 ve Fas ekspresyon düzeyleri ve alternatif yollar ile gerçekleşmektedir. Anormal sperm parametrelerine sahip bireylerde Fas ve p53

ekspresyon düzeyleri yüksek iken, normal parametrelere sahip bireylerde düşük bulunmuştur. Ayrıca immatür sperm varlığı apoptotik belirteçlerin yüksekliği ile birlikte (Sakkas ve ark 1999; Sakkas ve ark 2002; Shukla ve ark 2012).

Eldeki verilere göre günümüzde DNA hasarlı spermin oositi fertilize edebilme riski bulunmaktadır. Oosit ve zigot paternal genomdaki hasarı bir dereceye kadar onarabilme yeteneğine sahip olmakla birlikte DNA çift zincir kırıklarının onarımı güçleşmekte ve bu durum embriyo gelişimini etkilemektedir. Bu nedenle fertilize olabilen ancak implantasyon başarısızlığı veya erken dönem düşüklerinin görüldüğü durumlarda sperm DNA'sı önem taşımaktadır (Tamburrino ve ark 2012). Sperm morfolojisi ile birlikte DNA bütünlüğü diğer sperm parametrelerine göre daha güvenilir bulunmaktadır. Sperm baş morfolojisi, sperm nüklear kondensasyonunun ana belirleyicisi olabilir ancak günümüzde aradaki ilişki tam olarak bilinmemektedir (Abu ve ark 2012). Yine sperm nüklear alanının %50'sinden fazlasını kaplayan büyük nüklear vakuollerin anormal kromatin paketlenmesine sahip olduğu ve DNA hasarına daha yatkın olduğu savunulmaktadır (Franco ve ark 2012).

2.5.5. Sperm DNA Bütünlük Testleri

Sperm DNA'sı spermatogenezis sırasında ve spermin reproduktif kanalda ilerlemesi sırasında çeşitli modifikasyonlara uğrar. Bu modifikasyonlar çeşitli mekanizmalarla DNA fragmentasyonlarının oluşumuna neden olabilir (Sakkas ve Alvarez 2010). Yüksek seviyede DNA hasarı sıklıkla kötü semen parametreleri ve infertilite ile ilişkili olmasına rağmen, normal semen analizi olan erkeklerde de sperm DNA hasarı olabilmektedir (Schulte ve ark 2010). Sperm kalitesinin değerlendirmesinde kullanılan testlerden biri de sperm DNA bütünlük testleridir. Sperm DNA bütünlüğü sperm kalitesini gösteren aynı zamanda infertilite prognozunu ve YÜT sonuçlarını etkileyen önemli bir parametredir. Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre bakılan sperm parametreleri; sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi olup bunlar üreme sonuçlarını değerlendirmede yetersiz kalmaktadır. Fertil erkeklerde sperm parametreleri infertil erkeklerden daha yüksek olmasına rağmen, infertil erkeklerin %15'inde sperm parametreleri normaldir (Guzick ve ark 1998; Lewis ve ark 2008).

Sperm DNA bütünlük testleri değişik metotlar ile çalışılabilir. Sperm kromatin paketlenme defektlerinin tayininde; toluidin mavisi, anilin mavisi ile boyanma ve kromamisin A3 testi, sperm DNA bütünlüğünün değerlendirilmesinde; akridin turuncusu testi, Sperm chromatin structure assay, tek hücre jel elektroforezi, sperm kromatin ayrılma testi olan halosperm test, Sperm chromatin dispersion test, TUNEL (the terminal deoxynucleotidyl transferasemediated (TdT) deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labelling assay) ve annexin V testleri kullanılmaktadır. Bu testlerin tümü DNA bütünlüğünü ölçmede farklı mekanizmaları kullansa da genelde birbirleriyle korelasyon göstermektedir (Shamsi ve ark 2008; Koyuncu 2011).

Semenin değerlendirilmesinde ışık mikroskopisi sınırlı bilgi verirken elektron mikroskopisi ile sitolojik detaylar tanımlanabilmektedir. Günümüzde elektron mikroskopisi sperm hücresinin yapısındaki değişimleri incelemede ışık mikroskopisinin tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır. Elektron mikroskopisi ile normal ve anormal sperm yüzdesini ayıran eşik değer henüz saptanmamıştır (Visco ve ark 2010). Özellikle anormal baş, vakuol varlığı, sitoplazmik droplet, boyun ve kuyruk anomalileri gibi morfolojik anomalilerin, elektron mikroskopisinin ince yapısal detayların incelenmesine olanak verme özelliği ile DNA hasarı ve infertilite ilişkisi gösterilmiştir (Aziz ve ark 2007).

DNA bütünlüğü infertilitenin ortaya çıkarılmasında önemli bir özelliğe sahiptir. Bu amaçla, elektron mikroskopi desteğiyle nüklear şekil ve içeriği ayrıntılı olarak incelenebilmektedir. Şekil değişimine uğramış akrozom, kondanse olmamış kromatin ile birlikte yuvarlak ya da oval şekilli, şekil bozukluğu gösteren nukleus ve sitoplazmik droplet varlığı immatüritenin karakteristik özelliği iken, kenar yerleşimli kromatin, şeffaf sitoplazmik vakuoller ile şişkin ve yerleşim bozukluğu gözlenen mitokondri, apopitozisin tipik yapısal özellikleridir. Plazma membran harabiyeti ve kromatini dağılmış nukleusun şekil bozukluğu göstermesi, aksonemal ve periaksonemal yapılarda gözlenen değişimler ise nekroz nedeniyledir (Baccetti ve ark 2002; Collodel ve ark 2008; Collodel ve ark 2009).

Apoptozise uğramış spermde post-akrozomal bölgede aşırı membran üretimi sebebiyle boyun ve orta bölgede yerleşmiş olan sitoplazmik dropletin membran yapıları içeren otofajik vakuoller ile dolu olduğu, plazma membranının genellikle

normal olduğu zaman zaman düzensiz yapıda ve dışı doğru çıkıntılar yaptığı elektron mikroskopik olarak gözlenmiştir (Gandini ve ark 2000).

2.5.5.1. Morfolojik Yöntemler

a) Işık Mikroskobu

- Hematoksilen-Eosin Boyama:

Hematoksilen-eozin (HE) ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. HE; hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. HE boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi.

- Giemsa Boyama:

Giemsa ile boyamada, HE ile boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur.

b) Floresan Mikroskopi

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin (örn; hoechst boyası, DAPI, propidyum iyodür, acridine orange, etidyum bromür, FITC) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanırırlar. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn; hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn; propidyum iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidyum iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen hoechst boyası

ile boyanırlar. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayrımı, hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır. Kromatin kondensasyonu veya nükleus fragmentasyonu olan hücrelerin apoptotik hücreler olduklarını düşündürür.

c) Elektron Mikroskopi

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir.

g) Faz Kontrast Mikroskopi

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları alt tabakadan ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) izlenebilir. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin başlangıçta hücre membranları intakt olmasına rağmen ileri dönemlerde sekonder nekroz gelişir ve böylece membran bütünlükleri bozulur. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde non-vital boyalar (örn; propidyum iyodür) ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen hücreler bu boyalarla boyanmazlar. Çünkü membran bütünlüğü halen tamdır. Sekonder nekroz geliştikten sonra membran bütünlüğü bozulur ve hücreler non-vital boyalarla boyanma özelliği kazanmaya başlarlar. Blisterlerin oluştuğu aşamada membran bütünlüğü halen tamdır ve bu aşamada nükleus morfolojisindeki değişiklikler floresan boyalarla gözlenebilir. Fakat bu dönem uzun sürmez dakikalar içinde membran bütünlüğü bozulur. İstenirse hem faz kontrast mikroskopisi hem de floresan mikroskopisi aynı anda kullanılabilir (Güleş ve Eren 2008).

2.5.5.2. İmmünohistokimyasal Yöntemler

a) Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn; FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iodid (kırmızı floresan) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Güleş ve Eren 2008; Niu ve Chen 2010). Annexin V 35-36 kD ağırlığında Ca^{+2} bağımlı, fosfolipit bağlayıcı bir proteindir ve PS için yüksek affiniteye sahiptir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur. Annexin V yöntemi hem floresan mikroskopuyla hem de flow sitometri ile kullanılabilir (Ulukaya 2003).

b) TUNEL Yöntemi

DNA kırıklarının in-situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve non-izotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in-situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır.

c) M30 Yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır. Sitokeratin 18 tek katlı ve glanduler epitel hücrelerinde bulunan tip 1 intermediate filament proteinidir. Çoğunlukla akciğer, karaciğer, prostat, göğüs ve kolon kanser tiplerinde eksprese edilirken, lenfoid ve nöral hücrelerde bulunmaz.

d) Kaspaz-3 Yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu biliniirse apoptotik hücreler bu metotla tespit edilebilirler.

2.5.5.3. İmmünolojik Yöntemler

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ELISA testi; viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların tanısında ve apoptozisin belirlenmesinde kullanılan, serolojik tanı yöntemlerinden biridir. ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikör var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır.

2.5.5.4. Biyokimyasal Yöntemler

a) Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için kullanılan en yaygın destek ortamıdır. Ayrıştırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak genelde %0,3-2 agaroz konsantrasyonları kullanılır. Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan etidyum bromid ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir.

b) Western Blotting

Western blotlama ya da immunoblotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir. Bu metot yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn; bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn; kaspaz-3) saptanması mümkündür.

c) Flow Sitometri

Flow sitometri lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometride farklı moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak ayrılabilir. Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Apoptozis; flow sitometri uygulamasında iki şekilde belirlenir:

- a. Floresan bir madde olan propidyum iyodür kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak (Güleş ve Eren 2008).

2.6. Fertilizasyonda Rol Oynayan Unsurlar

Fertilizasyon sperm ile oositin doğrudan etkileşimi ile başlar ve birinci mitoz bölünmesinin metafaz aşamasında anne ve baba kromozomlarının birleşmesiyle tamamlanır. Karbohidrat bağlayıcı reseptör proteinler gametlerin yüzeylerinde bulunurlar. Bunlar fertilizasyon sırasında gametlerin birbirini doğru bir şekilde tanıyıp reaksiyona girmelerini sağlamaktadırlar (Boldt ve ark 1989). Fertilizasyon olayının gerçekleşebilmesi için spermlerin kumulus hücreleri arasında ileri hareket etmesi, zona pellusidaya (ZP) bağlanıp penetre olması ve spermle oosit zarlarının birleşerek spermin oosit sitoplazması içine girmesi sağlanır. Bu reaksiyonların devamında oosite başka bir spermin girmesini engellemek için kortikal reaksiyon ve zona reaksiyonu meydana gelir (Robert ve Vincent 1999).

Ovulasyon sonrası oositin yaşam süresi 12-24 saattir. Sperm hücresi ise kadın üreme sisteminde 48-72 saat canlı kalabilir (Zanaveld ve ark 1972). Kapasitasyonunu tamamlamış olan sperm hücreleri ile metafaz aşamasında bulunan sekonder oosit tuba uterinanın ampulla bölgesinde karşılaşırlar. Oositin etrafını saran ZP tabakası fertilizasyonda önemli fonksiyonlara sahiptir. ZP, oosit oolemması ile perivitellin aralık dışında ve 25 mikrometre kalınlığında hücre içermeyen ve oositi kesintisiz kuşatan bir kılıftır. Elektron mikroskopunda ZP düzgün kompakt ağısı bir yapı olarak görülmektedir. ZP türe özgü sperm için bağlanma bölgeleri içerir. Spermin penetrasyonu sonrasında ZP zona reaksiyonu geçirerek diğer sperm için geçişine mani olmakta ve bu da poliploidiyi önlemektedir (Ward ve ark 1994). Spermin ZP'ye penetrasyonunda yalnızca kuyruk değil aynı zamanda başın da hareketi gerekmektedir. Spermin başında nükleusun hemen üzerinde bir başlık gibi bulunan akrozom içerisinde akrozom reaksiyonunu oluşturan enzimler bulunur. Akrozom reaksiyonu, vezikül içeriğinin ekzositozu şeklinde gerçekleşmektedir. Akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi için spermin ZP'ye bağlanması gerekmektedir. Bu olayın gerçekleşmesini sağlayan faktörün ZP'de bulunan glikoprotein yapıdaki sperm reseptörü olduğu sanılmaktadır. ZP'de oosit tarafından sentezlenmiş ZP1, ZP2, ZP3 glikoproteinleri bulunmaktadır. Sperm bunlardan ZP3'e bağlanmakta olup, ZP2 de akrozomal reaksiyonun ardından polispermının önlenmesinde görevlidir. ZP3 geni sadece büyüyen oositte eksprese edilip aynı zamanda türler arasında farklılık göstermektedir (Swann 1996).

Spermin ZP'ye bağlanabilmesi için spermde bulunan türe özgü glikoprotein molekülün tanınması gerekmektedir. Bağlanma gerçekleşince ardından akrozom reaksiyonu başlar, Protein Kinaz C de sperm akrozom reaksiyonu için gerekli bir basamak olup sperm proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar. Sperm ZP'yi geçtikten sonra perivitellin aralığa girer. Oosit membranı sperm başını sararak oosit ve sperm füzyonu gerçekleşir. Bu füzyonda görev alan sperm başında lokalize çeşitli proteinler vardır. PH-20 proteini ZP'ye bağlanmaya yardım eden aynı zamanda hyaluronidaz aktivitesi ile kumulus hücrelerinin ayrışmasını sağlayan bir proteindir. Diğer protein ise fertilizasyonda görev alan PH-30 proteindir. Oosit plazma membranı ile spermin iç akrozom membranı füzyona uğrar. Sperm hücresi, baş ve kuyruğu ile birlikte

sekonder oositin sitoplazması içine girer. Sperm girer girmez zona reaksiyonu denilen ve diğer spermilerin geçişine izin vermeyen bir olay meydana gelir. Bu olay sekonder oositin sitoplazmasındaki kortikal granüllerin salgılarıyla şekillenir ve sekonder oosit, haploid kromozomlu ovuma dönüşür (Speroff ve Fritz 2011). İkinci mayoz bölünmesi tamamlandıktan sonra oluşan nükleusa pronükleus adı verilir. Bu anda baş kısmı önde ve kuyruk arkada olmak üzere ovuma girmiş bulunan sperm hücresinde bir takım değişiklikler belirmeye başlar. İlk önce kuyruk diğer kısımlardan ayrılır. Bundan sonra baş ve boyun 180°'lik bir dönüş yaparak boyun önde ve baş arkada olmak üzere oosit içerisinde ilerler. Bu anda baş içinde bulunduğu sitoplazmadan su emerek şişer ve en sonunda gevşek kromatinli bir nükleus halini alır. Bu şekilde yeniden oluşmuş bulunan bu nükleusa erkek pronükleus adı verilir. Her iki pronükleusun birbirine değip kaynaşmasından sonra döllenme gerçekleşir ve zigot oluşur. Zigot oluşumunu takiben bölünmeler başlar (Çetin 2000).

Ovulasyonun gerçekleşmesi için gonadotropinlerin preovulatuvar artışını izleyen iki önemli olay gerçekleşmektedir:

1. Oositin mayotik maturasyonunun tamamlanması,
2. Oositin etrafındaki kumulus hücrelerinin gelişimi.

Kumulus hücrelerinin morfolojisinde bir değişim meydana gelir. Bu değişiklik hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve başlıca aktin mikrofilamentlerinin toplanmasını içeren geniş kapsamlı değişikliklerdir. Bu değişimi hyaluronik asitçe zengin ekstrasellüler matriks sentezinin artışı ve kumulus hücreleri ile oosit arasındaki neksus tipi bağlantıların değişimi izler (Emery ve ark 2001; Zhuo ve Kimata 2001). Bu gelişimle ovulasyon sırasında foliküllerden oosit-kumulus kompleksinin salınmasının kolaylaştırılması, oviduktal fimbriyalar tarafından yakalanması, oviduktardan geçiş ve ovule olmuş oositin oviduktarda canlılığının korunması sağlanır. Kumulus hücrelerinin gelişmesi; ayrıca, sperm aktivasyonu ve motilitesi için uygun dış şartların oluşumuna katkı sağlar (Prochazka ve ark 2003).

Oositi çevreleyen kumulus hücreleri arasındaki ekstrasellüler matriksin temel maddesinde bulunan hyaluronik asit (HA) fertilizasyonda matür spermin oosite ulaşması sürecinde bir labirent sistemi oluşturarak kumulus hücrelerini birarada tutar (Petersen ve ark 2010). Hyaluronik asitin doğal fertilizasyon sürecinde fertilizasyon kapasitesi yüksek sperm seçiciliğinde rol oynadığı yönünde ilişkilendirilen mekanizmalar, yapılan çalışmalarla kanıtlanarak, hyaluronik asitin “Fizyolojik ICSI” uygulamalarında sperm seçici olarak kabul görmesini sağlamıştır (Balaban ve ark 2003; Esfahani ve ark 2008; Parmegiani ve ark 2010a).

Hyaluronik asit, ticari olarak plastik kültür kabında hyaluronat mikro damlacıkları bulunan hazır ICSI tabağı şeklinde ya da hyaluronat içeren visköz medyum olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda HA'nın klinik olarak embriyo kalitesi ve implantasyon başarısı üzerine olumlu etkileri tespit edilmiştir (Parmegiani ve ark 2010b). ICSI uygulamaları sırasında hyaluronatın etkin şekilde sperm motilitesini azalttığı, manipülasyon kolaylığı sağlayarak spermin pipete yada ICSI tabağına yapışmasını önlediği, ayrıca ICSI sonrası zigot gelişimi üzerine zararlı etki göstermediği tespit edilmiştir (Balaban ve ark 2003). Hyaluronik asitin, fertilizasyon potansiyeli yüksek sperm seçimini sağlayarak, embriyo kalitesi ve implantasyon oranı artışında anlamlı derecede etkin olduğu ve lizozomal enzimlerce sindirildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Parmegiani ve ark 2010b; Kato ve Nagao 2012).

2.7. Hyaluronik Asit

2.7.1. Tarihçe

Hyaluronik asit, 1934 yılında Meyer ve Palmer tarafından sığır vitroz humöründen elde edilmiştir. 1986 yılında Balazs ve arkadaşları tarafından HA'ya alternatif olarak hyaluronan ismi önerilmiştir. Günümüzde geçerli hyaluronan preparatı sodyum tuzu şeklindedir (Meyer ve Palmer 1934; Abatangelo ve O'Regan 1995). Meyer tavuk ibiğinden, Kendall ve arkadaşları bakterilerden HA'yı izole etmişlerdir (Iwata 1993).

2.7.2. Hyaluronik Asit'in Özellikleri

HA, N-asetil glukozamin ve glukuronik asitten oluşan disakkarit birimlerinin herhangi bir dallanma göstermeden 12500 kez tekrarlanması ile meydana gelen negatif yüklü ~5 milyon dalton molekül ağırlığında bir glikozaminoglikandır (Peyron 1993; Abatangelo ve O'Regan 1995; Murray ve ark 2003). HA'nın molekül ağırlığı, elde edildiği yer ve hazırlanma tekniğine göre değişir. Genelde 10×10^5 Dalton (Da) civarındadır. Suda çözünen HA çok viskozüdür. Viskoelastisitesi, molekül ağırlığına, konsantrasyonuna, pH'sına ve iyon gücüne bağlı olarak değişmektedir (Iwata 1993). HA, asit veya alkali muamelesi ile depolimerizasyona uğrar. Divalan katyonlar askorbik asit ve sistein gibi indirgeyici ajanlar tarafından kısmen parçalanır. X ışınları, γ ışınları, ultraviyole ışınları, ultrasonik dalgalar depolimerizasyonuna neden olur. Hyaluronidaz ve kondroitin sülfataz ile enzimatik olarak parçalanabilirler (Iwata 1993).

2.7.3. Hyaluronik Asit'in İşlevleri

HA'nın fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak membran reseptörleri aracılığı ile değişik hücrelerle etkileşime girebilme yeteneği vardır. Hyaluronik asit, proteoglikan organizasyonu, doku hidrasyonu, hücre motilitesi, doku proliferasyonu, embriyonik gelişim, hücre diferansiyasyonu, malign progresyonu ve metastazı, yara iyileşmesi ve anjiogenez gibi birçok farklı süreçlere katılmaktadır (Abatangelo ve O'Regan 1995; Erickson ve Stem 2012).

HA, ekstrasellüler matriksin (ECM) su ve diğer makromoleküler komponentleri ile etkileşebilir. Su dengesi, yağlama, viskozite, matriks düzenlenmesi gibi olaylar HA ile bağlantılıdır (Balazs ve Denlinger 1993). HA, ECM'nin hidrasyonunu düzenlemektedir. Hidroskopiktir, ECM içinde oluşturduğu hacim kendi hacminin 1,000-10,000 katı fazladır (Bullard ve ark 2003).

Yara iyileşmesinde bağ dokusunda ilk önce HA sentez edilir. Ardından kondroitin sülfat ve kollajen sentezi olur. Mezenşimal hücrelerin kondrositlere farklılaşması HA'ya bağımlıdır. İn-vivo ve in-vitro çalışmalar, HA'nın polimorfonükleer hücrelere, fagositoza, kemotaktik cevaba etkileri olduğunu göstermektedir (Larsen ve ark 1992; Iwata 1993; Abatangelo ve O'Regan 1995).

Yüksek moleküler ağırlıkta ve moleküler yapısı yoğun bir şekilde polimerize iken biyolojik işlevi maksimum düzeydedir. Düşük molekül ağırlıklı HA oligomerleri anjiogenez dışında önemli değildir (Iwata 1993). Kayganlaştırıcı olması, HA'nın en önemli özelliklerinden biridir. HA, ağırlığının çok üzerinde yük taşıyan diz eklemi üzerindeki baskıyı azaltarak hareketin gerimini absorbe eder ve eklemin kayar gibi hareketini sağlar (Iwata 1993; Abatangelo ve O'Regan 1995).

Ekstrasellüler matriks bileşenlerinin birikimi; doku hasarı işaretlerindedir. HA, doku hasarı, doku onarımı ve yara iyileşmesi sırasında aktif olarak üretilir. HA fragmentleri, hasarlı bölgedeki çeşitli bağışıklık hücrelerinin varlığı ile inflamatuvar genlerin ekspresyonunu uyarır. HA ve bağlayıcı proteinleri, inflamatuvar hücre toplanmasının düzenlenmesi yoluyla doku hasarı ve onarımı, inflamatuvar sitokinlerin salınımı ve kök hücre göçü ile inflamasyonu regüle ederler (Jiang ve ark 2011). İnflamasyonun HA ile regülasyonu, doza ve molekül büyüklüğüne bağlıdır. Süperoksit ve peroksinitrit, HA'nın kimyasal parçalanmasına neden olmakta ve düşük moleküler ağırlıklı HA, inflamatuvar süreci uyarabilmektedir (Jiang ve ark 2007; Osterholt ve ark 2012). HA yıkım ürünleri, inflamatuvar hücrelerin hasarlı alana göçünü modüle eden ve doku hasarını gideren kemokinleri ve sitokinleri üretmesi için inflamatuvar hücreleri uyarabilmektedir (Jiang ve ark 2007).

Genel olarak, yüksek moleküler ağırlıklı HA normal sağlıklı dokularda meydana gelmektedir. Diğer taraftan parçalanmış HA, yüksek derecede inflamatuvar, anjiogenik, immün uyarıcı ve stres altındaki dokuların bir yansımasıdır. Büyük HA polimerleri ise aksine, antiinflamatuvar, antianjiogenik ve immünsupresiftir (Erickson ve Stem 2012).

1 mg/ml ya da daha yüksek dozlardaki HA, inflamatuvar hücre kemotaksisini, fagositoz ve solunum patlaması aktivitesini ve aynı zamanda elastaz salınımını inhibe etmektedir. Ayrıca HA romatoid ve osteoartritte ve kulak zarı perforasyonunun tamirinde antiinflamatuvar ve antifibrotik ajan gibi davranmaktadır. Buna ek olarak, HA kutanöz yara iyileşmesini hızlandırır ve intra-abdominal cerrahi sonrası adezyon oluşumunu azaltır. HA; miyokard infarktüsü gibi inflamatuvar durumlarda oldukça artmaktadır. Ayrıca miyokard infarktüsünün hyaluronidaz

tarafından HA'nın parçalanması ile erken tedavisi, azalmış miyokardiyal fibrozis ve infarktüs boyutu ile sonuçlanmıştır (Osterholt ve ark 2012).

Özgül Ağırlık: HA'nın yoğunluğu: 30 - 200 kg/m³ (su= 1).

Hyaluronik Asit Kaynakları

HA, dietlerde ölçülebilir miktarda yoktur. HA alımı sadece sentetik HA'nın enjeksiyonu yoluyla gerçekleşir. Bu; diz problemlerinde, yara iyileşmesi ve kozmetik cerrahide yaygın olarak kullanılır. Son zamanlardaki çalışmalarda pahalı sentetik enjeksiyonlardan ziyade oral yol ile alınan HA bulunmuştur. HA, çoğunlukla otçul hayvanlarda bulunur. Onların beslenme şekli, vücutlarında HA sentezini artırır.

Soya fasulyesi, vücuttaki östrojen seviyesini artırır, bu durum da HA seviyesinin artmasına yol açar. Magnezyum, HA sentezi için önemlidir. Magnezyum azlığı, düşük HA seviyelerine sebep olur. Ispanak, yeşil fasulye, brokoli, karnabahar, kuşkonmaz, patates, marul ve havuç gibi soya fasulyesi de magnezyum bakımından zengindir. Magnezyumdan zengin meyveler, elma, muz, çilek, domates, avokado, ananas, portakal, papaya, kavun, şeftali ve armuttur.

Fasulye, barbunya, börülce ve mercimek gibi bakliyalarda magnezyum bakımından zengindir. Yer fıstığı ve badem de aynı zamanda magnezyum içerir.

Düşük çinko seviyelerine sahip bireylerde HA oranı da düşük bulunmuştur. Genellikle sığır, kuzu, domuz ve tavuk eti gibi proteinden zengin yiyeceklerde bulunmaktadır. Sebzelerde en iyi çinko kaynağı kabak çekirdeğidir. Maya, yerfıstığı, fasulye ve tüm tahıllar gibi patates de aynı zamanda iyi bir çinko kaynağıdır. (Sridevi ve ark 2012)

2.7.4. Hyaluronik Asit'in İnsan Vücutundaki Dağılımı

HA, ekstrasellüler matrikste hemen her yere dağılmış bilhassa bağ dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. İnsan vücutundaki total HA miktarı 12 g'dır ve umbilikal kord, sinovial sıvı (3500 mg/l) ve vitröz humor (200 mg/l)'da yüksek konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek miktar deridedir (7 gr). Diz eklemine 4-8 mg'dır (Balzas ve Denlinger 1993). Akciğer, böbrek, beyin ve kasta dikkate değer

miktarlarda bulunmakla birlikte, karaciğerde çok az miktarda bulunur. En düşük konsantrasyon, kan serumunda bulunmuştur (Fraser ve ark 1997). Hyaluronik asit endüstriyel olarak da gram (+) bakteri olan Streptococcus Zooepidemicus'tan elde edilir (Pierre 2004). HA, ekstrasellüler matriksin küçük bir kısmını oluşturmasına rağmen yapısal korunmayı sağlaması bakımından oldukça önemlidir. Bu nedenle de non-alerjiktir. Dermal skaffold, kırıkta defekti, glial hücre kültürü ve hatta sperm motilite değerlendirmesi gibi çok farklı klinik uygulamalarda HA kullanılmaktadır (Price 2007).

2.7.5. Hyaluronik Asit'in Fertilizasyon ile İlişkisi

HA; insan oositinin etrafındaki kumulus hücre matriksinin ana bileşenlerinden bir tanesidir (Johnson ve ark 2005). Oogenez sırasında primer folikül oluşumundan sonra stratum granulozum tarafından salgılanan foliküler sıvı artarak sekonder folikülü oluşturur. Sekonder folikül büyüdükçe oosit kenara itilir ve etrafındaki granuloza hücreleri lümene doğru uzanarak kumulus ooforusu oluştururken, oositi çevreleyen granuloza hücreleri de korona radyatayı oluşturur. Foliküler gelişim devam ederek tersiyer folikül oluştuğunda korona radiata ve kumulus ooforusu oluşturan granuloza hücreleri intersellüler ortama hyaluronik asit ve proteoglikanlardan zengin bir sıvı salgırlar (Opiela ve ark 2014).

Spermatogenez sırasında seminifer tübüllerdeki immotil sperm, epididimise geldiklerinde androjen bağımlı matürasyon evresine girerler. Matürasyon evresinde sitoplazmik membran yeniden şekillenir, sperm üzerinde de zona pellusida ve HA'ya bağlanma bölgeleri oluşur (Huszar ve ark 2007). Sperm yüzeyinde oluşan bu HA bağlanma bölgeleri spermin hem motilite kazanması hem de oosite bağlanması için gereklidir. Spermiogenezin bu son basamağında meydana gelen gelişimsel bir defekte sperm uzayarak rezidüel cisimcikler oluşturur (Clermont 1963).

Spermatogenetik süreçte oluşan hatada, plazma membranının yeniden yapılanması ve hyaluronik asit bağlanma bölgelerinin oluşmaması nedeniyle maturasyonunu tamamlayamamış sperm hücreleri oluşur. Maturasyon defekti olan bu sperm kumulus ooforusu geçip zona pellusidaya bağlanamadığından hem spontan koit hem de IVF tedavisinde fertilizasyon başarısızlığına neden olurlar. Hyaluronik asitin sperm yüzey belirteci olarak kullanılması fikri 1990'lı yılların başında Gabor

Huszar ve arkadaşları tarafından gündeme getirilmiştir. Kumulus ooforus içerisindeki HA, fertilizasyon için sperm kapasitasyonunu indüklediği gibi oosite penetrasyonu için de uygun bir mikro çevre oluşturur. Matür spermler selektif bir şekilde HA'ya bağlanmaktadır. Fertilizasyonun gerçekleşmesi için sperm-oosit bağlanmasını takiben bir dizi değişim başlar (zona pellusidaya penetrasyon, perivitellin aralığa geçiş, oolemmaya bağlanma, füzyon-oosit aktivasyonu ve dekonpensasyon). Sperm üzerinde HA bağlanma bölgesi olması aynı zamanda sperm maturasyonunu tamamladığını gösteren bir bulgudur. Bu sebeple sperm örneğinde HA bağlanma bölgeleri olan spermelerin yüksek oranlarda bulunması hastanın fertilite potansiyelini de gösterecektir. Matür spermelerin plazma membranlarının immatür spermelerden farklı olduğunun gösterilmesi ve matür sperm bu membran farklılıkları nedeniyle fertilizasyon yeteneğinin yüksek olduğunun anlaşılması, sperm maturasyonunu tespit edebilecek belirteç arayışlarını gündeme getirmiştir. Sperm maturasyon testi olarak ilk gündeme giren belirteç, sperm kreatinin kinazdır (SKK). SKK sperm maturasyonu ve fertilite potansiyelini gösteren objektif bir belirteçtir. Yapılan çalışmalarda oligozoospermik erkeklerde normozoospermik erkeklere oranla 10-20 kat artmış SKK düzeyleri tespit edilmiştir (Huszar ve ark 1988a; Huszar ve ark 1988b).

HA ile yapılan ilk çalışmalar in-vitro olarak hyaluronik asit içeren ortamda taze ve donmuş-çözülmüş ejakulatta sperm hızı, motilite ve viabiliteyi arttırdığı gösterilmiştir (Huszar ve ark 1990). Sperm motilite ve hızında meydana gelen bu artış HA'ya karşı direkt bir yanıtın sonucudur. Sperm HA ile ilk karşılaştığı anda sperm kuyruğunun hareket frekansında artış saptanmıştır. Ayrıca dansite gradient santrifüj sonrası sperm, HA içermeyen normal bir ortama dönünce sperm hızı ve motilitesi normale döner. Bu iki gözlemden yola çıkarak sperm ve HA etkileşiminin reseptör aracılı olduğu sonucuna varılmıştır (Sbracia ve ark 1997). Matür sperm selektif olarak solid durumdaki HA'ya bağlanır. Bağlanma başın akrozom bölgesinden olur. Sperm membranı; kapasitasyon veya akrozom reaksiyonu ile bozulur ise HA bağlanması oluşmaz (Huszar ve ark 2003). HA'ya bağlanan sperm canlı olup cansız olanlar HA'ya bağlanmaz. HA'ya bağlı spermelerde immaturite göstergesi olan; sitoplazmik retansiyon, persistan histon, DNA fragmentasyonu, Kaspaz3 (apoptozis belirteci) olmaz (Aitken ve ark 1994; Çaylı ve ark 2003; Huszar

ve ark 2006). Bu özellikler oldukça önemlidir. Çünkü nükleer ve sitoplazmik immatürite ve DNA fragmantasyonu spermin zigot oluşumundaki paternal kalıtımına olumsuz bir etki yapmaktadır (Borini ve ark 2006).

Matür spermin solid fazdaki HA'ya bağlanması sebebi ile sperm HA bağlanma testi geliştirilmiştir. HA bağlanma testi matür ve fonksiyonel spermi belirlemede önemli bir biyomarkır olup, günümüzde ticari kitler olarak da pazarlanmaktadır. HA bağlanma testinde; bağlı kısmın, bağlanmamış kısma oranı verilir. Sperm CK aktivitesi ile HA bağlanması arasında yakın bir negatif korelasyon saptanmıştır (Aitken ve ark 1994). Bu da HA'ya bağlanan spermin matür sperm olduğu görüşünü desteklemektedir (Huszar ve ark 2003).

2.7.6. Hyaluronik Asit'in Biyosentez ve Metabolizması

HA, karaciğerde metabolize olur (Murray ve ark 2003). HA sentezi plazma membranında gerçekleşmektedir. Markowitz ve Dorfman, ilk olarak streptokok membranını kullanarak HA sentezlemiştir (Abatangelo ve O'Regan 1995). Daha sonra Prehm, HA zincir büyümesinin ekstrasellüler ortamda olduğunu ve golgi aparatında sentezlenmediğini göstermiştir (Prem 1993).

HA sentezleyen 3 farklı hyaluronan sentetaz (HAS1, HAS2, HAS3) vardır (Weigel ve ark 1997; Tammi ve ark 2002). Bunlar plazma membranının iç yüzeyinde HA sentezleyen multipl transmembran bölgedeki enzimlerdir. Sentez sırasında polimer zincir büyüyerek perisellüler bölgeden membranın içine doğru uzanır. Bu, diğer glikozaminoglikanların sentez şeklinin aksine normal ekzositotik mekanizmalarla salgılanan ve golgi cisimciğinde bir proteoglikan oluşturmak için kor proteiniyle bağ oluşturmaktadır. Ekstrasellüler matrikste HA bağlayan ve hyaladerin denilen proteinler tanımlanmıştır. Ekstrasellüler matrikste bu proteinlerin artması, bazı hücrelerin davranışlarını etkilemek için tasarlanmış bir sinyal olduğunu düşündürmektedir. Birçok doku grubunda ve hücre tiplerinde HA reseptörleri saptanmıştır. Bunlar:

CD44 Reseptörü: Vücutta geniş yayılımı olan bir reseptördür ve hyaluronik asit için hücre yüzey reseptörü olarak bulunmaktadır. CD44 aracılı hyaluronik asit; hücre etkileşimi, hücre-hücre ve hücre-substrat adezyonlarını içeren çok sayıda

fizyolojik olayda görev almaktadır. Hücrenin migrasyon, proliferasyon ve aktivasyonu ile hyaluronik asitin yıkımı CD44 aracılıdır. CD44'ün in-vivo ortamdaki biyolojik rolü birçok dokuda hala belirlenememiştir.

RHAMM Reseptörü: Hücre yüzeyinde RHAMM ekspresyonu hücre hareketleri ile ilişkilidir ve göç eden fibroblastlar ve metastatik tümör hücreleri gibi çok sayıda hareketli hücrelerde belirlenebilmektedir (Necas ve ark 2008).

HARLEC Reseptörü: HA'nın sirkülasyonunu sağlayan karaciğer endotelial reseptörü gibi reseptörlerle veya sentaz enzimiyle bağlanabilirler. İnsanda, hücrenin farklı yerinde farklı özelliklerde enzim kodlayan 6 hyaluronidaz geni vardır (Stern ve Csoka 2000). Normal fizyolojik koşullar altında, HA, polimer uzunlukları 2-25 μm , relatif moleküler kitlesi 10^6 - 10^7 arasında değişmektedir (Toole 2004). ECM'de yaygın olarak bulunur ve hücre adezyon, migrasyon, proliferasyon ve intrasellüler fonksiyonun düzenlenmesinde rol alır (Lee ve Spicer 2000; Itano ve Kimata 2002).

İnsan fibroblast kültürlerinde yapımı PDGF ve TGF- β gibi büyüme faktörleri tarafından uyarılır. Bu uyarı protein kinaz-c üzerinden gerçekleşir. Protein kinaz c'nin uyarılması da hyaluronik asit sentezini başlatır. Ancak bu uyarı protein sentezine bağlı değildir. PDGF ile uyarılan hyaluronik asit sentezi PDGF reseptörleri üzerinden gerçekleşir (Heldin ve ark 1995).

2.7.7. Hyaluronik Asit'in Yıkımı

Hyaluronik asit lenf yolu ile kana geçer, karaciğer epitel hücresinde dönüşüme uğrayarak kandan elimine edilir (Iwata 1993; Gustafson ve ark 1995). Yıkımı, hyaluronidaz enzimleri ve serbest radikaller tarafından gerçekleştirilmektedir (Jiang ve ark 2011).

Hyaluronik asitin yukarıda bahsedilen faydalarından yola çıkarak; bu çalışmamızda daha sağlıklı sperm eldesi için swim-up medyumuna eklenen hyaluronik asitin sperm morfoloji, motilite ve DNA bütünlüğüne etkisini araştırdık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamıza, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne Haziran 2014-Ağustos 2014 tarihleri arasında başvuran hastalardan WHO 2010 kriterlerine göre normospermik olanlar dahil edildi ve toplam 20 hasta 2014/645 no.lu etik kurul kararınca seçildi.

3.1. Semen Örneklerinin Hazırlanışı

Hastaların 3 günlük cinsel perhiz sonrasında alınan numuneleri Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine uygun kullanıldı. Örnekler; steril, non-toksik polypropilen kaba toplandı ve 25 dk'lık likefaksiyon süresinin ardından semen analizleri yapıldı.

Semen analizlerinde ilk önce fiziksel muayene yapılarak koku, renk, volüm ve viskozite yönünden değerlendirildi. Daha sonra mikroskopik incelemeleri yapmak için semenden alınan 10 µl'lik örnek; derinliği 0,01 mm olan Makler sayım kamarasının (Sefi - Medical Instruments) ortasına damlatılarak üzerine grid camı kapatıldı (Resim 3.1). Nikon T1A Input AC ışık mikroskopunda toplamda X200 büyütme altında değerlendirme yapıldı.



Resim 3.1: Makler Sayım Kamarası

Gridin üzerinde iki satır bir sütun veya iki sütun bir satır içerisindeki sperm hücreleri sayılarak ortalaması alındı ve böylece spermatozoa konsantrasyonu milyon/ml olarak tespit edildi.

Aynı zamanda Makler sayım kamarası kullanılarak motilite değerlendirme yapıldı. Motilite değerlendirme için 100 hücre sayıldı. Doğrusal hareket göstererek

en az 3 kareyi kat eden spermatozoaların motilitesi +4, karenin dışına çıkan ancak 1-2 kare sonra geri dönme hareketi gösteren spermatozoaların motilitesi +3, bir kare içerisinde yerinde baş veya kuyruk sallama şeklinde hareket eden spermatozoaların motilitesi +2, hiç hareket göstermeyen spermatozoaların motilitesi +1 olarak değerlendirildi (Makler 1980; WHO 2010).

Morfoloji değerlendirmesi için WHO 2010 kriterleri kullanıldı. X400 büyütmede morfolojisi sağlam ve normospermi sınıfına girenler çalışmaya dahil edildi.

3.2. Rutin ve Hyaluronik Asit Katkılı Swim-up Metodu ile Sperm Eldesi

Bu çalışma temel yıkama materyali olarak bikarbonat tamponlu Hank's Balanced Solution (Biological Industries; HBSS catalog no: 02-017-1) kullanılarak gerçekleştirildi. Hastanın likefiye semen numunesi rutin semen analizinden sonra HBSS ile 1/1 oranında karıştırılarak homojenize edildi ve 2 ayrı steril, 14 ml'lik konik tüpe (Nest; catalog no: 601002) paylaştırıldı. Örnekler (HBSS + Semen) 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet homojenize edildikten sonra 1 ml'lik ependorf tüplerine 250 µl olarak paylaştırıldı. 1. tüp için %0,5'lik HSA (human serum albumin) içeren HBSS (rutin swim-up yönteminde kullanılmaktadır), 2. Tüp için %10'luk HA (sodyum hyaluronat intra farma 32 mg/2 ml) içeren HBSS tüp duvarına sızdırma yoluyla 2 ayrı tabaka olacak şekilde ilave edildi. Son olarak ependorf tüpleri %5 CO₂ içeren inkübatör içerisine alınarak sperm hücrelerinin üst tabakaya doğru yüzmesi için bırakıldı. 45 dk sonra HA ve HSA içeren yüzdürme sıvısına yüzen sperm hücrelerinden alınan örnekler makler kamarasında sayıldı.

3.3. Sperm Apoptozisinin Değerlendirilmesi (Annexin V Boyama)

Apoptozisin erken evrelerinde, sperm membranında fosfatidilserinin iç yapraktan dış yaprağa translokasyonu olmaktadır. Annexin V antikoru Ca⁺² bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteindir ve spesifik olarak eksternalize olmuş fosfatidilserin molekülüne bağlanmaktadır. Annexin V ile bağlı fosfatidilserinin vermiş olduğu floresans sperm apoptozisi için markır olarak kullanılabilir.

Spermdeki apoptozisin değerlendirilmesi için her gruptaki (HSA, HA) yüzdürme sonucu elde edilen numuneler total hücre sayısı 1 milyon olacak şekilde 1 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Arkasından Annexin-V-Fluos Staining Kit (F. Hoffmann-La Roche, catalog number: 11858777001) ile muamele edildi ve homojenize edilip 30 dk bekletildi Karışımdan her bir lama (poly L-lizin) yaklaşık olarak 45-50 µl damlatılıp üzerleri lamelle kapatıldıktan sonra Olympus BH-2 foto ataşmanlı floresan mikroskop altında karanlık ortam koşullarında incelendi. 100 hücre sayıldı ve bu hücrelerden kırmızı renkli olanlar nekrotik hücre, kırmızı + yeşil olanlar geç apoptotik hücre, yeşil renkli olanlar erken apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Boya almayan hücre grubu ise sağlıklı hücre olarak kaydedildi. Dijital ortamda mikroskopik fotoğrafları alındı

Tüm veriler elde edildikten sonra istatistikleri yapıldı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın istatistiksel analizi IBM SPSS version 22 programında yapıldı. Grupların HA miktarları ortalamalarının karşılaştırılması ve annexin sonucu elde edilen renkler arasındaki farklılıkların gözlemlenebilmesi amacıyla '*Tek Yönlü Varyans Analizi*' ya da bir başka deyişle '*One Way ANOVA*' test istatistiği kullanıldı.

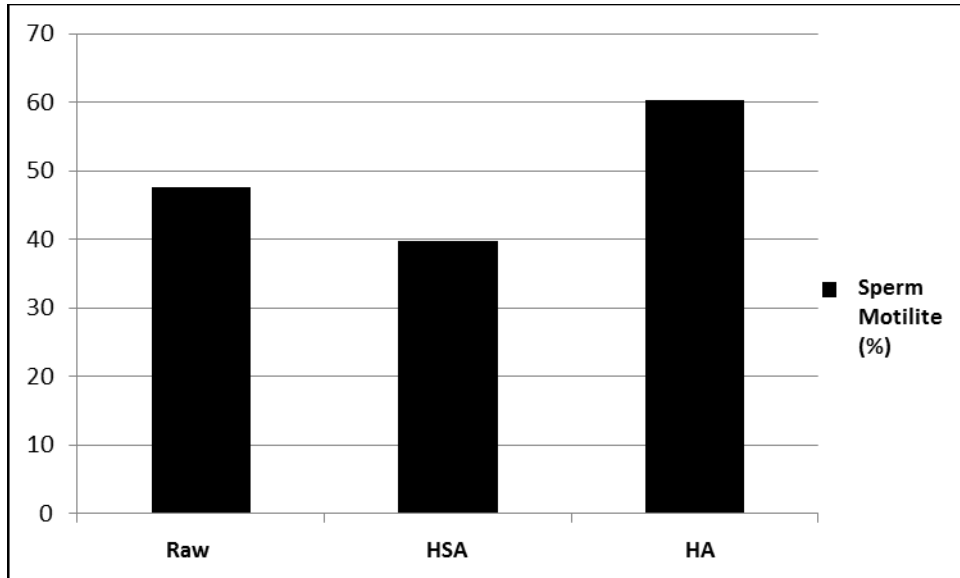
Motilite değerlendirmesi yapabilmek amacıyla, spermilerin HSA ve HA ile muamelesi sonucu yüzen hücre sayıları incelenmiştir. HA muamelesi ile daha fazla sayıda sperm hücresi yüzmesinin beklendiği bu çalışmada, HA ve HSA değerlerinin ortalamaları arasındaki farklılığın gözlemlenebilmesi amacıyla '*Bağımlı Örneklem t Testi*' ya da başka bir ifade ile '*Paired Sample t Test*' istatistiği kullanılmıştır. Veriler %95 güven aralığında incelenip, analizi çıkarılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamız Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne semen analizi için başvuran, 20 hasta ile gerçekleştirildi. Rutin semen analizleri yapılan hastalardan WHO 2010 kriterlerine göre normospermik olanlar çalışmaya dahil edildi. Semen örnekleri, 2 ayrı tüpe eşit dağıtılarak HBSS ile homojenize edildikten sonra 1000 rpm' de 10 dk santrifüje tabi tutuldu. Santrifüj sonrası örneklerin pellet kısmı ependorf tüplerine alındı ve tüplere sırasıyla; HSA ve HA içeren HBSS, tüp duvarına sızdırma yoluyla ilave edilerek 2 ayrı tabaka oluşturuldu ve sperm hücrelerinin üst tabakaya yüzmesi için %5 CO₂ içeren inkübatörde 45 dk süresince bekletildi. HSA ve HA içeren üst tabakadan alınan örnekler makler sayım kamarasında sayıldı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi (Grafik 4.1).

Sperm konsantrasyon değerlendirmesinde %10'luk konsantrasyonda HA içeren mediumda bulunan sperm hücrelerinin +3 ve +4 konsantrasyonları %0,5 HSA içeren sperm hücrelerinin +3 ve +4 konsantrasyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$).

Grafik 4.1: HSA ve HA içeren Hank's Balanced Medium içerisine yüzen sperm hücrelerinin +3 ve +4 motiliteli sperm konsantrasyon yüzdesi.



Swim-up medyumundaki spermlerin morfolojik olarak değerlendirilmeleri için örnekler Annexin V ile muamele edildi ve Olympus BH-2 foto ataşmanlı floresan

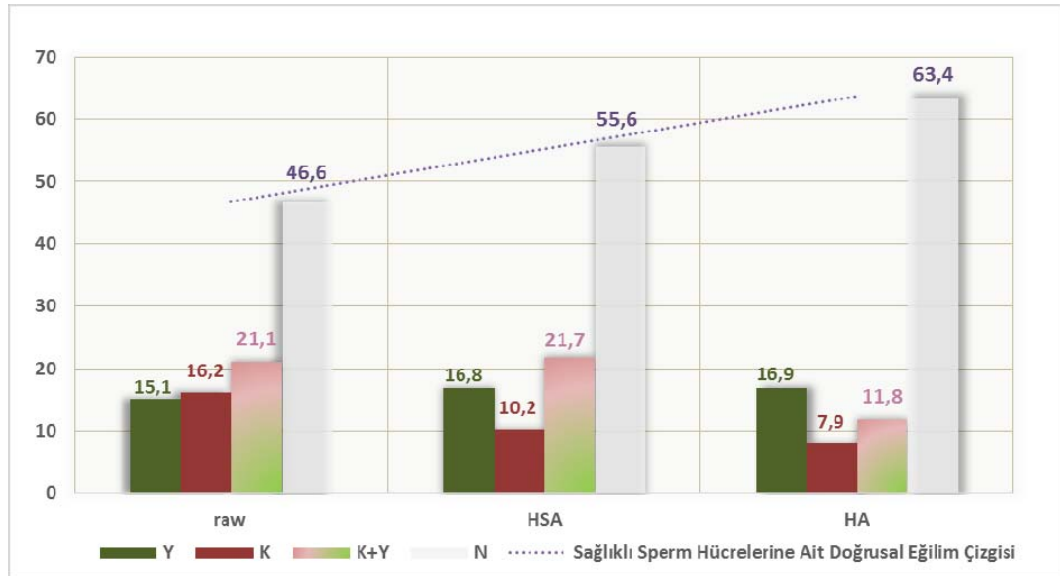
mikroskop altında incelendi (Tablo 4.1) ve fotoğraflandı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 4.1. Floresan Mikroskop altında hücre yorumlanması.

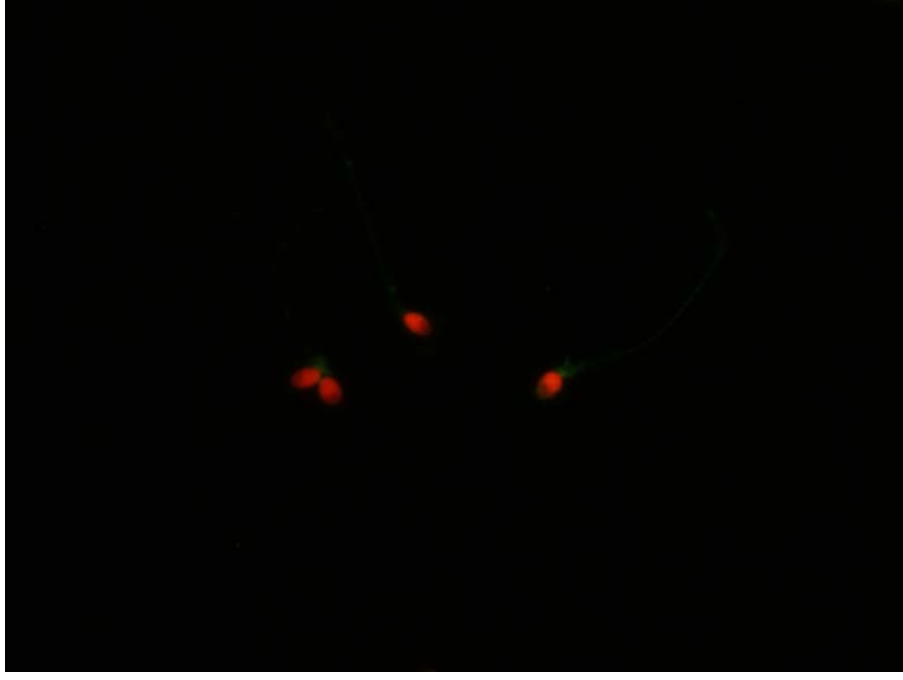
Boyanmayan	Yeşil	Kırmızı +Yeşil	Kırmızı
Non-Apoptotik Hücre	Erken Faz Apoptotik Hücre	Geç Faz Apoptotik Hücre	Nekrotik Hücre

HSA içeren mediumda bulunan sperm hücreleri HA içeren mediumda bulunan sperm hücreleri ile morfoloji bakımından karşılaştırıldı ve karşılaştırmalara semenin fresh (raw) hali de eklendi.

Grafik 4.2. Taze semenin ve HSA ile HA muamelesi sonrası elde edilen sperm hücrelerinin Annexin V ile boyanma sonrası gösterdiği morfolojik durumun yüzdesi (Y:Yeşil, K:Kırmızı, N:Normal).

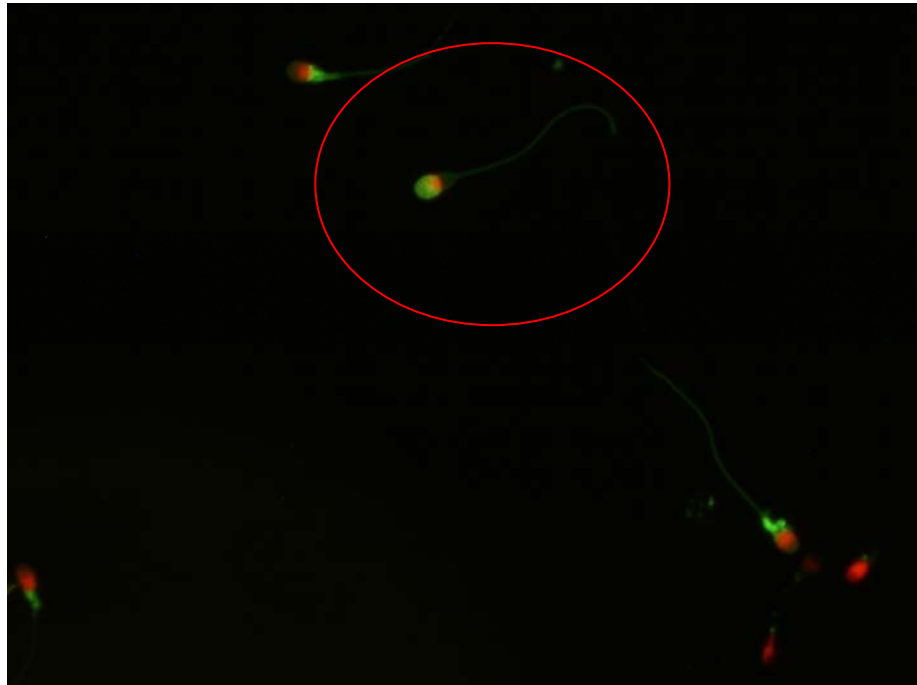


HSA içeren mediumda bulunan sperm hücreleri HA içeren mediumda bulunan sperm hücreleri ile karşılaştırıldığında HSA içeren grupta nekrotik hücre oranı HA içeren gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$).



Resim 4.1. Annexin V ile boyanmış nekrotik sperm hücreleri X400

HSA içeren mediumda bulunan sperm hücreleri HA içeren mediumda bulunan sperm hücreleri ile karşılaştırıldığında HSA içeren grupta geç apoptotik hücre oranı HA içeren gruptaki hücre oranına göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$).



Resim 4.2. Annexin V ile boyanmış geç apoptozisli sperm hücreleri X400

HSA içeren medyunda bulunan sperm hücrelerindeki erken apoptotik hücre oranı HA içeren gruptaki erken apoptotik hücre oranı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



Resim 4.3. Annexin V ile boyanmış erken apoptozisli sperm hücresi X400

Taze semen örneği ile HSA içeren sperm hücreleri apoptotik ve nekrotik hücre oranları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmezken, HA içeren grup ile taze semen örneği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir.

Annexin V kiti ile muamele edildikten sonra boyanma göstermeyen sağlıklı sperm hücreleri karşılaştırıldığında HA içeren gruptaki sperm hücreleri; taze semen örneği ve HSA içeren gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Döllenme; sperm ve yumurtanın doğrudan etkileşimi sonucu hücre membranlarının füzyonuyla beraber dişi ve erkek gametlerin birleşmesi ile gerçekleşir. Bu sürecin tamamlanması ve bunu takiben embriyo gelişimi sperm DNA bütünlüğüne bağlıdır. Kondanse sperm DNA'sı hatasız bir şekilde genetik materyalin geçişi için gereklidir. Doğal ortamda DNA hasarlı sperm yumurtayı döllemede başarısız olacaktır. Bu bize doğal olarak normal fertilizasyonda sağlam DNA bütünlüğüne sahip spermatazoanın başarılı olduğunu gösterir. Bununla birlikte YÜT'de bu seleksiyon işlemi pas geçildiği için bu da yanlışlıkla DNA hasarlı sperm kullanımıyla sonuçlanacaktır (Aktan ve ark 2011).

Rutin semen analizinde semen hacmi ve PH, sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi, sperm lökosit sayısı değerlendirilen parametrelerdir. Standart semen analizi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde standart olarak kullanılmakla birlikte bu parametreler fertil ve infertil erkeklerin kesin ayrımında yetersiz kalabilmektedir (Guzick ve ark 2001). Semen analizi değerli bilgiler vermesine rağmen gebelik elde etmede bazı sınırlamaları vardır. Daha güvenilir başka tanımlamalara gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalar, normal spermatogenez sürecinde olan, hücre ölümünün fertilité üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi üzerine odaklanmıştır (Oosterhuis ve ark 2000).

Apoptozis birçok multisellüler organizmanın hemostazisinde, diferansiyasyon ve büyümenin regülasyonunda rol oynayan önemli bir biyolojik süreçtir. Spermatogenez oldukça kompleks bir biyolojik gelişim sürecidir. Testiste spermatogenez sürecini düzenleyen ana kontrol mekanizması apoptozistir (Aitken ve Koppers 2011). Hücrel apoptozis ve nekrozis sırasında; membran fosfolipitlerinin asimetrisinin bozulması sebebiyle plazma membran bütünlüğü bozulur. Apoptozis ve nekrozis hücre ölümünün 2 önemli formudur. Nekrozis çok sayıda hücreyi etkiler ve hücre şişmesi sonrasında da ruptür ile sonuçlanır. Fakat apoptozis, programlı hücre ölümüdür ve tek bir hücreyi etkiler. Apoptozis; kromatin ve sitoplazma agregasyonu ve bu sürecin ilk basamaklarında meydana gelen plazma membran asimetrisinin bozulması dahil olmak üzere çeşitli

ultrastrüktürel ve biyokimyasal değişiklikle karakterizedir. Normalde; plazma membranının iç sitoplazmik membranında fosfotidilserin bulunur. Apoptozis sırasında, PS, dış tabakaya geçer. Bu durum; PS translokasyonu olarak bilinir ve membran stabilitesinin bozulduğunun bir işaretidir ve Ca^{+2} bağımlı bir şekilde annexin V ve propidyum iyodid hücreye bağlanma yeteneği artar. Annexin-V ve propidyum iodid sperm viabilitesinde bir markır olarak kullanılır. Özellikle DNA için propidyum iodid ve PS translokasyonu için Annexin V kullanılır (Bukowska ve ark 2011).

İnfertil hastaların testis biyopsilerinde yüksek oranlarda apoptozis olduğu TUNEL yöntemi ve morfometrik çalışmalarla ortaya konmuştur. Yeni yapılan çalışmalarda ise, infertil hastaların ejakülat spermelerinde apoptozisin tipik göstergeleri olan DNA parçalanması (TUNEL yöntemi) ve fosfotidilserinin plazma membran translokasyonu (AnneksinV/propidyum iodid yöntemi) saptanmıştır. Bu belirleyicileri rutin semen analizleri ile göstermek olası değildir ve bu spermeler normal olarak değerlendirilip, ICSI yöntemi ile oosite enjekte edilirse hasarlı genomdan dolayı ciddi sorunlara yol açabilir (Weng ve ark 2002).

Sperm DNA hasarı ve apoptozis erkek fertilitésinin değerlendirilmesinde önemli bir belirteçtir (Hoogendijk ve ark 2009). Sperm hücrelerinin apoptozisi erkek infertilitési ile ilişkilidir ve infertil erkeklerden alınan testiküler biyopsilerde daha yüksek apoptotik sperm oranı görülmüştür (Oosterhuis ve ark 2000). Testiste spermatogonium, spermatosit ve spermatidlerde yoğun apoptotik faktör aktivasyonu gösterilmiştir (Bubenik 2009).

Çeşitli iç ve dış nedenlerden dolayı DNA'da farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. Sperm DNA'sı hasarına insan, fare, at, domuz, balık gibi pek çok türde rastlanmaktadır. DNA'da oluşan bu hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonunun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları, DNA'da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır. ROS (reaktif oksijen türleri)'un sebep olduğu DNA hasarı hücrelerin apoptozisini

hızlandırmaktadır. Bu da infertiliteye sebep olan sperm sayısının azalması ile ilgili olarak, üreme üzerine olumsuz bir etki yapmaktadır (Türk ve ark 2006).

Sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneğini incelemede ve fonksiyonel spermlerin seçilmesinde apopitotik markırlar kullanılabilir. Annexin V ile boyanma, kaspaz aktivitesinde artış, DNA fragmentasyonu sperm viabilitesinin ve fertilizasyon yeteneğinin değerlendirilmesinde önemli markırlardır. Düşük motiliteli spermler daha fazla kaspaz aktivitesine ve fosfotidilserin eksternalizasyonuna sahiptirler. Benzer şekilde düşük motiliteli spermlerde DNA fragmentasyonu saptanmıştır (Shaha ve ark 2010). Ejakülat semeninde sperm viabilitesi ve motilitesi ile apopitotik sperm oranı arasında anlamlı ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Marchetti ve ark 2002; Taylor ve ark 2004).

Chen ve arkadaşlarının 23 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada apopitotik sperm oranı ile sperm motilitesi ve morfoloji arasında ters bir ilişki saptanmış iken, apopitotik sperm oranı ile sperm kuyruk defektleri arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır ve ejaküle semende apopitotik sperm oranı ile semen kalitesi ilişkili bulunurken (Chen ve ark 2006) Shen ve arkadaşları, sperm apopitozisi ile sperm motilitesi arasında ters ilişki ve apopitotik değişiklikler ile anormal morfolojili sperm oranı arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır (Shen ve ark 2002). Varum ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, seminal parametrelerin DNA hasarı ile ters ilişkili olduğu gösterilirken (Varum ve ark 2007), Kotwicka ve ark'nın 28 normospermik hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada, hareketli sperm subpopulasyonu ile fosfotidilserin translokasyonu gösteren sperm subpopulasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu bulunmuştur (Kotwicka ve ark 2013). Ancak Perticarari ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada, fosfotidilserin translokasyonu gösteren sperm oranı ile progresif hareketli sperm oranı arasında bir ilişki gözlemleyememişlerdir (Perticarari ve ark 2007). Hao-Bo Zhang ve arkadaşları ise araştırmalarında 58 hasta semeni çalışmışlar ve erken apopitotik markırlara sahip spermler ile sadece sperm motilitesi arasında negatif bir ilişki saptamışlardır (Zhang ve ark 2008). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da ejakülat spermindeki apopitozisi ile sperm motilitesi negatif bir korelasyon göstermiştir. Aynı zamanda sperm morfolojisinin apopitozisi sebebiyle bozulduğu istatistiksel olarak kanıtlanmıştır.

Düşük motiliteli spermere sahip kişilerde yüksek motiliteli sperme sahip kişilere göre apoptozis belirteçlerinin daha sık görüldüğü de bildirilmiştir (Weng ve ark 2002).

YÜT; sperm, yumurta veya embriyonun in-vitro manipülasyonunu gerektiren işlemlere verilen genel bir terimdir. Spermin hazırlanması aşamaları mikroenjeksiyon sonuçları üzerinde etki etmektedir. İnsan spermi hazırlamadaki geleneksel tekniklerden birisi de 'swim-up' yöntemidir. Swim-up yönteminin in-vivo sperm seleksiyonuna benzerlik göstermesi, düşük dekonpanse oranlarına sahip olması, daha az zaman alması ve laboratuvar yükünü hafifletmesi gibi avantajları vardır (Aktan ve ark 2011).

İnsan yardımcı üreme teknikleri üzerine bilimadamları ve klinisyenler androlojik sonuçları arttırmak için değişik sperm hazırlama teknikleri geliştirmişlerdir. İlk sperm hazırlama metodu erkek germ hücrelerinin 1 ya da 2 kez yıkanması şeklindeydi. Sonrasında hücre pelletinden swim-up prosedürü adı altında tek bir teknik kullanıldı. Daha sonraları daha sofistike metotlar geliştirildi ve yeterli sayıda, motil ve gelişimini tamamlamış sperm hücreleri separe edilmeye başlandı. Sonuçta; motilite ve sperm fonksiyonlarının korunduğu, çevresindeki reaktif oksijen türevleri gibi zararlılardan arınmış sperm hücreleri elde etmek için değişik teknikler kullanıldı. İn-vivoda; potansiyel olarak fertil sperm hücresi; kadın genital yolları içinde servikal mukus aracılığıyla aktif migrasyonla immotil sperm, debris ve seminal plazmadan ayrılır. Bu süreç sırasında hem motil progresif olan sperm seçilir hem de akrozom reaksiyonu ile ilgili olan ve spermin fonksiyonel olgunluğunu sağlamak için temel gereksinim olan kapasitasyon adı verilen fizyolojik değişiklik meydana gelir (Henkel ve Scill 2003).

IVF programlarında; oosit toplama, embriyo kültürü, sperm hazırlama ve embriyo transferi için ticari olarak hazırlanmış medyumlar kullanılır. Son zamanlarda HTF (human tubal fluid), basit tuz solüsyonları yerlerini daha kompleks medyumlara bırakmışlardır. IVF'in başlangıcından bu yana kültür medyumlarını optimize etmek için protein desteklemesi yapılır. Plazma proteinlerinin fizyolojik fonksiyonları ve osmotik regülasyonda doğrudan etkili olduğu kanıtlanmıştır. Proteinler aynı zamanda enerji kaynağı olarak, hormon, metal, iyon ve vitaminlerin

serbestleşmesi için depo olarak kullanılırlar. Bu gelişmiş medyumlar protein ve diğer makromolekülleri (büyüme faktörleri, maternal ya da kord serum, sığır ya da insan albumini) içerir. Dişi üreme yollarında oldukça bol miktarda bulunan albumin, in-vitro embriyo gelişimi için kullanılan kültür medyumunun ana makromolekülü olarak kullanılır Günümüzde ticari IVF medyumlarının çoğu HSA içerir ya da HSA sonradan ilave edilir (Mahani ve Davar 2007; Meintjes ve ark 2009).

Ek olarak, albumin; viskosite ve kayganlaştırıcı özelliği ile kültür medyumunu içerisinde embriyonun kültür kabına yapışmasını önler ve kolayca taşınmasını sağlar. Kültür medyumlarında kullanılan albumin özellikle fetal kord serumu, ticari olarak satılan HSA, hastanın kendi serumu ve son zamanlarda kullanılan rekombinant HSA'dır. Kandan elde edilen albuminin kullanımının; virüs ve prionlar yoluyla hastalık bulaşma olasılığını arttırdığı belirtildi. Bu nedenle, embriyo büyüme ve gelişmesini korumada ve kandan elde edilen albuminin başarılı bir şekilde yerini alacak başka makromoleküller için araştırmalar yapılmıştır. Polivinilpirolidon, polivinilalkol ve hyaluronik asit gibi birçok makromolekül çalışılmıştır. Polivinilpirolidon ve polivinilalkolün tamamıyla açıklığa kavuşmamış teratolojik özellikleri yardımcı üremede kullanılmaları konusunda endişeleri arttırmıştır. Aksine hyaluronik asit, glikozaminoglikan ailesi ile ilişkili olup insan vücut sıvısında ve ekstrasellüler matrikste bol miktarda bulunan doğal bir makromoleküldür (Simon ve ark 2003).

Hyaluronik asit, ilk defa Meyer ve Palmer tarafından keşfedilmiştir. β -1-3 ve β -1-4 glikozidik bağları ile bağlanmış N-asetil- D glukozamin ve D-glukuronik asitten oluşan lineer anyonik bir polisakkarittir. Biyoyumlu ve biyobozunur bir yapıdadır ve omurgalıların dokularında ve biyolojik sıvıların hemen hemen tamamında bulunduğundan daha az istenmeyen immün cevaba sebep olur. Bu durum da ilaç uygulamalarında umut verici bir polimer olduğunu gösterir (Water ve ark 2014).

Hyaluronik asit, üreme sistemi dahil olmak üzere dokularda bol miktarda bulunan doğada doğal olarak meydana gelen bir makromoleküldür. HA, diğer glikozaminoglikan ve proteoglikanlar gibi ekstrasellüler matrikste bulunur ve matriks formasyonu, hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonu, hücre proliferasyonu, hücre

migrasyonunu düzenler. Büyüme faktörleri için ko-reseptör aktivitesi gösterir. HA'nın fiziksel özellikleri ve biyolojik aktivitesi düşünüldüğünde bu makromolekülün insan kültür medyumunda albumin ile yer değiştirebileceği şaşırtıcı değildir (Simon ve ark 2003). Biz de çalışmamızda rutinde kullanılan albümin ve diğer makromoleküllerin olası zararlı etkilerini gözönüne alarak ve HA'nın biyolojik aktivitesini düşünerek HA kullanmayı tercih ettik.

Şimdiye kadar DNA hasarı olmadan ya da en aza indirilerek daha sağlıklı sperm seçimi için farklı metotlar kullanılmıştır. Jakab ve ark (2005) hyaluronik asit kullanarak ICSI işlemi sırasında daha sağlıklı sperm elde ettiklerini yani kromozomal anomalilerin azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada immatür sperm hücrelerinin daha düşük HspA2'ye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu düşüş ise, bozuk sitoplazmik membran remodellingine ve sperm HA'ya bağlanamamasına sebep olmuştur.

HA in-vivo fertilizasyonda önemli rol oynayan ve oositin etrafındaki kumulus hücrelerinin ekstrasellüler matriksinde bulunan lineer bir polisakkarittir ve sperm seçiminde HA'nın kullanım amacı, kumulus matriksinin ana bileşeni olması ve maturasyonda önemli bir rol oynamasıdır. HA'ya tutunan sperm maturasyonunu tamamlamış olduğu bilinmektedir. HspA2 proteininin ekspresyonu sperm maturasyonunun göstergesidir. Ayrıca sitoplazmik membran yenilenmesi zona pellusidaya tutunması için sperm bağlanma bölgelerinin formasyonunu sağlar (Petersen ve ark 2010).

Prosedürüne destekleyici bir madde eklenmiş değişik swim-up metotları vardır. Bunlardan biri hyaluronik asitin ilavesidir. Rutin swim-up tekniği ile karşılaştırıldığında semenden direkt HA içeren swim-up medyumuna doğru yüzen motil sperm sayısı daha yüksek çıkmıştır. Ayrıca klinik IVF programındaki gebelik oranları da yüksektir. Hyaluronik asit sperm hücresi içerisine Ca^{+2} alınımını arttırmakta ve akrozom reaksiyonunu indüklemektedir. Böylece kumulus hücrelerinin yüksek HA konsantrasyonları akrozom reaksiyonuna katkıda bulunmaktadır (Henkel ve Scill 2003).

Biz de çalışmamızda hyaluronik asitin faydalarından yola çıkarak rutinde kullanılan HSA yerine HA kullandık. Sperm hazırlama yöntemlerinden swim-up metodunu seçerek hazırlanan sperm hücrelerinde morfoloji ve motiliteyi değerlendirdik.

İlginç olarak; hem insan hem de sığır embriyolarının blastosist basamağına kadar gelişmeleri sırasında hyaluronan yüzey reseptörlerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Dahası, hyaluronik asitin fare embriyolarının implantasyonu sırasında konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. Ek olarak hyaluronan; sperm hazırlama medyumlarına eklendiği zaman sperm motilitesini artırır ve taze semen yada donmuş/çözünmüş insan sperminin inkübasyon süresi boyunca motilitesini korur (Mahani ve Davar 2007).

Medyuma ilave edilmiş hyaluronik asit; donmuş-çözünmüş spermin yanı sıra taze ejakülatta da motilite ve viabiliteyi korur, aynı zamanda spermin hızını artırır. Hyaluronik asite cevap olarak spermin motilite ve hızının artması ile ilgili 2 gözlem vardır: HA'ya maruz kalan spermin 1) hızında ve 2) kuyruk dönme frekansında ani artış gözlenir. Eğer HA'ya bağlı spermeler standart medyuma transfer edilirse motilite özellikleri eski haline döner. HA; spermeleri, reseptörler aracılığıyla etkiler. Bu reseptörler çeşitli çalışmalarla da doğrulanmıştır (Huszar ve ark 2003).

Bilindiği üzere memeli spermi özellikle morfoloji, motilite ve viabilite bakımından yüksek bir heterojenite ile karakterizedir. Normal morfolojik görünümlü, motilite ve viabilitesi yüksek sperm hazırlamak için çeşitli teknikler vardır. Sperm hazırlama prosedürleri non-motil spermelerden motil spermeleri ve defektli spermelerden morfolojik olarak normal spermeleri ayırır. Ayrıca seminal plazmayı uzaklaştırır. En önemli sperm hazırlama yöntemleri dansite gradient santrifügasyon ve swim-up teknikleridir. Sperm hazırlama metotlarının etkinliği semen parametrelerinin farklılıklarına göre çeşit çeşittir (Bukowska ve ark 2011).

Spermin HA'ya bağlanması, o spermin gelişmiş maturitesini, kromozomal hasarının azlığını ve DNA bütünlüğünün yüksekliğini gösterir. Spermin fertilizasyon yeteneğini predikte eder (Carine ve ark 2013).

Sperm HB (Hyaluronik Asite bağlanma) testleri; ticari diagnostik kit olarak, spermin maturasyonunu ve fonksiyonunu değerlendirmek için geliştirilmiştir. Bu test, HA'nın matür ve akrozom reaksiyonu tam olan sperme bağlanması esasına dayanır. Bilindiği üzere HA'nın doğal sperm seçici özelliği vardır. Ekstrasellüler matriks, güçlü bir bariyerdir. HA'ya bağlanan ve sindiren spesifik özelliklere sahip tek bir sperm hücrenin geçişine izin verir. Sperm zona pellusidaya ulaşır ve penetre olur. Sonrasında oositi fertilize eder (Carine ve ark 2013).

Huszar ve ark (2003) yaptıkları bir çalışmada HA'ya bağlı spermin gelişmiş bir sperm maturitesi ve yüksek sperm DNA integritesi ile birlikte, tam bir akrozoma, matür bir nükleusa ve iyi bir morfolojiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu; aynı zamanda HA'ya bağlanan spermin, matür olduğunu, plazma membran yenilenmesini ve spermiyogenetik süreçlerini tamamladığını ve nüklear histon-protamin yer değiştirmesini tamamladığını gösterir. Hyaluronik asite bağlanmanın kromozom anomalili sperm sayısını azalttığını bildirmişlerdir.

Huszar ve ark (2006) HA'ya bağlanma oranı düşük hasta grubunun kromozom anomalili defektif embriyolara ve düşük gebelik oranlarına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Böylece HA'nın ICSI sebebiyle ortaya çıkabilecek problemleri azalttığını kanıtlamışlardır.

Çaylı ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada erkek faktörüne bağlı infertilitenin incelenmesinde HA bağlanma oranının rutin semen analizine ek olarak daha fazla bilgi verdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu parametrenin IVF ve ICSI tedavi kararının verilmesinde HA bağlanma oranının faydalı olacağı saptanmıştır (Çaylı ve ark 2003).

Ye ve arkadaşlarının (2006) yapmış olduğu IVF işlemleri sırasında HA bağlanma oranı ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir çalışmalarında 175 IVF siklusunda HA bağlanma oranı ortalaması 74,11 olarak bulunmuş ve %50 ve altında fertilizasyon oranına sahip hasta grubunda ortalama HA bağlanma yüzdesi %50 üzerinde fertilizasyon oranına sahip hasta grubundaki HA bağlanma yüzdesinden anlamlı bir şekilde düşük saptanmıştır. Ayrıca çalışmada HA bağlanma yüzdesi ile total ve progresif sperm motilitesi ve morfoloji arasında kuvvetli bir korelasyon belirlenmiştir.

Park ve arkadaşlarının (2005) yapmış olduğu deneysel bir çalışmada HA'ya bağlanan sperm seçimi ile yapılan ICSI sonuçları karşılaştırılmış ve HA'ya bağlanan sperm seçimi ile elde edilen embriyolarda daha az kromozomal anomaliye rastlandığı bunun da gebelik sonuçlarını daha olumlu olarak etkilediği saptanmıştır.

Marei ve ark oosit maturasyonu için IVF medyumlarına ilave edilen 0,1-0,5 ve 1 mg/mL HA konsantrasyonlarını karşılaştırmışlar. Kumulus ekspansiyonu ve oosit nükleer maturasyonunu ve embriyo gelişim ve kalitesinde 1 mg/ml HA'nın oosit maturasyon oranlarını düşürdüğünü fakat diğer konsantrasyonların da anlamlı bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir (Marei ve ark 2012).

Opiela ve ark (2014)'nin oosit maturasyonu üzerine yaptığı bir araştırmada %0,07 HA'nın oositlerde en yüksek mayotik maturasyonu gösterdiğini yüksek konsantrasyonlu HA'nın ise zararlı etkileri olabileceğini bildirmişlerdir.

Hyaluronik asite bağlanma ile semen parametreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen ve Nijs ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, HB'nin sperm morfolojisi ve motilitesi ile korelasyonu ve aynı zamanda da embriyo kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, sperm yıkama öncesi ve sonrası HB değerleri de karşılaştırılmış yıkama sonrası HB değerinin (%82) yıkama öncesinden (%71) daha yüksek olduğu ve bu değerlerin sperm morfolojisi ile korele olduğu gözlenmiştir. HB'nin sperm konsantrasyonu, motilitesi ve implantasyon oranları ile korele olmadığı ancak fertilizasyon oranı < %50 olan grupta, > %50 olan gruba göre HB'nin daha düşük olduğu (sırasıyla %69.7 - %79.2) bildirilmiştir (Nijs ve ark 2009).

Tarozzi ve arkadaşları ise HB'nin erkek infertilite tedavisinde kullanımını değerlendirmek için 60 IVF hastasını içeren bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada sperm parametreleri, HB değerleri ve DNA fragmentasyon oranlarını incelemişler ve HB değerleri ile fertilizasyon-implantasyon oranları arasında bir korelasyon tespit edemezken sperm morfolojisi arasında yüksek korelasyon tespit etmişlerdir ($p < 0.05$). Ayrıca HB değerleri yüksek olan grupta düşük DNA fragmentasyon oranları gözlemişlerdir ($P < 0.05$). Bu sonuçlar ışığında HB'nin yüksek DNA bütünlüğü olan normal morfolojideki spermleri seçebildiğini fakat IVF'te rutin kullanımı için daha fazla çalışmanın gerekli olduğunu belirtmişlerdir (Tarozzi ve ark 2009). Ayrıca

Tarozzi ve ark (2009) dansite gradient sperm hazırlama metodu ile HA'ya bağlı spermeler arasında (sirasıyla %1,17 ve %1,59) DNA hasarı bakımından karşılaştırma yapmışlar ve TUNEL testi ile HA'ya bağlı spermelerde daha düşük DNA fragmentasyonlu sperm eldesini kanıtlamışlardır. Daha düşük DNA fragmentasyon oranları ile birlikte HA'ya bağlı spermelerde daha yüksek DNA bütünlüğü bulmuşlardır.

Son zamanlarda Parmegiani ve ark (2010a) HA'ya bağlı sperm seçimi için HA içeren bir medyum (Sperm Slow-Medicult) kullanmışlar ve ICSI için kullanılmak üzere DNA hasarı olmayan sperm elde etmişlerdir. Araştırmacılar 20 hasta üzerinde çalışmışlar ve sperm kromatin dispersiyon yöntemi ile PVP ve HA'ya bağlı 4000 spermdeki DNA fragmentasyon oranını göstermişlerdir. HA'ya bağlı spermelerde (%5,3) PVP'dekine göre daha düşük (%11) DNA hasarı gözlenmiştir.

Parmegiani ve ark (2010b) yaptıkları bir çalışmada HA'ya bağlanmış sperm hücrelerini değerlendirmiş ve normal nükleer kromatinli sperm sayısı (%14,5) PVP'den elde edilen sperm sayısından (%11) yüksek bulunmuştur. Onların çalışmasında HA içeren medyum (SpermSlow-Medicult), kültür kabına koyulduktan sonra sperm hücreleri 15 dk bu medyum içerisinde inkübe edilmiştir. Arkasından yüksek büyütme altında HA'ya bağlanmış sperm hücrelerinin morfolojisi değerlendirilmiştir.

Petersen ve ark (2010) da yaptıkları çalışmada nükleer yapının spesifik malformasyonlarını (örneğin; uzun-kısa, geniş-dar) ve kromatin (orta ya da geniş vakuoller) yapısını değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda HA'ya bağlanmış ya da bağlanmamış sperm hücreleri arasında bu morfolojilerle ilgili bir farklılık bulamamışlardır. Fakat HA'ya bağlanma ve morfoloji arasında önemli bir ilişki olduğunu kanıtlamışlardır. Başka bir önemli nokta ise semen örneklerinin hazırlanma şeklidir. Semen hazırlama yöntemleri sperm motilite ve morfolojisini etkilemektedir. Ek olarak Petersen ve arkadaşlarının (2010) sperm hazırlama tekniği (swim-up) ve Parmegiani ve ark (2010b)'nın sperm hazırlama tekniği (dansite gradient) arasındaki farklılıklar çelişkili bulgulara katkıda bulunmuştur.

ICSI; şiddetli erkek faktörlü infertilitenin tedavisi için çok etkili bir metottur. Bu metodun temeli tek bir spermin oositi fertilize etme yeteneğine dayanır. Teknik o kadar etkilidir ki DNA hasarlı bir spermin bile oositi fertilize etmesine izin verir. İnfertil erkeklerde fertil erkeklere oranla yüksek miktarda sperm anöploidileri ve DNA fragmantasyonları görülür. Anormal sperm ile fertilize olmuş oositin sonuçlarının kesin olarak bilinmemesine rağmen düşük fertilizasyon oranları, defektif pre-implante embriyo gelişimi ve yüksek oranlarda düşük ve çocukluk kanserleri dahil ölüm oranları bu problemin kanıtlarıdır. Mikro inseminasyon için en iyi sperm seçimi ICSI'deki en önemli zorluktur. Çoğu çalışmada IMSI (Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection)'nin fertilizasyon ve gebelik oranlarını arttırdığı ve düşük oranlarını azalttığı gösterilmiştir. IMSI'nin dezavantajları; yüksek büyütme altında sperm seçimi için uzman, zaman ve pahalı ekipmana ihtiyaç duyulmasıdır. HA'ya bağlanmış sperm kullanarak yapılan ICSI işlemi en iyi sperm seçimi için daha ucuz ve daha az emek isteyen bir alternatiftir (Mongkolchaipak ve Vutyavanich 2013).

Parmegiani ve ark (2010a)'nın yaptığı bir çalışmada araştırmacılar HA'ya bağlanmış oligospermik grupta HA'ya bağlanmamış oligospermik gruba göre daha yüksek oranlarda nükleer normalite bulurlarken, Petersen ve ark (2010) yüksek büyütme altında normal morfolojili sperm seçiminde HA bağlanmasının yetersiz olduğunu kanıtlamışlardır. Bu iki çalışmadaki tutarsızlık birçok faktöre bağlı olabilir. Bunlardan birisi; semen örneklerindeki birçok normal morfolojili sperm hücresinin bağlanma sürecinde olduğu ve henüz bağlanmadığıdır. Dahası birçok anormal morfolojili spermin normal DNA içermesi veya tam tersi özellikli olabilmesidir (Franco ve ark 2008). Bizim yaptığımız çalışma da Parmegiani ve ark (2010)'nın çalışması ile korelasyon göstermiştir.

HA reseptörleri, baş, kuyruk ve orta parçada lokalize olmuştur. Bu reseptörün spesifik antikolar tarafından bloklanması sperm motilitesini düşürür (Bakhtiari ve ark 2007).

Mongkolchaipak ve Vutyavanich'in (2013) yapmış olduğu çalışmada ise HA'ya bağlı sperm hücreleri hedef alınmış ve DNA fragmantasyonu ile kromozom anöploidileri vurgulanmıştır. IMSI ve HA'ya bağlanmış sperm kullanarak daha

düşük DNA fragmentasyonları ve anöploidi oranları elde etmenin mümkün olduğu belirtilmiştir.

Biz de çalışmamızda HA'yı Sperm Slow-Medicult ve PICSİ gibi hazır ticari ürünler dışında sperm hazırlama medyumuna ilave ederek kullandık. Zaman-mali bakımdan kolaylık sağlayan bu yöntemle morfoloji ve motilite bakımından kaliteli sperm eldesi sağladık.

Fuller ve Whittingham'ın bir çalışmasında (1996), domuz spermine dondurma öncesi eklenen 500 ya da 1000 µg/ml'lik HA, sperm motilite parametrelerini arttırmıştır. Huszar ve ark (2003)'nin yaptığı bir çalışmada 750-1000-1250 µg/ml'lik HA motilite, viabilite ve fertilite oranlarını önemli ölçüde etkilemiştir. İdeal HA miktarının 750 µg/ml olduğuna karar verilmiştir. Aksine 1250'lik doz motilite, viabilite ve fertilizasyon oranlarını düşürmüştür.

Bakhtiari ve ark (2007)'nin yaptığı deneysel bir çalışmada HA dozlarının donmuş-çözünmüş sperm morfolojilerine herhangi bir etkisi olmamıştır. Ancak 750-1000-1250 µg/ml'lik HA konsantrasyonları motilite ve viabilite oranlarını arttırmış ve özellikle 750 µg/ml'lik HA fertilizasyon oranlarını yükseltmiştir. Aksine 1250 µg/ml'lik HA konsantrasyonu sperm parametrelerini negatif yönde etkilemiştir. Biz çalışmamızda sadece swim-up medyumuna ve 1600 µg/ml'lik oranda HA ekledik ve yüksek motilite ve morfoloji oranları elde ettik. HA ilaveli swim-up medyumundaki düşük apoptozis oranlarını Annexin V ile boyayarak kanıtladık.

Spermin HA'ya bağlanma yeteneğinin artması, daha motil ve DNA bütünlüğüne sahip morfolojik olarak daha kaliteli olduğu anlamına gelir, bu da fertilizasyon ve gebelik oranlarını artırır (Lipovac ve ark 2014).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yardımcı üreme tekniklerinin başarısı için sperm hatalarını ve bunların kaynaklarını tanımlamak çok önemlidir. Erkek infertilitesine sebep olan parametreler arasında spermelerin sayı ve motilitesinin yanında spermelerin morfolojik bozuklukları ayrı bir önem taşımaktadır. Erkeklerde, fertilizasyon potansiyellerinin göstergelerinden biri olan semen analizi; spermelerin sayısı, hareketliliği ve morfolojiyi kapsar.

Hyaluronik asit; oosit etrafındaki kumulus hücrelerinde bulunan bir komponent olup spermın oosite bağlanmasına yardımcı olur. Ne kadar çok sperm HA'ya penetre olursa fertilizasyon yeteneğinin o kadar iyi olduğu var sayılır. Bundan yola çıkılarak sperm hazırlama yöntemlerinden biri olan swim-up medyumuna eklenen HA ile maturasyonu yüksek, DNA hasar oranı düşük sperm seçildiğinden, bu yöntemle daha sağlıklı sperm ve buna bağlı embriyolar elde edebileceğimizi düşündük.

Sperm hazırlama medyumuna rutinde kullanılan destekleyici bir protein olan HSA yerine HA ilave ederek hazırlanan swim-up medyumunda +3 ve +4 hareket yeteneğine sahip yüksek konsantrasyonlarda sperm bulunmuştur. Ayrıca bu spermelerin Annexin V yöntemi ile morfolojik değerlendirmelerinde de apoptozis oranı düşük, daha sağlıklı sperm elde edilmiştir.

HA ilaveli medyum ile DNA fragmentasyonu az olan anöploid oranları daha düşük ve maturasyonunu tamamlamış sperm elde edilmektedir. Bu özelliklere sahip spermın oosite penetre olma ihtimali daha yüksektir. Bu yöntemle elde edilen DNA'sı intakt sperm kullanılması ile daha sağlıklı embriyolar elde edileceği düşüncesindeyiz. Yeni ve daha hassas teşhis yöntemleriyle spermelerin farklı düzeylerde eldesine olanak sağlayacak her bilgi değer taşımaktadır.

HA destekli bazal medyumlarla yapılabilen basit, ucuz ve rutine alınabilecek bu yöntemin, YÜT-androloji alanına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

7. ÖZET

İnfertil çiftlerde, yardımcı üreme tekniklerinin olumsuz sonuçlarının bir bölümünden ejakülattaki apoptotik spermilerin sorumlu olabileceği düşünülür. İleri düzey sperm hazırlama prosedürlerine rağmen her sperm dölleme sağlamamaktadır. Hyaluronik asit ise oosit etrafındaki kumulus hücrelerinde bulunan bir komponent olup spermın oosite bağlanmasına yardımcı olur. Hyaluronik asite penetre olan sperm sayısının apoptozis ile ters orantılı olacağı düşüncesinden yola çıkarak swim-up medyumuna hyaluronik asit ilavesi ile daha sağlıklı sperm eldesi amaçlanmıştır.

20 hastadan alınan ejakulat örneğine rutin semen analizi yapılmıştır. Her örnek 2 gruba ayrılarak swim-up yöntemi ile hazırlanmıştır. 1. grubun swim-up medyumuna %0,5 Human serum albumin (HSA) 2. gruba ise %10 hyaluronik asit (HA) ilave edilmiştir. Yüzen +3 ve +4 hücre konsantrasyonu belirlenmiş ve annexin V kiti ile boyanıp apoptotik sperm oranı saptanmıştır.

Elde edilen +3 ve +4 hücre konsantrasyonu HA içeren grupta HSA içeren gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Apoptozis oranı bakımından karşılaştırıldığında HSA içeren grupta; HA içeren gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunurken HA içeren grupta en düşük çıkmıştır.

Sonuçlarımız, sperm hazırlama medyumuna eklenen hyaluronik asitin sperm parametrelerini olumlu etkileyeceği yönündedir. Bu sayede daha sağlıklı sperm eldesi söz konusudur.

Anahtar Kelimeler: Annexin V, Apoptozis, Hyaluronik Asit, İnfertilite, Spermatozoa.

8. SUMMARY

During assisted reproduction manipulations it is assumed that apoptotic sperms of ejaculate are responsible for failures. Although advanced techniques of sperm preparation harvested every sperm can not be fertile. Hyaluronic acid exists at the cumulus surrounding oocyte and helps sperm to bind oocyte. Considering that the sperms binding hyaluronic acid shows negative proportion of apoptosis, by adding Hyaluronic acid to swim-up media we searched if a more healthier sperm can be obtained.

Routine seminal plasma analysis was done to 20 patients samples. Each sample was divided as two groups; to the swim up medium in group 1; 0,5% HSA in group 2; 10% HA was added. The concentration of +3 and +4 motile sperms were evaluated and with annexin V stain the apoptotic sperm rate was calculated.

When +3 and +4 motile sperm rate is compared HA containing group had higher scores. When comparasion is done according to apopitosis HSA containing group had the highest rate with a significant difference to HA containing group, the lowest rate was seen in HA contining group.

Out results indicate that by adding HA to sperm processing medium desired sperm parameters are effected positively. By this addition a more healthier sperm population can be harvested.

Key Words: Annexin V, Apopitosis, Hyaluronic Acid, Infertility, Spermatozoa.

9. KAYNAKLAR

- Abatangelo G, O'Regan M. Hyaluronan: Biological role and function in articular joints. *Eur J Rheumatol Inflamm.* 1995;15:9-16.
- Abu HA, Franken DR, Hoffiman B, Henkel R. Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function. *Andrologia.* 2012;44: 571-77.
- Aitken J, Krausz C, Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev.* 1994;39: 268-79.
- Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology.* 2011;13: 36-42.
- Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2008;19(1): 55-63.
- Aktan TM, Cüce G, Duman S, Aksoy E, Görkemli H. Sperm hazırlama tekniklerinin fertilizasyon sonuçları üzerine etkileri. *Selçuk Üniv Tıp Derg.* 2011;27(4): 205-207.
- Andrabi SMH. Mammalian sperm chromatin structure and assesment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24: 561-9.
- Aras İ. Erkek infertilitesinde semen parametreleri ile sperm kromozom anöploidi sıklığı ilişkisinin araştırılması. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2009 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cavit Can).
- Arslan D. Farklı semen parametrelerine göre insan spermlerinde apoptozis ve nekrozisin histokimyasal ve istatistiksel yöntemlerle belirlenmesi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2008 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Remziye Deveci).
- Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility And Sterility.* 2010; 94(2): 549-57.
- Avendano C, Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *Journal Of Andrology.* 2011;32(4): 356-63.
- Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction.* 2007; 22(5): 1413-9.

Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Strehler E, Piomboni P. Recent advances in human sperm pathology. *Contraception*. 2002;65: 283-7.

Bakhtiari M, Sobhani A, Akbari M, Pasbakhsh P, Abbasi M, Hedayatpoor A, Amidi F, Sargolzaei F. The effect of hyaluronic acid on motility, vitality and fertilization capability of mouse sperms after cryopreservation. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2007;5(2): 45-50.

Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Nuhoglu A. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 2001;16(1): 125-9.

Balaban B, Lundin K, Morrell JM, Tjellström H, Urman B, Holmes PV. An alternative to PVP for slowing sperm prior to ICSI. *Human Reproduction*. 2003;18(9):1887-89.

Balazs Ea, Denlinger JI. Viscosupplementation: A new concept in the treatment of osteoarthritis. *J.Rheum*. 1993;20: 7-9.

Beydola T, Sharma R K, Agarwal A. Sperm preparation and selection techniques. Chapter 29, Section 6. 2013;244-251.

Bilgici B. http://www.biyologlar.com/index.php/kunena/25-Biyokimya/1881-apoptozis_hakkinda_bilgiler (20.09.2014).

Boldt J, Howe AM, Parkerson JB, Gunter LE, Kuehn, E. Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. *Biol. Reprod*. 1989;40(4): 887-896.

Boomsma, CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011; (3):CD004507.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early postimplantation embryo development in art. *Hum Reprod*. 2006;21: 2876-81.

Bubenik J. Genetically modified vaccines augment the efficacy of cancer surgery and chemotherapy. *Folia Biologica*. 2009;55: 199-200.

Bukowska D, Kempisty B, Sikora J, Jackowska M, Wozna M, Antosik P, Piotrowska H, Budna J, Jaskowski JM. The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages. *Veterinarni Medicina*. 2011;56(5): 248-254.

Bullard KM, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal wound healing: current biology. *World J.Surg*. 2003;27: 54-61.

Carine CF, Shaw NL, Mui NL, Su LY. Relationship between sperm hyaluronan-binding assay (HBA) scores on embryo development, fertilisation, and pregnancy rate in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Proceedings of Singapore Healthcare*. 2013;22(2): 120-24.

Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, Singh NP. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *Journal of Andrology*. 2006;27(1): 112-120.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal Of Anatomy*. 1963;112: 35-51.

Collodel G, Moretti E, Fontani V, Rinaldi S, Aravagli L, Sarago G, Capitani S, Anichini C. Effect of emotional stress on sperm quality. *Indian J Med Res*. 2008; 128: 254-61.

Collodel G, Giannerini V, Pascarelli NA, Federico MG, Comodo F, Moretti E. Tem and fish studies in sperm from men of couples with recurrent pregnancy loss. *Andrology*. 2009;41: 352-60.

Çaylı S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2003;7: 462-68. Review.

Çetin G. İnfertilite ve in vitro fertilizasyon embriyo transferi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü. Bitirme Tezi. 2000.

Daris B, Goropevsek A, Hojnik N, Vlaisavljevic V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Arch Gynecol Obstet*. 2010; 281: 363-7.

Delilbaşı L. İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri. İn:Delilbaşı L. (eds). Ankara: Öncü Basımevi; 2008;1-31.

Demir R. Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş (Çev. Ed: Demir R.) Abraham L.Kierszenbaum, Md, Phd. Bölüm 20, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.

Emery BR, Miller RL, Carrell DT. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage. *BMC Dev Biol*. 2001;1:14.

Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-Fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Ars*. 2003;4: 165-174.

Erickson M, Stern R. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int*. 2012; 893947:1–893947:9.

Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet*. 2008;25: 197-203.

Esteves CS, Schneider DT. Male infertility and assisted reproductive technology: lessons from the IVF. *The Open Reproductive Science Journal*. 2011;3: 138-153.

Franco JG, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2008;17: 42-5.

Franco JG, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RL, Olivera JB, Vagnini LD. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl*. 2012;35(1): 46-51.

Frasera JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal Of Internal Medicine*. 1997;242: 27-33.

Fuller SJ, Whittingham DG. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J Reprod Fertil*. 1996;108: 139-45.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Cristina V, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 2000;15(4): 830-39.

Gardner DK. *In vitro fertilization, a practical approach*, Inc. 2006, 3rd Edition, CRC Press.

Gewies A. Introduction to apoptosis. Aporeview. 2003. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>. (03.10.2014).

Gustafson S, Laurent AE, Wikström T, Gustafson A. Localization of hyaluronan and the hyaluronan receptor icam-1 in rheumatoid synovia histochemical study. *Acta Orthop Scand*. 1995;66 (Suppl 266):162-64.

Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Steinkampf MP. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 1998;70(2): 207-13.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor LP, Brazil KC, Nakajima TS, Coutifaris C, Carson AS, Cisneros P, Steinkampf PM, Hill AJ, Xu D, Phil M, Vogel LD. Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001;345(19): 1388-93.

Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008;(2): 73-78.

Heldin P, Asplund T, Teder P, Suzuki M, Virochides D, Papanikolaou V, Pertoft H. Regulation of hyluronan synthesis and the interaction of hyaluronan with cells. *Acta Orthop Scand*. 1995;66 (266): 160-62.

Henkel GRR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 1:108.

Hoogendijk CF, Kruger TF, Bouic PJ, Henkel RR. A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril*. 2009;91(4): 1285-92.

Huang CC, Cheng Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Hsien C, Sheng Lee M. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility And Sterility*. 2005; 84(1): 130-40.

Huszar G, Corrales M, Vigue L. Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normospermic and oligospermic men. *Gamete Res*. 1988a;19: 67-75.

Huszar G, Vigue L, Corrales M. Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variable spermic and oligospermic men. *Biol Reprod*. 1988b;38: 1061-1066.

Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid (sperm select) improves retention of sperm motility and velocity in normozoospermic and oligozoospermic specimens. *Fertility and Sterility*. 1990;54: 1127-1134.

Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 2003;79: 1616-24.

Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GI, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18: 260-67.

Huszar G, Jakab A, Sakkas D. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reproductive Biomedicine Online*. 2007; 14: 650-63.

Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells*. 1999;17: 306-13.

Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells*. 2001;19: 88-91.

Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *Iubmb Life*. 2002;54(4):195-9.

Iwata H. Pharmacologic and clinic aspects of intraarticular injection of hyaluronate. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;289: 285-91.

Īnsan spermatozoa. <http://commons.wikimedia.org/> 2014. (05.11.2014).

Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril*. 2005;84: 1665-73.

- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23: 435-61.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* 2011;91(1): 221-64.
- Johnson N, Vandekerckhve P, Watson A, Lilford R, Harada T, Hughes E. Tubal flushing for sub fertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2005;18. Cd003718.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel histoloji. In: Aytakin Y, Solakoğlu S, Ahıshalı B, ed. 8. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi. 1998.
- Kadioğlu A. Who laboratuvar el kitabı. 5. Baskı. 2010;161-165.
- Katie S. Murray DO, Andrew J, Mcgeady JB, Reed ML, Kuang WW, Nangia AK. The effect of the new 2010 world health organization criteria for semen analyses on male infertility. *Fertil Steril.* 2012;98: 1428–31.
- Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reprod Med Biol.* 2012;11: 165-76.
- Kayıkçı MA, Çam HK, Akman Y, Erol A. Erkek infertilitesini değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce Tıp Fakóltesi Dergisi.* 2002;4(3): 35-38.
- Kotwicka M, Jendraszak M, Skibinska I, Jedrzejczak P, Pawelczyk L. Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Hum Cell.* 2013;26(1):28-34.
- Koyuncu H. Sperm DNA hasarı tespit yöntemleri. *Türk Üroloji Seminerleri.* 2011;2: 18-23.
- Kuyucu F. Oligoastenospermik infertil hastalarda varikozel saptanan ve varikozel saptanmayan grupların mitokondrial DNA delesyonlarının araştırılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakóltesi Üroloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2006. (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Arlan Ardıçoğlu).
- Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar-derleme. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2002;2(4): 323-29.
- Larsen NE, Lombard KM, Prent EG, Balazs EA. Effect of hyalan on cartilage and chondrocyte cultures. *J Orthop Res.* 1992;10: 23-32.
- Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(5): 581-86.

- Levy R, Seifer-Aknin I. Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin.* 2001;59(5): 531-45.
- Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med.* 2008;54(3): 111–25.
- Lipovac M, Bodner F, Schütz A, Kurz H, Riedl C, Mair J, Imhof M. Increased hyaluronan acid binding ability of spermatozoa indicating a better maturity, morphology, and higher DNA integrity after micronutrient supplementation. *Emj Urol.* 2014;1: 60-65.
- Liu M, Ma C, Tang L, Wen R, Deng S, Wang Q, Jiang Y, Chen A. Quality analysis of the primary semen samples from 512 donors. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2004;10(10): 734–36.
- Mahani IM, Davar R. Hyaluronic acid versus albumin in human embryo transfer medium. *East Mediterr Health J.* 2007;13(4): 876-80.
- Manochantr S, Chiamchanya C, Sobhon P. Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. *Andrologia.* 2012;44: 187-99.
- Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction.* 2002;17(5): 1257-1265.
- Marei WF, Ghafari F, Fouladi-Nashta AA. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2012;78(3): 670-77.
- Meintjes M, Chantilis SJ, Ward DC, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A randomized controlled study of human serum albumin and serum substitute supplement as protein supplements for IVF culture and the effect on live birth rates. *Human Reproduction.* 2009;24(4):782-89.
- Menkveld R, Holleboom C, Rhemrev J. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian Journal Of Andrology.* 2011;13: 59-68.
- Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem.* 1934;107: 629-34.
- Mongkolchaipak S, Vutyavanich T. No difference in high-magnification morphology and hyaluronic acid binding in the selection of euploid spermatozoa with intact DNA. *Asian Journal of Andrology.* 2013;15: 421-24.
- Murray RK, Granger DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's illustrated biochemistry.* Twenty Sixth Ed. Lange Medical Publications/Mcgraw-Hill, 2003; 542-555.

Natali I. Sperm preparation techniques for artificial insemination - comparison of sperm washing, swim up, and density gradient centrifugation methods, artificial insemination in farm animals, Dr. Milad Manafi (Ed.), <http://www.intechopen.com/books/artificialinsemination-in-farm-animals/sperm-preparation-techniques-for-artificial-insemination-comparison-of-spermwashing-swim-up-and-den>. 2011. (13.10.2014).

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina*. 2008;53(8): 397-411.

Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E. Relationship between hyaluronic acid binding assay and outcome in ART: a pilot study. *Andrologia*. 2009;42:291-96.

Niu G, Chen X. Apoptosis imaging: beyond annexin v. *J Nucl Med*. 2010;51:1659-62.

Ok E. Asthenozoospermia olgularında semen analizi ve sperm defektlerinin faz kontrast mikroskopu ile ortaya konması. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, 2005. (Tez Danışmanı: Y. Doç. Dr. Doğan Özyurt).

Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril*. 2000;74(2):245-50.

Opiela J, Romanek J, Lipinski D, Smorg Z. Effect of hyaluronan on developmental competence and quality of oocytes and obtained blastocysts from in vitro maturation of bovine oocytes. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. 2014;519189:8.

Osterholt HC, Dannevig I, Wyckoff MH, Liao J, Akgul Y, Ramgopal M, Mija DS, Cheong N, Longoria C, Mahendroo M, Nakstad B, Saugstad OD, Savani RC. Antioxidant protects against increases in low molecular weight hyaluronan and inflammation in asphyxiated newborn pigs resuscitated with 100% oxygen. *Plos One*. 2012;7(6):0038839.

Öktem S, Özhan Mh, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Derg*. 2001;2(1): 91-95.

Öniz H. Apoptoz: ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Hast Derg*. 2004;14(1): 1-20.

Özçınar E. Semen analizi: 2010 dünya sağlık örgütü kriterlerine göre spermiyogram. *İzm Üniv Tıp Derg*. 2014;1: 48-51.

Park CY, Uhm SJ, Song SJ, Kim KS, Hong SB, Chung KS, Park C, Lee HT. Increase of ICSI efficiency with hyaluronic acid binding sperm for low aneuploidy frequency in pig. *Theriogenology*. 2005;64: 1158-69.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M: "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril*. 2010a, 93:598-604.

Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet*. 2010b; 27: 13-16.

Perticarari S, Ricci G, Granzotto M, Boscolo R, Pozzobon C, Guarnieri S, Sartore A, Presani G. A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum Reprod*. 2007;22(2): 485-94.

Petersen CG, Massaro FC, Mauri AL, Oliveira JB, Baruffi R, Franco JG. Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010;8:149.

Peyron JG. Intraarticular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: state-of-the-art review. *J Rheumatol*. 1993;20(Suppl 39):10-5.

Pierre A. Hyaluronic acid and its use as a "rejuvenation" agent in cosmetic dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 2004;23: 218-22.

Prem P. Synthesis of HA in differentiated teratocarcinoma cell. *Characterization Of The Synthesis*. 1993;211: 181-89.

Price RD. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal Of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2007;60: 1110-19.

Prochazka R, Kalab P, Nagyova E. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod*. 2003;68: 797-803.

Robert D, Vincent JR. In vitro fertilization and other assisted reproductive techniques. In David H. Chestnut (eds): *Obstetric anesthesia* Mosby Inc. 1999:249-262.

Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *human reproduction*. 2012; 27(10): 2908-17.

Ross MH, Kaye G, Pawlina W. *Histology a text and atlas with cell and molecular biology*. Fourth Edition. Usa, Lippincott Williams & Wilkins Publications. 2003;93-97.

Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reproduction*. 1999;4(1): 31-7.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology Of Reproduction*. 2002;66: 1061-67.

Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010;93: 1027-36.

Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997;12: 1949-54.

Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(1):3-12.

Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365(1546): 1501-15.

Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res*. 2008;127: 115-23.

Shamsi BM, Imam SY, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2011;11: 9631-38.

Sharbatoghli M, Valojerdi MR, Amanlou M, Khosravi F, Jafar-Abadi MA. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and art outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;286(5): 1315-22.

Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Anthony J, Thomas JR, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology*. 2001; 22(4):575–83.

Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reproduction*. 2002;17(5): 1266-73.

Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers In Bioscience*. 2012;4: 746-54.

Simon A, Safran A, Revel A, Aizenman E, Reubinoff B, Porat-Katz A, Lewin A, Laufer N. Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertility and Sterility*. 2003;79(6): 1434-38.

Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Systems Biology In Reproductive Medicine*. 2011;57: 133-38.

Spermatogenez. www.contraceptionformen.wordpress.com. (18.11.2014).

Speroff L, Fritz A. Marc. Female infertility. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition, Lww, 2011: 1250-6.

Sridevi V, Manasa M, Chandana Lakshmi MVV, Dedeepya JA. Review on hyaluronic acid. *Int. J. Res. Chem. Environ.* 2012; 2(4): 6-11.

Stern R, Csoka A, Mammalian hyaluronidases, In: Hascall V, M.Yanagashita (Eds.), *Glycoforum/Science Of Hyaluronan Today*, Seikagaku, Corporation, Tokyo, Japan, 2000.

Swann K. Soluble sperm factors and Ca^{+2} release in eggs at fertilization. *Rev Reprod.* 1996;1(1): 33-9.

Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I, Cambi M, Forti G, Baldi E, Muratori M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian Journal Of Andrology.* 2012;14: 24-31.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA, Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J. Biol. Chem.* 2002;277:4581-84.

Tapısız ÖL, Altınbaş SK, Abike F, Göktolga Ü. Semen analysis from a point of view of gynecologist and recent developments. *Journal Of Turkish Society Of Obstetrics And Gynecology.* 2012;9(1): 25-31.

Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scaravelli G, Borini A. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(3): 35-43.

Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, Beebe SJ. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Molecular Human Reproduction.* 2004;10(11): 825-34.

Tomatır AG. Apoptoz: programlı hücre ölümü. *T Klin Med Sci.* 2003;23: 499-508.

Toole BP, Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev. Cancer.* 2004;4: 528-39.

Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *FÜ Sağlık Bil. Dergisi.* 2006;20(1):85-95.

Ulukaya E. Apoptozis ders notları. 2003. <http://www20.uludag.edu.tr/~Biokimya>. (10.09.2014).

Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodósio C, Paiva A, Ramalho-Santos J. Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertility and Sterility.* 2007;87(3):572-83.

Visco V, Raffa S, Elia J, Delfino M, Imbrogno N, Torrisi MR, Mazzilli F. Morphological sperm defects analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy and their correlation with sperm motility. *International Journal Of Urology*. 2010;17(3): 259-66.

Ward CR, Storey BT, Kopf GS. Selective activation of Gi1 ve Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1994;269(18):13254-58.

Water JJ, Schack MM, Velazquez-Campoy V, Maltesen MJ, Weert MV, Jorgensen L. Complex coacervates of hyaluronic acid and lysozyme: effect on protein structure and physical stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014;88: 325-331.

Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*. 1997;272: 13997–14000.

Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction*. 2002;8: 984-91.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition. 2010,

Ye H, Huang GN, Gao Y, Liu de Y. Relationship between human sperm hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2006;21: 1545-50.

Zanaveld LJD, Polakoski KL, Williams WL. Properties of a proteolytic enzyme from rabbit sperm acrosomes. *Biol Reprod*. 1972;6:30.

Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X, Chen ZJ. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology*. 2008;10(2):227-35.

Zhang L, Wang L, Zhang X, Xu G, Zhang W, Wang K Wang Q, Qiu Y, Li J, Gai L. Sperm chromatin integrity may predict future fertility for unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *International Journal Of Andrology*. 2012; 35(5): 752-7.

Zhuo L, Kimata K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struc Func*. 2001;26: 189-96.

Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? pros and cons. *Journal Of Andrology*. 2009;30(3): 219-29.

Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N. Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? a systematic review. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28: 391-97.

10. EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Aşağıdaki konularda hastaya gerekli tüm bilgiler verilmelidir.

a- Araştırma, semen analizi için başvuru yapmış hastaların semen analiz günü elde edilen ve kullanılmayacak atık hedefli semenlerinin Hyaluronik asite tabi tutulmasına yönelik bir çalışmadır. Çalışmanın bitiminde elde edilen sonuç başarılı olursa Tüpbebek hastaları ileriki dönemlerde bundan yarar sağlayacaktır. Çalışmada hastanın aleyhine işleyen herhangi bir durum olmadığı gibi bir risk unsuru da taşımamaktır.

b- Semen hazırlığında özel sıvılarla rutin yıkama ve yüzdürme metodları şu anda kullanılmaktadır.

c- Araştırma süresi 4 aydır.

d- Artık semenle yapılacak olan çalışma, hastaya herhangi bir mali yük getirmeyecektir.

e- Hastanın kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Ancak elde edilen bulgular kullanılacaktır.

f- Araştırmaya toplam 25 hasta alınması planlanmıştır.

g- Çalışma süreci içinde herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun,

adı-soyadı : Prof. Dr. T. Murad AKTAN

tel. no : 05379609694

h- Hasta çalışmaya herhangi bir nedenle gönüllü olmadığı takdirde araştırmacı hastayı çalışma dışı bırakacaktır.

i- Gönüllü, çalışmanın herhangi bir zaman diliminde çalışmadan vazgeçme ve ayrılma hakkına sahiptir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

01 / 05 / 2014

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin.

Adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı soyadı, İmzası:

Prof. Dr. Selçuk DUMAN

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsa telefon/faks no.)

Prof. Dr. T. Murad AKTAN

Tel. No: 05379609694

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin adı soyadı

Hüseyin AKBULUT (Biyolog)

EK-2

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:40

Toplantı Tarihi: 16.05.2014

Karar Sayısı:2014/645:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Selçuk DUMAN' ın "Farklı Semen Örneklerinde Hyaluronik Asidin Swim-up Tekniğinde Kullanımı ve Sperm Parametrelerine Etkisi" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 14.05.2014 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Selçuk DUMAN' ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

ASLI GİBİDİR
16.05.2014

Prof. Dr. Saim ACIKGÖZOĞLU
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı



11. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılı İzmir doğumludur. İlköğrenimini 1999 yılında İzmir Eşrefpaşa Tınaztepe İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra lise eğitimini 2002 yılında İzmir Eşrefpaşa Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında Konya Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD'nda yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2011 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'nde doktora eğitimine başladı.