

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

BİLGİSAYAR DESTEKLİ SPERM ANALİZ SİSTEMİ

HAZIRLAYAN

NAZLI IRMAK KARAARK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA – 2022

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

BİLGİSAYAR DESTEKLİ SPERM ANALİZ SİSTEMİ

HAZIRLAYAN

NAZLI IRMAK KARAARK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ HÜSEYİN KURTULDU

ANKARA – 2022

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Nazlı Irmak KARAARK tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18 /08 /2022

Tez Adı: Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemi

Tez Jüri Üyeleri

İmza

Doç. Dr. Barbaros ÇETİN, Bilkent Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin KURTULDU, Başkent Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL, Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof.Dr. Ömer Faruk ELALDI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih : / / 2022

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 04 /09 / 2022

Öğrencinin Adı, Soyadı: Nazlı Irmak KARAARK

Öğrencinin Numarası: 21910124

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği A.B.D.

Programı: Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin KURTULDU

Tez Başlığı: Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 58 sayfalık kısmına ilişkin, 03/09/2022 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %7’dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih: 04/09/2022

Öğrenci Danışmanı

Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin KURTULDU

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans serüvenim boyunca her zaman bana destek olan, umutsuzluğa kapıldığımda beni her zaman yükselten, bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan, her zaman bana güvenen çok sevdiğim ve saygı duyduğum değerli tez tanışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin KURTULDU'ya destekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hayatta her alanda olduğu gibi akademik hayatımda da bana her daim destek olan annem Hülya KARAARK, babam Selahattin KARAARK'a, bana her daim çalışmayı sevdiren halam Sevil SAKA'ya ve ablam Sanem İŞGÖREN'e,

Üniversitenin bana kattığı en değerli arkadaşlarım olan ve her daim olduğu gibi tez döneminde de desteklerini esirgemeyen Araş.Gör.Burcu OLTU ve Ilgın Deniz GÜNGÖR'e, bana moral ve motivasyon kaynağı olan Bengisu YAROĞLU, Buse Melis ERENCAN'a ve çocukluğum Gizem GÜÇLÜ ve Can ÖZDEMİR'e,

Bu süreçte bana destek olan tüm arkadaşlarıma ve süreci atlatmamda destek olan iş arkadaşlarıma özellikle Melike OĞUZ'a, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Göksel DURKAYA'ya, teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Nazlı Irmak KARAARK

BİLGİSAYAR DESTEKLİ SPERM ANALİZİ

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

2022

Dünya Sağlık Örgütü'nden (World Health Organization (WHO)) elde edilen verilere göre gebelik planlayan çiftlerin %15'i infertiliteden etkilenmektedir. İnfertilite, çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin bir yıl boyunca korunmasız cinsel ilişkide bulunup gebeliğin olmaması durumudur. İnfertilitenin kadın ya da erkek kaynaklı olup olmadığının doğru analiz edilebilmesinin en basit yolu sperm analizidir (spermiyogram testi). Geleneksel metotlar uygulanarak yapılan standart sperm analizleri, üreme kliniklerinde veya laboratuvarlarda rutin olarak uygulanmaktadır ve bu analiz, çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerde infertilitenin teşhis ve tedavisi adına önem taşımaktadır. Bununla birlikte, sperm analizi subjektif değerlendirmelere bağlı olduğundan kantitatif sonuçlar elde edilememektedir.

Son yıllarda sperm kalitesini analiz etmek için bilgisayar destekli sistemlerle görüntü işleme ve analizi yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Bilgisayar Destekli Sperm Analiz (Computer Aided Sperm Analysis (CASA)) sistemlerinde spermatozoid motilitesi, mobilitesi ve morfolojisi analiz edilmektedir. Bu çalışmada da Ankara Şehir Hastanesi Onkoloji Binası Androloji-Üroloji Kliniği'nden elde edilen dijital görüntüler işlenerek sperm analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sonucunda mevcut CASA sistemlerinden farklı olarak WHO'da belirtilen sperm kinematik parametrelerinin tamamını inceleyen, kullanıcı kaynaklı hataları minimize ederek daha doğru ve daha güvenilir sonuçlar elde eden bir sistem geliştirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: CASA, Sperm Analizi, İnfertilite, Spermiyogram, Semen.

ABSTRACT

Nazlı Irmak KARAARK

COMPUTER-AIDED SPERM ANALYSIS

Başkent Universtiy Institute of Science

Department of Biomedical Engineering

2022

Infertility affects 15% of couples planning a pregnancy, according to data from the World Health Organization. Infertility is a condition that occurs when couples do not conceive pregnancy with unprotected sexual intercourse for at least a year. The spermiogram test is the most simple and accurate approach to determine whether infertility is caused by female or male partner. Standart sperm analysis is traditionally performed in reproductive clinics and laboratories. Since quantitative assesments depend on technician evaluations, highly accurate results cannot be obtained, in manually inspected specimens.

In recent years, computer-aided systems with image processing units have been employed to analyze sperm quality. In this thesis, a computer-aided sperm analysis system(CASA) is developed to quantitatively assess sperm motility, mobility and morphology.

Analysis of spermatozoids has been performed by processing digital micrographs obtained from the Andrology-Urology Clinic of Ankara City Hospital. In addition to the parameters measured in standard CASA systems or defined in the literature, novel parameters have been developed to characterize infertility.

KEYWORDS: CASA, Sperm Analysis, Infertility, Spermiogram, Semen.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çalışmanın Konusu.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi	3
1.3. Literatür Değerlendirmesi	3
1.4. Genel Bakış	7
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	8
2.2. Spermatogenez	10
2.2.1. Spermatositogenez.....	10
2.2.2. Mayoz bölünme	11
2.2.3. Spermiyogenez.....	12
2.3. Sperm Morfolojisi	14
2.3.1. Baş kısmı.....	15
2.3.2. Bağlantı parçası	15
2.3.3. Orta parça	15
2.3.4. Esas parça.....	15
2.3.5. Son parça	16
2.4. Sperm Defektleri	16
2.4.1. Baş kısmındaki defektler.....	16

2.4.2.	Boyun ve orta parça defektleri	19
2.4.3.	Ana parça-kuyruk defektleri	19
2.5.	Ereksiyon	20
2.6.	Ejekülasyon	21
2.7.	Sperm Parametreleri	21
2.7.1.	Sperm Motilitesi.....	21
2.7.2.	Sperm Vitalitesi	22
2.7.3.	Sperm Sayısı.....	24
2.7.4.	Sperm Morfolojisi.....	26
2.7.5.	Sperm Analizi Terminolojisi	27
2.8.	Sperm Analiz Yöntemleri.....	28
2.8.1.	Floresan Prob Yöntemi	28
2.8.2.	Akış Sitometrisi Yöntemi	29
2.8.3.	CASA Yöntemi.....	30
3.	YÖNTEMLER VE ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
	KAYNAKLAR.....	61

TABLolar LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Sperm başı morfolojisi standartları [6].....	16
Tablo 2.2. Sperm orta parça ve kuyruk morfolojisi standartları [6].	16
Tablo 2.3. WHO referans aralıkları [6].	24
Tablo 2.4. Sperm analizi alt sınır referans limitleri (5. Yüzdelikleri %95 güven aralıkları) [6].....	25
Tablo 3.1. Farklı büyütmelelerde kalibrasyon skalası kullanılarak elde edilen kalibrasyon değerleri, görüntüleme alanları ve görüntüleme hacimleri. Hacim hesabında 50 mikron kanal derinliği kullanılmıştır.	36
Tablo 3.2. 4 veri setinde elde edilen ortalama sperm sayısı ve mikrometre küpe denk gelen sperm sayısı. Köşeli parantez içerisindeki değerler 25. ve 75. yüzdelik dilim çeyrekler arası aralıkları göstermektedir. Tüm veri setleri üzerinden ortalama sperm sayısı 609,1 (standart sapması 60,3) ve mikrometre küpte sperm sayısı $89,9 \times 10^{-6}$ 'dır (standart sapması $8,9 \times 10^{-6}$).	48
Tablo 3.3. 4 veri setinde ölçülen kinematik parametreler. Parantez içerisindeki değerler 25. ve 75. yüzdelik dilim çeyrekler arası aralıkları göstermektedir.	56
Tablo 3.4. 4 veri setinden elde edilen kinematik parametrelerin ortalaması ve standart sapması.	57
Tablo 4.1. Ölçülen bazı kinematik parametrelerin literatürde bulunan değerler ile karşılaştırılması.	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Spermatogenez aşamaları [29].	13
Şekil 2.2. Sperm hücresi kısımları [31].	14
Şekil 2.3. Sperm baş kısmı defektleri [33].	18
Şekil 2.4. Sperm boyun ve orta parça defektleri [33].	19
Şekil 2.5. Sperm ana parça-kuyruk defektleri [33].	20
Şekil 2.6. Floresan tekniği kullanılarak görüntülenen sperm hücreleri [37].	29
Şekil 2.7. Akış sitometrisi şematiği [38].	30
Şekil 2.8. Ölçülen sperm kinematik parametreleri [39].	34
Şekil 3.1. pH ölçüm ve lökosit tayin sribi.	35
Şekil 3.2. Farklı büyütme ölçeklerinde kalibrasyon skala görüntüleri. (a) 4X (b) 10X (c) 20X (d) 40X	37
Şekil 3.3 Yapılan analizlerin akış seması ile gösterimi	40
Şekil 3.4. 10X büyütmede 0,5 saniye aralıklarla alınan görüntüler. (a) 0,5 sn, (b) 1,0 sn, (c) 1,5 sn, (d) 2,0 sn.	41
Şekil 3.5. 10X büyütmede 0,5 saniye aralıklarla alınan arka plan çıkartılmış görüntüler. (a) 0,5 sn, (b) 1,0 sn, (c) 1,5 sn, (d) 2,0 sn.	43
Şekil 3.6. 10X büyütmede 0,5 saniye aralıklarla tespit edilen spermiller. Spermillerin merkezleri mavi nokta, kafa bölgesi ise kırmızı çizgi ile gösterilmiştir. (a) 0,5 sn, (b) 1,0 sn, (c) 1,5 sn, (d) 2,0 s.	46
Şekil 3.7. 2 numaralı veri setinde elde edilen ortalama sperm sayısı ve mikrometre küpe denk gelen sperm sayısı. Kırmızı tireli çizgi ortalama değeri, yeşil tireli çizgiler ise WHO referans limitlerini göstermektedir.	47
Şekil 3.8. Ardışık 3 görüntü üzerinde sperm merkez noktaları kullanılarak elde edilen sperm rota illüstrasyonu.	49
Şekil 3.9. 10x büyütmede spermillerin farklı görüntülerdeki rotaları. Takip edilen her bir sperm farklı renk ile gösterilmiştir. (a) 0,5 sn, (b) 1,0 sn, (c) 1,5 sn, (d) 2,0 sn.	50
Şekil 3.10. Zamana bağlı takip edilen farklı uzunluklara sahip sperm rota örnekleri.	53

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ALH	Amplitude of Lateral Head (Yanal Kafa Genliği)
BCF	Beat-Cross Frequency (Çapraz Vuruş Frekansı)
CASA	Computer Aided Sperm Analysis (Bilgisayar Tabanlı Sperm Analizi)
FPS	Frame per Second (Saniye başına Görüntü)
HOS	Hipoozmotik Şişme Testi
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IM	Immobility (Hareketsizlik)
JPDAF	Joint Probabilistic Data Association Filter (Ortak Olasılıksal Veri İşleme Filtresi)
LIN	Linearity (Doğrusallık)
MAD	Mean Angular Displacement (Ortalama Açısal Yer Değiştirme)
MGG	May Grunwald-Giemsa
MIR	Maximum Intensity Region (Maksimum Yoğunluk Bölgesi)
MOT	Motility (Hareketlilik)
N	Sperm Sayısı
NA	Numerical Aperture (Sayısal Açıklık)
NP	Non-progressive Motility (İlerici Olmayan Hareketlilik)
OF	Optical Flow (Optik Akış)
PR	Progressive Motility (İlerici Hareketlilik)
SE	Standart Error (Standart Hata)
STR	Straightness Derecesi
VAP	Average Path Velocity (Ortalama Yol Hızı)
VCL	Curvilinear Velocity (Eğriçizgisel Hız)
VSL	Linear Velocity (Doğrusal Hız)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
WOB	Wobble (Salınım)

1. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Konusu

Dünya Sağlık Örgütü'nden (World Health Organization (WHO)) elde edilen verilere göre gebelik planlayan çiftlerin %15'i infertiliteden etkilenmektedir [1]. Çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin bir yıl boyunca korunmasız cinsel ilişkide bulunup gebeliğin olmaması durumuna infertilite denir [2]. Kötü beslenme alışkanlığı, stres, uykusuzluk, sigara ve alkol kullanımı gibi başlıca etkenler insanların üreme kalitesine zarar vererek infertiliteye sebep olmaktadır [3]. İnfertilitenin teşhisinde öncelikli olarak erkek üremesi kontrol edilir. Bunun nedeni olarak çiftlerin yaklaşık olarak %50'sinin erkek üremesi disfonksiyonunun mevcut olması gösterilebilir [2].

1940'lı yıllarda bazı bilim adamlarının hareketli sperm yüzdesi ve sperm hücresinin hareket hızı hakkında nesnel veriler elde etme ihtiyacından spermin işlevleri üzerine araştırma yapma gereksinimi bu alanda yapılan çalışmaların önünü açmıştır [4]. Mikroskobik inceleme gibi manuel metotlar uygulanarak yapılan standart sperm analizleri, üreme kliniklerinde veya laboratuvarlarda rutin olarak uygulanmaktadır. Bu uygulamalarda subjektif değerlendirmeler başlıca hata kaynağı olabileceğinden kantitatif sonuçlar elde edilememektedir. Analiz aşamasında elde edilen veriler kişiden kişiye değişiklik göstermemelidir. Sperm hareketi hakkında kesin ve doğru bilgiler elde edildiği takdirde, potansiyel erkek infertilitesinin teşhis ve tedavisinde yüksek başarı oranları gözlenmektedir [4].

Sperm analizinin standardizasyonuna duyulan ihtiyaç nedeni ile WHO ilk defa 1980 yılında başlayarak 1987, 1992 ve 2002 yıllarında “İnsan Semeni ve İnsan Semeni Servikal Mukus Etkileşimlerinin İncelenmesi” için el kitabı yayınlamıştır. Daha sonrasında androloji biliminin gelişmesiyle ve sperm analizinin standardizasyonunun öneminin artmasıyla el kitabının beşinci baskısı çıkarılmıştır [4]. Bu çalışmada WHO'nun beşinci baskısı olan “İnsan Semeninin İncelenmesi ve İşlemlerden Geçirilmesi” el kitabındaki veriler referans alınarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda sperm kalitesini analiz etmek için bilgisayar destekli sistemlerle görüntü işleme ve analizi yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır [5]. Bilgisayar destekli sperm analiz (Computer Aided Sperm Analysis (CASA)) sistemleri ilk olarak 1985 yılında literatürde yer almıştır [5]. CASA, sperm konsantrasyonu, canlılığı ve hareketliliği hakkında doğru, kesin

ve anlamlı veriler elde edilmesini sağlar [5]. CASA, elde edilen bir dizi sperm görüntülerinin görselleştirilerek dijitalleştirilmesi ve analiz edilmesini sağlayan doğru ve anlamlı bilgileri sağlayan otomatik bir donanım ve yazılım sistemidir. CASA sistemleri genel olarak 3 ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; görüntüyü yakalayan kamera, işleyen yazılım ve ekranlayan monitördür. CASA sayesinde görüntü işleme teknikleri kullanılarak sperm analizi gerçekleştirilir. CASA’da makroskobik ve mikroskobik yöntemler kullanılmaktadır. Makroskobik incelemede hastadan alınan sperm numunesin pipetleme yardımı ile hacmi, daha sonra strip ile pH değeri ölçülmektedir. Sperm numunesinin, rengi ve vizkozitesi göz ile analiz edilir. Makroskobik inceleme sonucunda sağlıklı olarak nitelendirilen sperm numunelerinin mikroskobik incelemelerinin yapılması için bu numuneler, pipetlenerek mikroskobik analiz için bir lamel üzerine yayılır ve spermin hareketliliği gözlenir. Bu aşamada sperm hücrelerinin hareketli olup olmadığı, hareket kabiliyetleri ve genel durumu hakkında bilgi sahibi olunur. Sperm morfolojisini incelemek adına ise özel bir boyama yöntemi olan May Grunwald-Giemsa (MGG) boyaması yapılarak yine mikroskop altında baş, boyun ve kuyruk incelemesi yapılır. Son aşamada ise Eozin-Nigrozin boyama yapılarak sperm hücrelerinin sitoplazmasının canlı olması durumuna göre koyu pembe-kırmızı, ölü olması durumunda yeşil-mavi renklerine dönüştürerek hücrelerin canlılığı kontrol edilmektedir [6]. Bu boyama yönteminde arka plan ile sperm başı arasındaki kontrast nigrozin ile artırılarak sperm hücresinin başının ayırt edilmesini kolaylaştırır [7]. Ayrıca hazırlanan preperat, testin daha sonradan kontrolünün sağlanması için saklanmasına olanak tanır [6]. Eozin-Nigrozin boyama yerine canlılığın kontrolü için sadece Eozin boyama da yapılabilir fakat bu preperat daha sonrasında saklanılıp kullanılmak için uygun değildir [6].

Mikroskobik incelemede spermin hareketliliğinin yanında morfolojik yapısı da incelenir. Spermin kinematik parametrelerinin ölçümü gerçekleştirildikten sonra analizin büyük bir kısmı tamamlanmış olur. Son olarak, sperm hücrelerinin canlılığı incelenir.

Bu çalışmada CASA yöntemi ile sperm analizi yapılarak, infertiliteyi etkileyen ve WHO tarafından referans değerleri belirlenmiş olan sperm sayısı, yine WHO tarafından tanımlanan sperm hareketleri ve hareket parametreleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Bir görüntüdeki sperm hücreleri sayılarak hacimdeki sperm sayısı bulunmuş ve bir mililitre hacimdeki sperm sayısı hesaplanarak WHO’nun belirlemiş olduğu referans aralığı ile değerlendirilmiştir. Yine WHO tarafından belirlenen fakat alt ve üst referans değeri olmayan kinematik parametreler ölçülerek literatürdeki benzer çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Gün geçtikçe teknolojinin ilerlemesi erkek infertilitesinde yapılan çalışmaların da önünü açmıştır. Yapılan çalışmalar sperm analizini etkileyen sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojik yapısında bulunan bozukluklar gibi faktörlerin daha doğru olarak incelenmesine yardımcı olarak yapılan tanıları kolaylaştırmıştır. CASA; spermin konsantrasyonunun, canlılık oranının, morfolojisinin, kinematik parametrelerinin belirlenmesi ve sperm incelemesi sırasında alınan görüntülerin dijital görüntü işleme yöntemleri ile istatistiksel olarak analiz edilmesi için tasarlanan bir sistemdir [6]. Bu sistem, kullanımı sırasında kullanıcı yardımına ihtiyaç duyar [6]. Ölçümler ve istatistiksel analizler otomatik olarak yapılırken, incelenecek numune için hazırlanan preparat, preparatın yerleştirilmesi ve analizin başlatılması için kullanıcı müdahalesi gerekmektedir [6].

CASA sistemleri geliştirilirken öncelikli hedef yapay döllemeye katkı sağlayarak insan ve hayvan üremesinin olumlu yönde etkilenmesidir [6]. Daha önceden yapılan benzer çalışmalarda boğa, damızlık at, zebra balığı sperm örnekleri CASA sisteminde incelenmiştir [7,8,9]. CASA sisteminin geliştirilmesinde öncülük eden fikirlerin ortak amacı sperm hareketinin öznel değerlendirmeden uzak test edilmesi için standartlar oluşturmaktır [6,7,10].

Sunulan tez çalışmasının ana hedefi mevcut sistemlerden farklı olarak WHO'da belirtilen tüm kinematik parametreleri inceleyen bir CASA sisteminin geliştirilmesidir. Bilgisayar Destekli Sperm Analiz çalışmamızda kullanıcı kaynaklı hatalar minimize edilerek daha doğru ve daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda spermilerin analizi için Ankara Şehir Hastanesi Onkoloji Binası Androloji-Üroloji Kliniği'nden elde edilen dijital görüntüler Python yazılım programı ile işlenmiştir.

Mevcut CASA sistemlerinde ölçülen standart parametrelere ek üremeyi olumlu ya da olumsuz yönde etkileyecek parametrelerin incelenerek literatüre kazandırılması, oluşabilecek hata oranlarını minimize ederek hata oranı düşük, hızlı, tekrarlanabilirliği yüksek ve sübjektif değerlendirmeden uzak bir sistem geliştirilmesi ve üremeyi etkileyecek yeni parametrelerle ilgili yapılacak çalışmaların önünün açılması öngörülmektedir.

1.3. Literatür Değerlendirmesi

CASA sistemi, spermilerin dijital görüntülerinin analizini, hareketliliğini ve farklı istatistiklerin kesin ve anlamlı olarak değerlendirilmesini sağlayan entegre donanım-yazılım

sistemini ifade eder [8]. Tasarlanan ilk nesil sistemlerde kullanıcı müdahalesi ile analiz manuel olarak başlatılmaktadır. CASA sistemlerinin geliştirilmesi ile kullanıcı yetkinliği artırılarak daha hızlı, kolay ve doğru sonuçlar elde edilebilmektedir.

Spermin görüntülenmesi ve sperm hareketi üzerinde 300 yılı aşkın süredir çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda üreme bozukluklarındaki tedavilere ilişkin en iyi yöntemin belirlenmesinde sperm hareketinin yüksek doğrulukla görüntülenmesi ve analiz edilmesine dayandırılmıştır. Modern sperm analiz sistemlerinin öncüsü olarak sayılabilecek ilk çalışma 1678 yılında von Leeuwenhoek tarafından ışık mikroskobu kullanılarak yapılmıştır [8].

1950'li yıllarda klasik mikroskobik görüntüleme yöntemlerinin sperm görüntülenmesi üzerine yoğunlaştırılması ile CASA sistemlerinin geliştirilme süreci başlamıştır. Bu çalışmalarda faz kontrast mikroskopların kullanımın yaygınlaşmasıyla beraber özellikle androloji çalışmalarında sperm canlılığının tespit edilebilmiştir [9]. Farklı teknikler ile CASA sistemi kullanılarak sabit hacimdeki sperm kümesi için spermin hızı ve sperm sayısı gözlenebilmiştir [8]. Ancak bu yöntemler tek bir sperm hücresi hakkında çıkarım yapılabilmesi için yetersizdir. Tek bir sperm hücresi üzerinde yapılan ilk çalışmalarda görüntüler üzerinde yapılacak metotlar manuel olup veriler alındıktan sonra yapılan analizler uzun süreli ve kullanıcı kaynaklı hatalara açık analizlerdir.

Sperm görüntülenmesi ve analizinde otomatik yöntemlerin kullanılması 1970'li yılların başına dayanmaktadır [8]. Otomatik yöntemlerin kullanıma geçmesi ve mikroskop kullanımının geliştirilmesi ile, ilk CASA sistemlerinin tasarlanmasında rol oynamıştır. 1985 yılında Katz et al., ardışık sperm görüntülerinden analiz edilecek görüntüyü yakalayıp otomatik görüntü işleme yöntemleri ile sperm hareketinin değerlendirilmesini sağlamış ve böylece ilk otomatik CASA sistemini geliştirmişlerdir [8].

1985 yılında CASA sisteminin literatüre kazandırılmasıyla birlikte, spermi genel olarak incelemektense daha detaylı inceleme çalışmaları başlamıştır. Bu çalışmalar spermin hücre sıvısı içerisindeki lokalizasyonunu belirleme, sperm hareketlerini inceleme, spermin baş ve daha sonraki aşamalarda kuyruk morfolojisini inceleme, sperm hızını tespit etme gibi sperm analizinde önemli rol oynayan parametreleri daha detaylı analiz edebilmeye yöneliktir.

Sperm hücrelerini takip edebilmek için önce sperm varlığının tespit edilmesi yani sperm sıvısı içerisinde bir spermin sperm hücresini sitoplazmik elemanlardan ayırabilmek gerekmektedir.

Sperm hücresinin CASA sistemi ile sperm takibini, lokalizasyonunu tayin eden, spermin hareketlerini değerlendiren kinematik parametrelerin uygulandığı farklı sistemler ve yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile ilgili çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

Davis et al., 1992 yılında 30 insan spermi ile gerçekleştirdikleri analizde, sperm analizini hem manuel olarak hem de iki farklı CASA sistemi ile gerçekleştirmişlerdir [10]. Video-analizlerde ilkinde yer alan görüntülerde hareketlilik ve konsantrasyon ölçümü 5 fps'de, VCL, LIN vb. temel kinematik parametrelerin ölçümü ise 15 fps'de yapılmıştır. İkinci CASA yönteminde ise temel kinematik parametrelerin ölçümü 30 fps'de yapılarak VCL, VSL ve ALH_{max} kinematik parametreleri ölçülmüştür.

1995 yılında Mortimer et al, dört sağlıklı bireyden almış oldukları sperm örneklerini inceleyerek sperm hücrelerinin hareketlerini incelemiştir. Bu inceleme sonucunda belli bir eşik değeri belirleyerek, bu eşikten hızlı hareket eden sperm hücrelerin hiperaktif sperm hareketi olarak adlandırmışlardır. Bu çalışma için ölçülen kinematik parametreler ise VCL, ALH'ın ortalama ve maksimum değerlerdir [11].

Kraemer et al., sıcaklık gibi çevresel faktörlerin sperm hızına etkilerini araştırdıkları 1998 yılında yapmış oldukları çalışmada sağlıklı erkek hastalardan aldıkları numuneler ile analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada yine VCL, VSL ve ALH_{max} değerleri ölçülmüştür [12].

Hirano et al, 2003 yılında 66 gönüllüden toplamış oldukları sperm numunelerini sperm analizini görselleştirerek gerçekleştiren bir sistem ve bir CASA sisteminde analiz etmiş, bu iki analizi birbirleri ile karşılaştırmışlardır [13]. Bu çalışmada ortalama yanal kafa genliği dışındaki temel kinematik parametrelerin tümü bu cihazlarla ölçülmüştür. Bu çalışmada amaç iki sistemi birbiri ile kıyaslamak ve birbirlerine göre doğruluğunu saptamak adına yapıldığı için herhangi bir algoritma geliştirilmemiştir.

Sloter et al., 2006 yılında 97 sağlıklı bireylerden aldıkları sperm örnekleri ile yaptıkları hali hazırda hastanelerde kullanılmakta olan CASA sistemi ile ölçümünü gerçekleştirerek yaş faktörünün spermin kinematik parametreleri ve hareketliliği üzerindeki etkisi hakkındadır [14]. Bu çalışmada temel kinematik parametrelerin tümü ölçülmüş olup sadece ortalama ALH değeri ölçülmediği tespit edilmiştir.

Akashi et al., 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada 81 sağlıklı bireyden aldıkları sperm örneklerini mevcut CASA sistemi ile analiz etmişlerdir. Bu çalışmada standart sperm analizi ile CASA sistemi ile ölçülen parametrelerin arasındaki korelasyonu gösterilerek CASA'nın pozitif etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada VCL, ortalama ALH değeri ve BCF frekansı ölçülmüştür [15].

Abbiramy et al., 2010 yılında yayınlamış oldukları yazıda, video akışında sperm hücrelerini tespit edebilen, sayabilen ve takip edebilen bir algoritma oluşturmuşlardır. Sperm hücrelerinin hızını bulmak için her bir sperm hücresinin görüntü kareleri arası değişen mesafesinin ortalama mesafesi ile çarpılması sonucu elde etmiştir. Sonuçları, algoritmanın yüzen sperm hücrelerin stabil bir şekilde takibinin yapılabildiği ve hareketli nesneleri tespit etmede %93 doğruluğa ulaşmışlardır [16]. Aynı yıl benzer metotla Leung et al., sperm kuyruğunu izlemek adına maksimum yoğunluk bölgesi (Maximum Intensity Region (MIR)) algoritması ve optik akış (Optical Flow (OF)) algoritması olmak üzere iki farklı algoritma geliştirmiştir. Bu algoritmalar Öklid uzaklığı hesaplamasında olan hataları geliştirerek elde etmişlerdir. MIR algoritması, OF algoritmasına göre %52 daha doğru sonuçlar elde etmiştir [17].

Ravanfar et al., 2011 yılında yaptıkları çalışmada spermilerin aynı boyut ve şekle sahip olmasından dolayı sperm takibi zorluğunu azaltmayı hedefleyerek takibini kolaylaştırmışlardır. Takip zorluğunu ortadan kaldırmak adına Watershed segmentasyonu ve partikül filtresi kullanarak spermeleri izlemişlerdir. Yolları boyunca çarpışan 10 sperm hücresi izlenerek kümelenmiş sperm hücrelerinde başarılı sonuç elde etmişlerdir [18].

2014 yılında Di Caprio et al., dijital holografi algoritması ile görüntülerden odak genlik ve faz haritalarını çözerek sperm hücrelerini karakterize ederek özellikle anormal yapılı sperm hücrelerinin motilitelerini tespit ederek normal yapılı sperm hücrelerinin motiliteleri ile karşılaştırmışlardır [19]. Bu hücrelerin VCL, VAP ve VSL parametreleri ölçülerek spermilerin 4 boyutlu takibi gerçekleştirilmiştir.

Elsayed et al., 2015 yılında CASA sistemini geliştirerek mikroakışkan sistemlerde parlak alan mikroskobu ve düşük kare hızlı kameralar olmadan bile sperm hücresinin tespitini önemli ölçüde iyileştirmişlerdir [20].

Urbano et al., yaptıkları 2016 yılındaki çalışmalarında ortak olasılıksal veri işleme filtresi (joint probabilistic data association filter (JPDAF)) kullanılarak var olan CASA sistemlerinin aksine spermilerin simultane olarak hareketinin tespiti sağlanmıştır. JPDAF

algoritmasını, hızlandırılmış mikroskobik görüntülerde sperm hücrelerini otomatik olarak izlemek ve hareket parametrelerini örnek seyreltmesi yapılmadan ölçülmesine olanak sağlamışlardır [21].

Li et al, 2020 yılında yaptıkları çalışmada otomatik eşik değer segmentasyon yöntemi kullanarak %96,5 doğruluk oranında sperm tespiti yapmışlardır [22].

Bu çalışmalarda farklı yöntemlerle sperm hareketleri incelenerek hızları ölçülmüştür. Yapmış olduğumuz çalışmada gerçekleştiren CASA sistemi ile ilgili ve benzer parametrelerin ölçülmesi ve benzer yöntemlerin kullanılmasından dolayı Sloter et al., Kraemer et al., Di Caprio et al, Hirano et al., Akashi et al., Mortimer et al ve Davis et al., yapmış oldukları çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

1.4. Genel Bakış

İlgili tez çalışması 4 ana başlıktan oluşmaktadır. İlk bölümde çalışmanın konusuna, amacına, önemine ve CASA sistemi kullanılarak gerçekleştirilen sperm analizleri ile ilgili literatür araştırmalarına yer verilmiştir. Tez çalışmasının ikinci kısmı ise kuramsal bilgiler adı altında tezi oluşturan kavramların açıklamalarını içermektedir. Üçüncü bölümde tez boyunca kullanılan sperm ölçüm parametreleri ve ölçümde kullanılan yöntemler, çalışma sonucunda elde edilen bulgular anlatılmıştır. Tezin son bölümünde ise elde edilen tüm sonuçlar değerlendirilerek literatürdeki örnekler ile karşılaştırılmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında sperm analizini CASA sistemi ile gerçekleştirerek sperm görüntülerinden elde edilen veriler ile 14 kinematik parametre ölçülerek kesin ve anlamlı değerlendirmeler sağlayan bir yazılım sistemi geliştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, iç ve dış genital organlar olmak üzere iki farklı kısımda incelenir [23].

- Dışarıdaki genital organlar; penis ve skrotumdur.
- İçerideki genital organlar;
 - Testisler,
 - Epididim,
 - Funikulus spermatikus,
 - Duktus deferans (vas deferans),
 - Glandula vezikuloza veya glandula seminalis,
 - Glandula prostatika yani prostat,
 - Glandula bulbouretralis (Cowper veya bulboüretral bezler),
 - Elejülat (semen),
 - Duktus ejakulatorius

Bazı kaynaklara göre penis iç kısım sayılırken bazı kaynaklara göre dış kısım olarak nitelendirilir. Erkek üreme sistemindeki bu kısımların ortak işlevi birçok bez ve kanal ile birleşerek sperm oluşturmak, oluşan spermi depolamak ve spermin ejakülasyonunu sağlamak için önemli androjenler üretmek, üretilen spermi döllenme için dişi vajenine iletmektir [11].

İçinde testis, epididim ve funikulus spermatikus'un bir bölümü bulunduran torba şeklindeki yapıya skrotum adı verilir [24]. Skrotum, sıcak havada genişir, soğuk havada büzülür. Bu durum ısı değişikliğinin sperm hücreleri üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için ısı muhafazasının sağlanmasına yardımcı olur. Ergenlik ile birlikte skrotumun içerisinde yer alan testistlerde sperm hücreleri ve testosteron hormonu üretilmeye başlanır. Testislerin ekzokrin, sperm üretmek ve endokrin, hormon salgılamak, olmak üzere iki ana görevi vardır [25]. Her iki testisin içerisinde küçük ve kıvrımlı seminifer tübül adı verilen sperm

kanalcıkları bulunur. Testisteler fonksiyon ve yapı açısından iki temel bölümden oluşur; seminifer tübül ve testosteron salgılayan leydig hücreleri. Seminifer tübüller, testisin %80-90'ını oluşturan sertoli hücreleri ve germ hücrelerinden oluşur. Leydig hücreleri ise testisin %5-12 oranında hacmini oluştururlar ve genç erkek bireylerde ortalama 700 milyon leydig hücresi bulunur.

Penis gövde ve baş olmak üzere iki kısımdan oluşur ve ortasından geçen idrar kanalına üretra adı verilir. Üretradan hem idrar hem de meni dışarı atılır. Penis, elastik bir yapıdan oluşur ve birbiriyle inkomplet bir septum aracılığıyla iki kavernöz cisimden oluşur. Bu yapı belli bir uzama ve genişlemeye sahip tunica albuginea ile çevrilidir. Üretrayı çevreleyen spongios cisim, tunica albugineanın dışında kalır. Kavernöz cisimlerin içi, düz kas ve konnektif doku ile çevrili sinüzoidlerle doludur. Sinüzoidler birbirleriyle bağlantılıdır ve böylece tüm kavernöz cisim tek fonksiyonel bir yapı halindedir. Penis, internal iliak arterlerden kaynağını alan pudental arterler ve penil arterler ile kanlanır. Ereksiyonda asıl rol oynayan arter, penil arterin uç dalından biri olan kavernöz arterdir. Venöz sistem, sinüslerden başlayan venüller, tunica albuginea altında plexus oluşturur ve subtunikal venler tunicayı oblik olarak geçerek dorsal vene ve daha sonra periprostatik plexusa dökülür.

Olgunlaşan spermilerin depolandığı yere epididimis adı verilir ve epididimisin genişleyerek devam eden kısmına duktus deferans denir [24]. Duktus deferans ise sperm iletiminde görev alır. Spermin beslenmesini sağlayan ve vajendeki asidik ortamı nötralize eden sıvının salgılandığı yer ise seminal veziküllerdir [26]. Prostat ise spermin hareketini sağlar ve seminal veziküllerin yaptığı gibi asidik ortamı nötralize eden sıvı salgılar. Bulboüretral bezler ise üretradaki idrarı nötralize eder ve üretrayı kayganlaştırır. Seminal vezikül ve prostat bezlerinden gelen sıvılar ejakülatör kanallarda toplanarak burada sperm ile karışırlar. Burada oluşan semeni ejakülat esnasında üretraya taşır ve oluşturulan spermier üretradan dışarı atılır. Semen yani ejakülat, epididim, duktus deferens, vesikula seminalis, prostat ve bulboüretral salgılarının karışmasıyla oluşur ve içerisinde sperm hücreleri bulunan sıvıdır. Özel kokulu ve yapışkan olan bu sıvı yaklaşık 3-4 ml olup içerisinde 300-400 milyon sperm bulunur [27]. Ejakülatın %10'unu spermier oluştururken geri kalan kısmı bezlerden üretilen seminal sıvılar oluşturur [27].

2.2. Spermatogenez

Spermatogenez iki aşamadan oluşur; sperm sentezi sağlanan spermatositogenez ve oluşan sperm hücrelerinin fonksiyonlarını geliştirilmesi ise spermiyogenez olarak adlandırılır. Spermatositogenez, ergenlik sonrası folikül uyarıcı hormon ve testosteron hormonu ile testislerin seminifer tübüllerinde sürekli olarak oluşur. Spermatogenez, Leydig hücreleri, sertoli hücreleri, peritübüler kanallar, gamet hücrelerinden oluşan parakrin ve endokrin regülatörler yardımıyla oluşan karmaşık bir süreçtir [28]. Seminifer tübüllerde bulunan seroli hücreleri ve leydig hücrelerinin ürettiği testosteron hormonu üretimiyle spermatogenez için gerekli olan düzenleyici molekülleri ve besinleri üretir. Leydig hücreleri, lütenizan hormonu (LH) ile uyarılırken, sertoli hücreleri ise folikül-stimulan hormon (FSH) uyarılır. Sertoli hücreleri; gamet hücreleri gelişirken fiziksel ve beslenme açısından destek olur ve spermiyogenezde atılan sitoplazmanın fagositozunu gerçekleştirir. Spermatogenez dolaylı olarak testosteron ve FSH hormonu ile düzenlenir.

Spermatogenez 3 ana fazdan oluşur;

- Spermatositogenez
- Mayoz Bölünme
- Spermiyogenez

Spermatogenez, tübüllerdeki kök hücrelerin mitokondrilerinin bölünmesi ile başlar ve bu oluşan hücrelere spermatogonyal kök hücre denir. Kısaca spermatogenez, diploid spermatogonyal hücresinin testisin seminifer tübüllerinde habloid spermatozooya doğru geliştiği olaylar bütünüdür. Spermatogonyal hücreler kendilerini yenileme özellikleri sayesinde haploid yapılı spermatozoa hücresine dönüşürler. Bu farklılaşma ve gelişme süreci insanlarda ortalama 74 gün kadar sürer.

2.2.1. Spermatositogenez

Spermatogonyal hücreler üçe ayrılır; koyu Tip A, açık Tip A ve Tip B.

Koyu tip A, küçük ve kubbelidir Oval çekirdeğe sahiptir. Heterokromatini fazla olduğundan çekirdeğe koyu renk verir. Bu hücreler hücre bölünmesine dahil olmazlar fakat mitoz bölünerek açık Tip A hücrelerini oluşturur [19,20].

Açık Tip A, çift çekirdeği olduğundan çekirdek görünümü hariç koyu Tip A ile aynıdır. Bu hücreler testosteron ile uyarılınca çoğalır ve mitoz bölünerek yeni açık renkli Tip A ve Tip B spermatogonyal hücrelerini oluştur [19,20].

Tip B, açık Tip A'ya benzerlik gösterir fakat çekirdeği daha yuvarlak ve merkezdedir. Spermatogonyal hücreler mitoz bölünerek Tip A Spermatogonyal hücreleri oluştururlar. Tip B Spermatogonyal hücreye dönüşemeyen Tip A'lar ana hücre olarak kalır. Tip B'ye dönülen Spermatogonyal hücreler mayoz bölünme sürecine geçer ve spermatositogenez tamamlanır.

2.2.2. Mayoz bölünme

Spermatogenezde birinci fazda Tip A spermatogonyal hücreler 4 defa mitoz bölünerek 16 adet Tip B spermatogonyal hücre oluşturur. Oluşan bu hücreler sertoli hücrelerine doğru ilerler. Sertoli hücrelerin yüzeyleri birbirlerine sıkıca bağlanarak bariyer oluştur. Ortalama 24 gün sonra bu bariyeri geçen spermatogonyal hücreleri büyüyerek primer spermatositi oluşturur [19,20].

Tip B hücrelerinin bölünmesiyle oluşan hücreler ise birinci mayozun profaz evresini başlatırlar. Bu evre 22-24 gün kadar sürecektir olan oldukça uzun bir evredir [29]. Profaz evresinin sonunda çekirdek zarı kaybolur ve tetradlar metafaz ekvatoruna dizilirler. Anafazda her bir homolog kromozom çifti ayrılır ve karşı kutba geçer. Bu nedenle telofaz evresinde kromozom sayısı yarıya iner [30].

24 günün sonunda her bir primer spermatosit hücresi iki adet sekonder spermatosit oluşturarak bölünür. Bu bölünmeye mayoz bölünme denir. Bölünme 46 adet DNA kromozomun replike olmasıyla başlar. 46 kromozomun her biri çift kromatitli ve sentromerlerinden birbirlerine bağlı şekildedirler. Mayoz bölünme sırasında primer spermatosit ikiye bölünerek 23'er kromozom ile iki grup halinde sekonder spermatositleri oluşturur. Her bir kromozom 2 kromatitten oluştuğu için iki ayrı spermatosite giderler. Sekonder spermatosit insanda 6 saat sürer [31].

İkinci mayozun profazı 2-3 gün içerisinde gerçekleşerek ikinci mayoz bölünme meydana gelir. Metafazda kromozomlar sentromerlerden bölünür ve kromatitlerine ayrılarak iki farklı 23 kromozom oluşur. Anafaz evresinde 23 kromozom bir spermatite, diğer 23 kromozom diğer spermatite giderek telofaz evresinde haploid kromozomlu 2 adet spermatit oluşmuş olur.

Sonuç olarak her spermatit hücresi 23 kromozom taşır ve ilk spermatogoniumun yarısı kadar gen bilgisi taşır.

2.2.3. Spermiyogenez

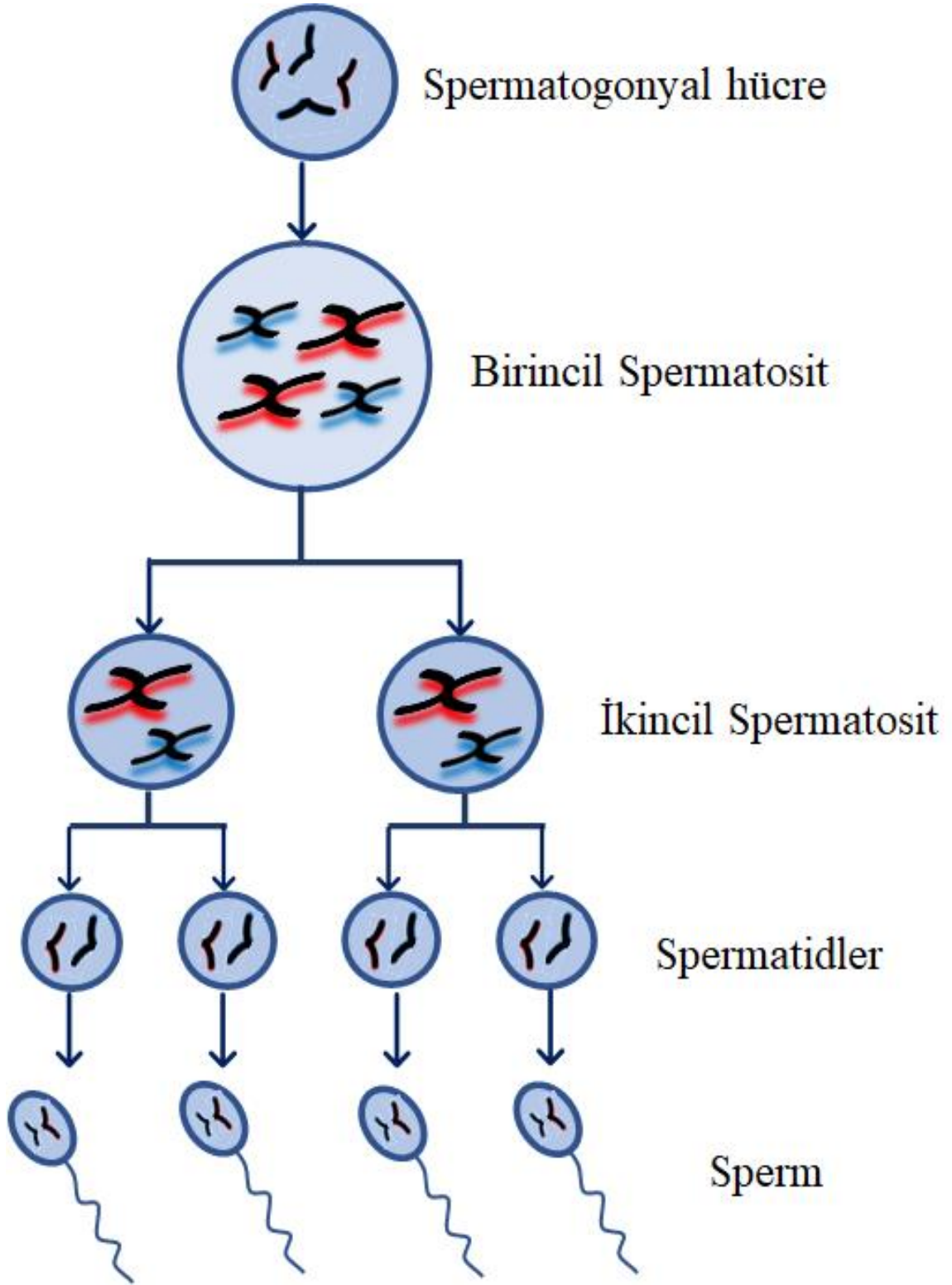
Spermatit hücresinin spermatozoaya dönüştüğü mayoz evresinden sonraki evreye spermiyogenez denir (Şekil 2.1). Mayoz evresinden sonra birkaç hafta içerisinde her bir spermatid hücresi kendisini çevreleyen sertoli hücresi tarafından beslenerek şekillenir ve spermatozoona dönüşür [32]. Bu dönüşüm sırasında sitoplazmasının bir miktarını kaybeder, çekirdek kromatini yer değiştirerek sperm hücresi başı oluşur, kuyruk gelişir ve sperm hücresi oluşur.

Özetle spermiyogenezde;

- Akrozom oluşumu,
- Çekirdek yoğunlaşması ve uzama,
- Kuyruğun (flegellum) gelişmesi,
- Sitoplazma organizasyonu,
- Spermiyasyon gerçekleşir.

Seminifer tübüllerdeki spermiyogenez, sitoplazma kaybı gerçekleştirerek çekirdek içinin yoğunlaşmasına, flagellum ve akrozomal kapağın oluşumu gibi sperm hücresinin anatomik olarak farklılaşmasının son aşamasını oluşturur. Daha sonra epididim içerisinde sperm hareketlilik ve dölleme yeteneği kazanır. Yine epididim içerisindeki fagositoz kalan spermi temizler. Seminal sıvı, prostat bezi ve sperm kesecikleri tarafından sentezlenir. Ejekülasyon ise sperm plazması ile beraber epididimustan vas deferens yoluyla ütretya giden spermin düz kaslar tarafından itilmesi ile meydana gelir.

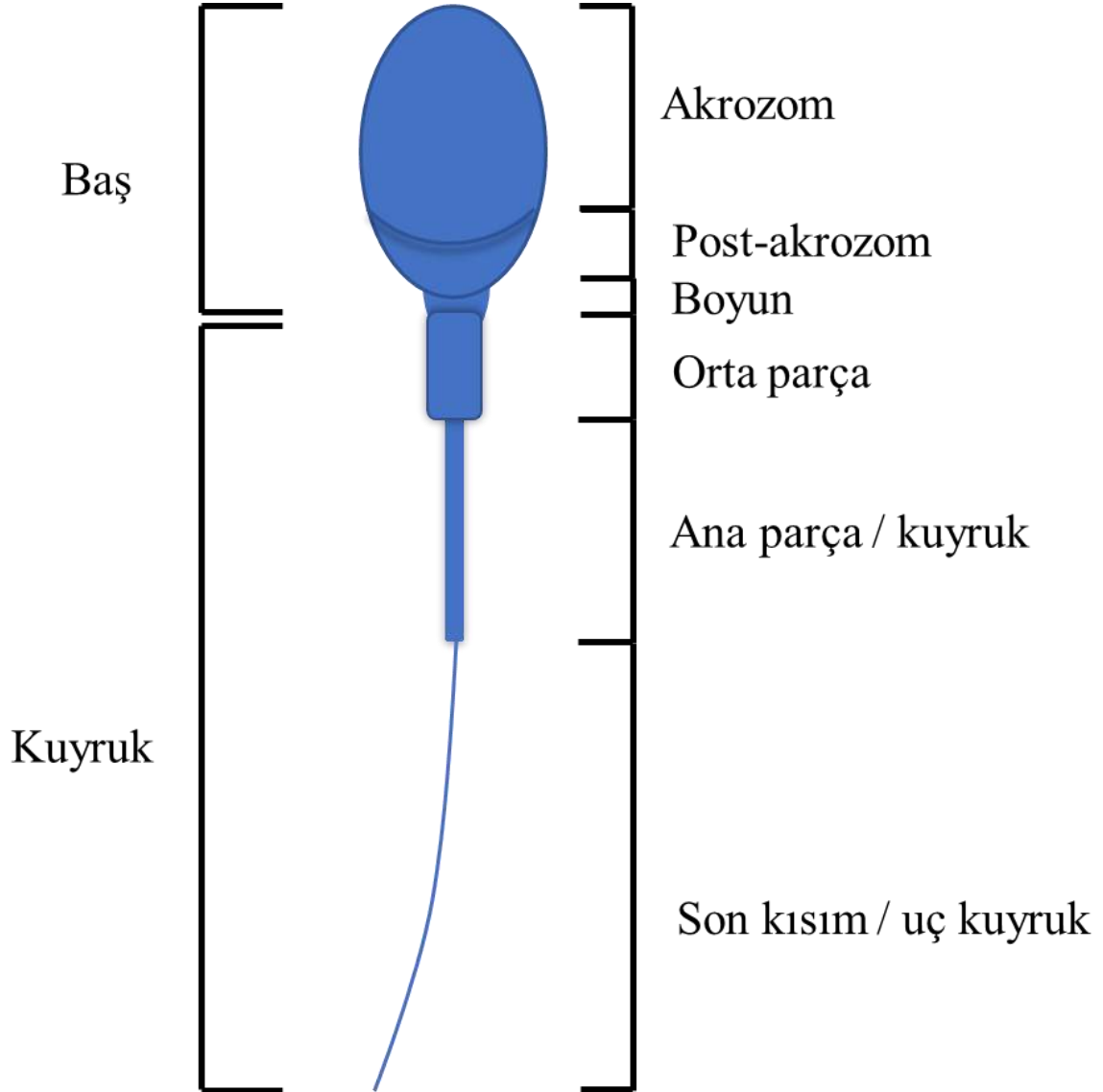
Seminifer epitelden, spermatozoanın salınımına spermiyasyon denir. Spermatozoonun salınımı sırasında baş sertoli hücresinden aktif olarak atılarak fask şekilli sitoplazma parçası ayrılır. Spermatozoon serbest hale gelir. Yeni salınan sperm hücresi seminifer tübülden sertoli hücrelerinden salgılanan sıvı içerisine ilerler ve artık hareketli hale geçer. Normal bir sperm hücresi 1-4 mm/dk hız ile ilerler [32].



Şekil 2.1. Spermatogenez aşamaları [33].

2.3. Sperm Morfolojisi

Olgun bir insanın spermatozoonu baş kısmı, bağlantı parçası, orta parça (7 μm), esas parça (40 μm) ve son kısım (5 μm) olmak üzere 5 parçadan oluşur ve 60 μm uzunluğundadır [29].



Şekil 2.2. Sperm hücresi kısımları [34].

2.3.1. Bağlantı parçası

Sperm kuyruğunu oluşturan 4 parçadan ilk kısmına bağlantı parçası denir. İçerisinde bir miktar sitoplazma bulunabilir.

2.3.2. Baş kısmı

Olgunlaşmış sperm hücresinde baş kısmında yoğunlaşan çekirdek taşınır. Spermin flegellası yani kuyruğu feritlizasyonu başlatmak için spermin taşınmasını sağlar. İnsan sperminin kafa yapısı ön kısımdan bakıldığında ovoid, yan kısımdan bakıldığında hafif piriform yani armuda benzer bir yapıdadır. Temel kısmı kalın, uç kısmına doğru ince ve uzundur. Bir sperm hücresinin kafası 4-5 μm uzunluğunda, 2,5-3,5 μm enindedir [35]. Çekirdek baş kısmının büyük bir bölümünü oluşturur ve çekirdeğin üstü akrozom ile örtülüdür. Akrozom baş ve ekvatoryal bölge olarak iki kısımdan oluşur. Akrozom denilen kısım Şekil 2.2’de görüldüğü üzere spermin uç kısmında membran yapıda ve kep şeklinde çekirdeği koruyan bir yapıdır, baş kısmının %40-70’ini oluşturmaktadır [36]. Akrozom içerdiği hiyaluronidaz, nöraminiaz, arilsülfataz ve akrozin gibi eritici enzimler sayesinde spermin döllenme sırasında yumurta zarını eriterek hücre içine girmesine yardımcı olur [32]. Özetle; sperm başının düzgün bir şekli ve oval bir yapısı olmalıdır. Baş kısmının 40-70%’sini akrozom kaplamalıdır ve akrozomda ikiden fazla vakuol bulunmamalıdır. Vakuol ise sperm başının %20’sinden fazlasını kaplamamalıdır.

2.3.3. Orta parça

Orta parça 5-7 μm uzunluğunda ve yaklaşık olarak sperm başıyla aynı uzunlukta olmalıdır [37]. İnce ve sınırları düzgün yapılı olmalıdır. Sperm başı ile aynı eksen üzerinde hizalanmalıdırlar.

2.3.4. Esas parça

Esas parçaya geçildikçe spermin kuyruk kısmı giderek inceler, orta parçadan daha ince olmalıdır ve 40 μm uzunluğundadır [38]. Esas parçanın başı ve sonu aynı kalınlıkta ve ince olmalıdır. Oransal olarak sperm başının uzunluğunun 10 katı kadar uzunluğa sahip olmalıdır. Kuyruk kısmı çok keskin dönüşler yaparak keskin kırılımlar sergilememelidir.

2.3.5. Son parça

Esas parçadan sonra gelen kuyruk bölümünün en son kısmıdır ve 5-7 μm uzunluğundadır [23].

2.4. Sperm Defektleri

Sperm hücresinin her bir parçasının belli bir oranı bulunmaktadır (Tablo 2.1) ve bu oranlar içerisinde yer alırsa normal sperm hücresi olarak değerlendirilir. 2010 yılında WHO, CASA sistemini kullanarak Papanicolaou boyaması ile sperm morfolojisine belli standartlar getirmiştir.

77 adet spermin baş kısmı analiz edilerek standartların Tablo 2.1’de verilen şekilde, 74 adet spermin orta parça ve kuyruğu analiz edilerek standartların Tablo 2.2’de verilen şekilde olması gerektiği belirlenmiştir. Defektler ise yine baş defektleri, boyun-orta parça defektleri ve ana parça defektleri olarak sınıflandırmıştır [6].

Tablo 2.1. Sperm başı morfolojisi standartları [6].

Uzunluk	4,1 μm , %95 CI 3.7–4.7
Genişlik	2,8 μm , %95 CI 2.5–3.2
Uzunluk/Genişlik Oranı	1,5, %95 CI 1.3–1.8

Tablo 2.2. Sperm orta parça ve kuyruk morfolojisi standartları [6].

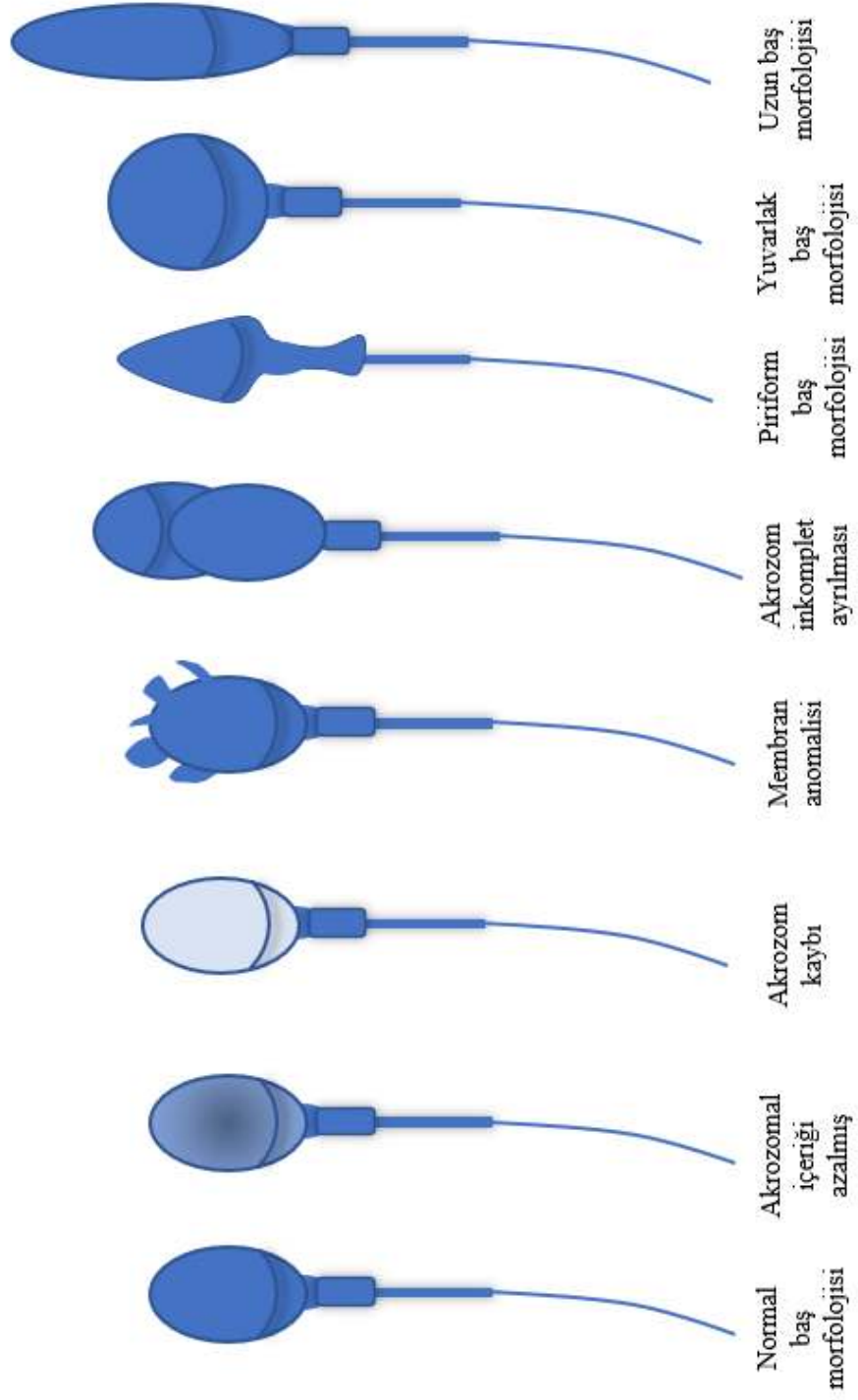
Uzunluk (orta parça)	4,0 μm , %95 CI 3.3–5.2
Genişlik (orta parça)	0,6 μm , %95 CI 0.5–0.7
Uzunluk (kuyruk)	45 μm

2.4.1. Baş kısmındaki defektler

Spermatogenezis sırasında yapılsak bozukluklar kaynaklı ortaya çıkar ve bu defektler sperm fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Baş kısmındaki defektler (Şekil 2.3) başın şeklini,

Akrozom bölgesini ve çekirdeğe ait olarak sınıflandırılabilir. Akrozoma ait defektler, spermin gelişimi-farklılaşması, hücre zarının dış etkenlerden dolayı veya yaşlanma sonucu yapısının bozulmasından dolayı ortaya çıkabilir. Baş yapısındaki defektler sperm hücresinin DNA'sında hasar olduğunun bir göstergesidir. Baş yapısındaki hasarlar ve defektler fertilizasyon yeteneğini olumsuz yönde etkiler. Yapılan çalışmalarda küçük akrozoma sahip sperm hücrelerinde, hücre ölümüne daha yatkın olduğu ortaya koyulmuştur [39].

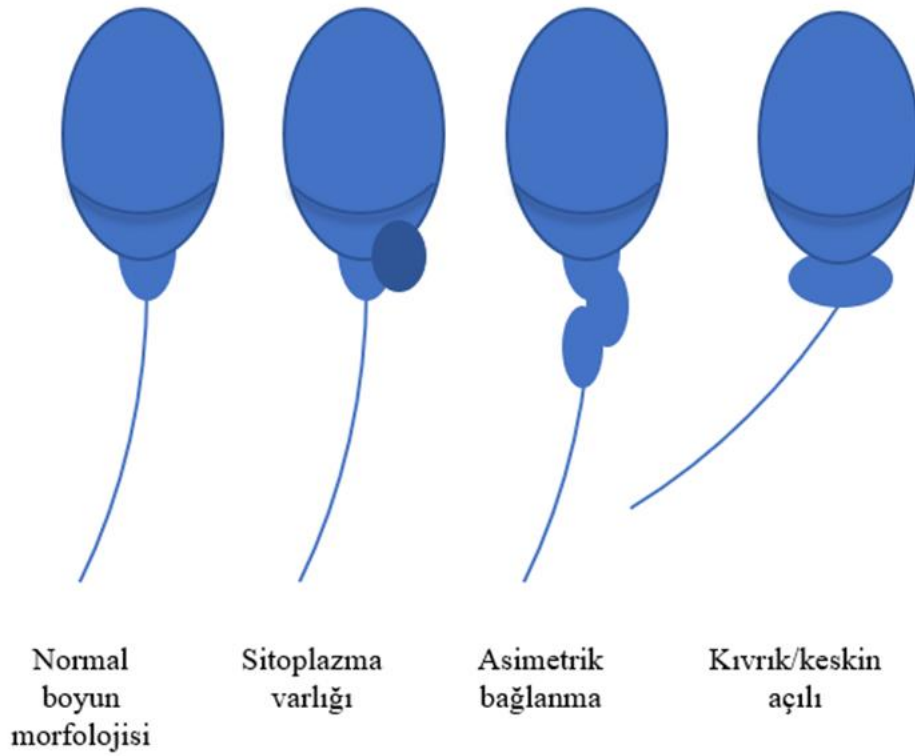
- Normalden büyük olması (uzunluğu 5-6 μm 'den fazla, eni 2,5-3,5 μm 'den fazla),
- Normalden küçük olması olması (uzunluğu 5-6 μm 'den fazla, eni 2,5-3,5 μm 'den az),
- Sivri olması,
- Çift başlı (kuyruğu tek baş kısmı çift) olması,
- Armuta benzer yapılı (piriform) olması,
- Yuvarlak olması,
- Amorf (şekilsiz) yapıda olması,
- İki'den daha fazla vakuole sahip veya vakuolün baş kısmının %20'sinden fazla kısmında yer alması,
- Post-akrozomal bölgede vakuol varlığı bulunması,
- Akrozomun olması gereken orandan küçük, büyük ya da deforme olması (baş kısmının %40'ından küçük, %70'inden büyük olmamalı),
- Çift başlı olması ya da bunlara benzer kombinasyonlara sahip olmaları.



Şekil 2.3. Sperm baş kısmı defektleri [40].

2.4.2. Boyun ve orta parça defektleri

- Orta parçanın baş kısmına asimetrik bir şekilde başlanması,
- Kalın veya düzensiz olmaları,
- Keskin bir aı ile kıvrım yapmış olmaları,
- Anormal derecede ince olması ya da bunlara benzer kombinasyonlara sahip olmaları (şekil 2.4).

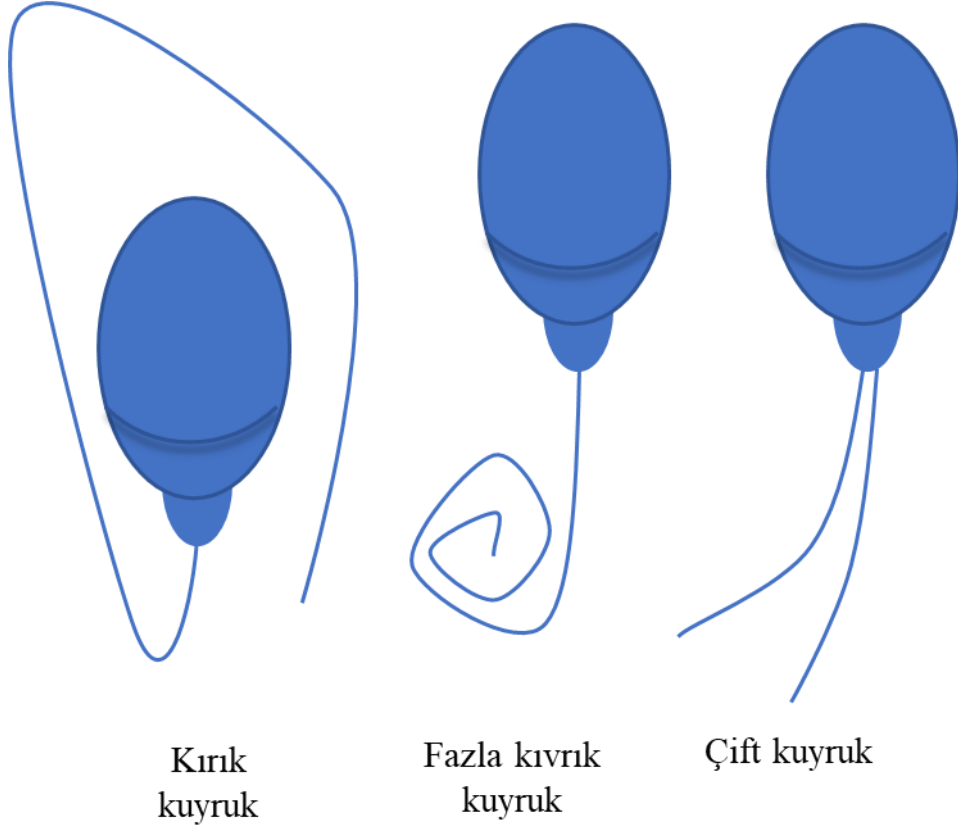


şekil 2.4. Sperm boyun ve orta parça defektleri [40].

2.4.3. Ana parça-kuyruk defektleri

- Normalden kısa olması,
- Birden fazla sayıda olması,
- Kırık olması,

- Kesin bir açı ile kıvrılmış olması,
- Sarmal yapıda olması ya da bunlara benzer kombinasyonlara sahip olmaları (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Sperm ana parça-kuyruk defektleri [40].

Genelde orta parçaya ait bir defekt olmakla beraber yukarıdaki defektler dışında aşırı rezidüel sitoplazma (ARS) yani bol miktarda, düzensiz, sperm başının üçte biri kadar ya da daha geniş sitoplazmalı olması da bir defektir [6].

2.5. Ereksiyon

Ereksiyon 3 temel aşamadan oluşur;

- Arteryal genişleme,
- Kavernozel genişleme,
- Venöz sıkışma.

Penis, flask haldeyken kavernöz cisim içindeki sinüsler kontrakte haldedir ve venöz sistem açıktır. Ereksiyon sırasında arteriyel genişleme oluşarak, gevşemiş sinüsler içine kan dolar, tam genişleyen sinüsler ile tunika arasında venüller sıkışarak venöz dönüş azalır ve ereksiyon oluşur [41].

2.6. Ejekülasyon

Ejekülasyon ile oluşan ejakülat, sperm ve seminal sıvının toplamından oluşur. Ejekülasyon seminal sıvı ile birlikte epididim vas deferens aracılığıyla penil üretraya giden sperm hücrelerinin düz kaslar tarafından koordineli olarak uyarılması ve itilmesinden kaynaklanır [42]. Adrenerji nöronlar, vas deferens ve aksesuar bez asinilerinin düz kasların kasılmalarını tetikler ve spermle birlikte seminal sıvının penisin dışına itilmesi sonucu oluşur.

2.7. Sperm Parametreleri

2.7.1. Sperm Motilitesi

Spermin hareketliliği yani motilitesi (MOT) iki ayrı parametreye bağlıdır. Bunlardan ilki ileri hareketlilik olarak adlandırılan progresif motilite (PR), diğeri ise yerinde hareket olan nonprogresif motilitedir (NP). Hareketliliğin yanı sıra spermelerde hareket olmamasına hareketsizlik yani immobilité (IM) denir. Sperm hücreleri 37 °C’de 25 µm/s’den hızlı gözlenirse ilerici hareketlilik gösterdiği, 25 µm/s’den yavaş hızlarda tespit edilirse non progresif hareketli sperm hücresi olarak adlandırılır. Bir sperm hücresinin hareketli sayılabilmesi için 5 µm/s’den daha hızlı, hareketsiz olarak adlandırılabilmesi için 5 µm/s’den daha yavaş hıza sahip olmalıdır.

Progresif ve nonprogresif hareketliliğin toplamı sperm hareketliliğini belirtir. Örneklemede sayılan hücrelerin hareketli sayılabilmesi için, %32’si ileri hareketliliğe sahip olması ve toplam hareketliliğin %40 oranında olması gerekmektedir. Ejekülasyondaki ileri hareketlilik sperm sayısının belirlenmesi infertilite için önemli rol oynamaktadır [43].

İlerici hareketlilik yüzdesi; 25 µm/s’den hızlı olan spermelerin sayısının toplam sperm hücre sayısına yüzdesel olarak oranlanması ile bulunur (Eşitlik 2.1).

$$\frac{N_{PR}}{N_{Toplam}} \times 100 \quad (2.1)$$

İlerici olmayan hareketlilik yüzdesi; 25 µm/s'den yavaş olan spermilerin sayısının toplam sperm hücre sayısına yüzdesel olarak oranlanması ile bulunur (Eşitlik 2.2).

$$\frac{N_{NP}}{N_{Toplam}} \times 100 \quad (2.2)$$

Hareketlilik yüzdesi; 5 µm/s'den hızlı olan spermilerin sayısının toplam sperm hücre sayısına yüzdesel olarak oranlanması ile bulunur (Eşitlik 2.3).

$$\frac{N_{PR+NP}}{N_{Toplam}} \times 100 \quad (2.3)$$

Hareketsizlik yüzdesi; 5 µm/s'den yavaş olan spermilerin sayısının toplam sperm hücre sayısına yüzdesel olarak oranlanması ile bulunur (Eşitlik 2.4).

$$\frac{N_{IM}}{N_{Toplam}} \times 100 \quad (2.4)$$

Sperm motilitesini incelemek için en doğru zaman ejakülasyondan 30 dakika sonra ama mutlaka 60 dakikadan öncesidir. Bu süre spermin ortam ıslısından, değişen pH derecesinden ve fazla sıvı kaybından dolayı hücrelerin dehidre olup hareketliliği olumsuz yönde etkileyecek faktörleri sınırlandırmak için uygundur.

2.7.2. Sperm Vitalitesi

Spermilerin vitalitesi olarak adlandırılan canlılığı, ilerici hareketli sperm sayısının %40 oranından daha az olduğu durumlarda sperm kalitesini belirlemede önem taşımaktadır. Vitalite, genel olarak sperm hücrelerin membranlarının bütünlüğü ile özdeşleşir. Örneklemdeki hata oranı hariç ölü sperm hücrelerinin sayısı, hareketsiz sperm sayısını geçmemesi gerektiğinden, sperm vitalitesinin ölçümü sperm motilite testini de teyit

etmektedir. Bunun nedeni canlı sperm hücrelerinin sayısının normal şartlarda hareketli sperm sayısının üstünde olmaması gerektiğindendir. Sperm hücrelerinin canlılığı çeşitli hücre boyalar (Eozin-nigrozin, Giemsa vb.) ile boyanarak belirlenebilir. Hücreler boyanarak boyayı tutma oranı veya hipotonik şişme testiyle hücre membranları sağlam olanlar belirlenir. Ölü hücrelerde, membranlarının hasarlı olmasından dolayı boyanın hücre içine girmesine izin verirler. Canlı ve hasarsız membrana sahip hücreler ise boyaların membranın içine penetre olmasına izin vermez. Böylelikle canlı ve ölü hücreler birbirinden ayrılır. Sperm analizi için sperm numunesinin belli bir oranda sıvılaşması için beklenir. Spermilerin sıvılaşmasına likefaksiyon adı verilir. Likefaksiyona uğrayan hücrelerin canlılık derecesini ölçerken ideal değerlendirilme süresi 30. Dakikadadır. Yalnız, ısı değişikliklerinden ve dehidratasyonun yaratabileceği olumsuz etkileri azalmak adına ejakülasyondan maksimum 1 saat içerisinde değerlendirilmenin yapılması gerekmektedir. Hareketsiz bir sperm hücresinin ölü ya da canlı olup olmadığını saptamak sperm kalitesini belirleyen bir orandır. Sperm hücresinde canlılık ve hareketlilik beraber değerlendirilir. Chemes ve Rawe, 2003, hareketsiz fakat canlı hücrelerin oranının yüksek olmasını sperm kuyruğundaki yapısal bozuklukların göstergesi olabileceğini düşünmektedir [44].

Sperm hücrelerini boyarken eozin-nigrozin kullanılmasıyla beraber arka planla sperm hücresinin başı arasında kontrast oluşturulur. Bu kontrastı oluşmasında nigrozin etkilidir. Ayrıca hazırlanan preparatlar analizin tekrar tekrar değerlendirilmesi ve kalite kontrolü amacıyla saklanmasına olanak tanır.

Eozin-nigrozin boyama dışında bir de yalnızca eozin kullanılarak boyama yapılır. Bu yöntem diğer yöntemle kıyasla daha basit ve hızlı olmasına rağmen ıslak preparatlar olduğundan hazırlanan preparatlar eozin-nigrozin yönteminde olduğu gibi uzun süre saklanamaz.

İki yöntem içinde boyama sonucunda kırmızı veya koyu pembe başlı sperm hücreleri ölü, beyaz duruma göre yeşil başlı sperm hücreleri ise membranı sağlam yani canlı sperm hücreleri olarak değerlendirilir. Membranı sağlam, canlı hücrelerin oranı %58 olmalıdır.

Yukarıda açıklanan yöntemler dışında vitalite ölçümünde hipoozmotik şişme testi (HOS) de kullanılır. Bu yöntem sperm hücrelerinin boyanmasından kaçınılan örneğin mikroenjeksiyon (ICSI) gibi durumlarda yararlı bir yöntemdir. HOS'da sağlam membranlı hücreler hipoozmotik ortamda 5 dakika bekletildiğinde şişer ve 30 dakikalık süreçte hücreler stabilize olur. Bu durumda tedavi amaçlı sperm analizi gerçekleştirildiği durumlarda beş

dakikalık inkübasyon süresi yeterli olurken rutin tanı işlemlerinde otuz dakikalık inkübasyon yeterli olmaktadır. Hipoozmotik strese maruz bırakılan hücrelerin kuyruk yapısı kıvrılır veya şişer. Test esnasında bu tip hücreler de canlı sayılır.

Bu yöntemde de diğer iki eozin testi yönteminde olduğu gibi sağlam membrana sahip hücrelerin oranı %58 olmalıdır.

2.7.3. Sperm Sayısı

Bir ejakülattaki toplam sperm hücresi sayısı ve konsantrasyonu üremeyi olumlu yönde etkilemek için önemli olmakla beraber kesin bir sperm analizi yapılmasına olanak sağlamaz. Sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu aynı parametreler olmamakla beraber aynı anlamı da ifade etmez. Sperm konsantrasyonu, birim hacimdeki sperm sayısını ifade etmekte olup sperm sayısı ve sperm sıvısının toplamını ifade eden bir parametre olarak değerlendirilebilir. Total sperm sayısı ise bir ejakülasyon sırasındaki sperm sayılarının toplamıdır ve sperm konsantrasyonunun sperm hacmi ile çarpımı ile de elde edilebilir.

Tablo 2.3. WHO referans aralıkları [6].

Bir ejakülattaki toplam sperm sayısı	39-928 M
Ejakulat hacmi	1,5-7,6 ml
Sperm konsantrasyonu	15-259 M/ml
Toplam motilite	%40-81
İlerici motilite	%32-75
Sperm morfolojisi	%4-48

WHO'nun sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu için belirlemiş olduğu aralıklar Tablo 2.3'de görülmektedir. Bu verilere göre bir ejakülatta oluşan 1,5-7,6 ml arasındaki sperm hacminin içerisinde toplamda 39-928 milyon adet sperm hücresi bulunması gerekmektedir. Bir mililitrelik örnek incelendiğinde ise 10-259 milyon sperm sayımı yapılması, incelenen numunenin standartlara uygun olduğunu göstermektedir.

Sperm sayımı sırasında çeşitli kameralar kullanılabilir. Bu kamera yardımıyla mikroskopa yerleştirilen belli bir alan ile gridlenmiş lameller kullanılır. Yeterli sayıda sperm hücresini saymak örneklem hatalarını azalmak için önem arz eder. Aynı numuneden alınan ikişer kez en az 200 sperm sayısına sahip örnek alınarak toplamda en az 400 sperm hücresi sayılmalıdır.

Sperm sayısının kesinliği hesaplanırken Poisson dağılımı kullanılır. Sperm sayısı N, standart hata SE, sperm sayısının kare kökü bulunarak hesaplanır. Sperm hacmindeki sperm sayısının %95 güven aralığında olması gerekmektedir. %95 güven aralığına sahip olması için 400 adet sperm hücresinde 361-441 arasında, 100 sperm için 81.4-121 sperm hücresi kabul edilir. Bir adet sperm hücresine bakılarak analiz yapılmak istendiğinde örneklem hatası %100 olur. 100 adet sperm hücresinde ise %10'luk bir örneklem hatası mevcuttur. Bu durumda WHO'da önerilerin en az 400 adet sperm sayım işleminde örneklem hatası %5 olarak %95'lik güven aralığında hesaplama yapılmış olur (Tablo 2.4). Bu durumda ne kadar çok hücre sayımı yapılırsa analizin kesinliği o kadar artmış olur.

Tablo 2.4. Sperm analizi alt sınır referans limitleri (5. Yüzdelikleri %95 güven aralıkları) [6].

Parametreler	Alt Referans Limitleri
Semen Hacmi	1,5 ml (1,4-1,7)
Toplam Sperm Sayısı	39 (106/ejekülat) (33–46)
Sperm Konsantrasyonu	15 (106 ml) (12-16)
Toplam Motilite (PR+NP)	40 (%) (38-42)
İleriye Doğru Hareketlilik (PR)	32 (%) (31-34)
Vitalite (canlı spermiler)	58 (%) (55-63)
Sperm Morfolojisi (normal formlar)	4 (%) (3,0–4,0)
pH	≥ 7,2
Peroksidaz Pozitif Lökositler	<1,0 (106/ml)

MAR Testi (partiküllere bağlı hareketli spermiler)	<50 (%)
İmmunobead Test (boncukların bağlandığı motil spermiler)	<50 (%)
Seminal Çinko	$\geq 2,4$ ($\mu\text{mol}/\text{ejakülat}$)
Seminal Fruktoz	≥ 13 ($\mu\text{mol}/\text{ejakülat}$)
Seminal Nötral Glikozidaz	≥ 20 (mU/ejakülat)

Daha önceden bahsettiğim üzere sperm konsantrasyonu veya sayısı döllenme veya testis fonksiyonları ile doğrudan ilişkili değildir ve sperm analizi için yeterli parametreler değildir. Fakat kısırlılığın veya dölleme yeteneğini dolaylı yoldan olumlu veya olumsuz yönden etkilenildiği düşünülmekte olup değerlendirme için önemlidir. Konsantrasyon bilindiği üzere miktarın hacme bölünmesi ile bulunur. Sperm sayısının, içinde bulunan sperm hacmine bölünmesi ise bize sperm konsantrasyonunu verir. Değerlendirme için değerlendirilen hacimdeki hücre sayısının alt sınırı 15×10^6 adet spermdir.

Bir ejakülasyondaki toplam hücre sayısı ise testis fonksiyonlarının ve üretme yetisinin değerlendirilmesi için önemlidir. Konsantrasyonun, tüm ejakülatta oluşan sperm hacmi ile çarpılması bize total ejakülasyondaki sperm sayısını verir. Bu değerlendirmede hücre sayısındaki alt sınır 39×10^6 sperm olmalıdır.

2.7.4. Sperm Morfolojisi

Sperm morfolojisi belirlemek adına numuneler hava ile kendiliğinden kuruduktan sonra tıpkı canlılığına bakıldığında olduğu gibi boyama yöntemi kullanılmalıdır. Morfoloji belirlenmesinde Papanicolaou boyası ve Shorr boyası olmak üzere iki farklı boya kullanılabilir. Işık mikroskopunda bakıldığında başın akrozomal bölgesi açık mavi, post akrozom bölgesi ise koyu mavi renge boyanır. Hücrenin ortası kırmızı, kuyruk kısmı ise mavi-kırmızı bir renk alabilir. Baş bölümünün arka kısmı ise pembe veya kırmızı olan Papanicolaou boyası veya kırmızı-turuncu renk olan Shorr boyasına boyanabilir.

Papanicolaou boyası ile sperm hücreleri ve sperm sıvısı içerisinde bulunan diğer hücreler iyi boyanır. Bu boya ile boyanan preparatlar, tıpkı eozin-negrozin boyamda olduğu gibi uygun koşullarda saklandığı takdirde analiz tekrarlanması ve kalite kontrol süreçlerinde

kullanılmak üzere uzun süre saklanabilir. Shorr boyaması da Papanicolaou boyasında olduğu gibi sperm hücrelerini ve sperm sıvısındaki diğer formların görülebilmesini sağlamaktadır.

Sperm hücresi genel olarak baş, boyun ve kuyruk olmak üzere 3 ana parçadan oluşmaktadır. Kuyruk kısmı faz kontrast mikroskoplarla iyi analiz edilmektedir. Fakat sperm analizinde genel olarak ışık mikroskobu kullanılmaktadır ve bu mikroskop ile baş ve boyun kısmı düzgün bir şekilde görülebilirken kuyruk kısmı iyi analiz edilemez. Bunun için ışık mikroskobu analizinde genel olarak baş ve boyun morfolojisi incelenebilir.

2.7.5. Sperm Analizi Terminolojisi

Son eki -spermi olan terimler ejakülatı, -zoospermi olan terimler ise spermeleri ifade eder.

- **Aspermi:** Sperm yokluğu
- **Astenozoospermi:** İleri hareketliliğe sahip sperm yüzdesinin alt referans limit değerinin altında olması
- **Astenoteratozoospermi:** Hem ileri hareketliliğe sahip spermelerin hem de morfoloji olarak normal spermelerin yüzdesinin alt referans limit değerinin altında olması
- **Azoospermi:** Bir ejakülatta hiç sperm olmaması
- **Kriptozoospermi:** Taze preperatta sperm hücresi bulunmamasına rağmen santrifüjlenmiş palette sperm varlığı bulunması
- **Hemospermi(Hematospermi):** Ejekülatta eritrosit varlığı
- **Lökospermi (Piyospermi):** Ejekülatta eşik değeri üstünde lökosit varlığı
- **Nekrozoospermi:** Ejekülatta canlı sperm yüzdesinin azlığı ve cansız spermelerin yüksek yüzdede varlığı
- **Normozoospermi:** İleri hareketliliği ve morfolojisi normal sperm hücresi yüzdesine veya alt referans limit değerlerine eşit-yüksek toplam sperm sayısına sahip olması
- **Oligoastenozoospermi:** Alt referans limit değerlerinden daha düşük toplam sperm sayısı ve ileri hareketli sperm yüzdesi
- **Oligoastenoteratozoospermi:** Alt referans limit değerlerinden daha düşük toplam

sperm sayısı ve hem ileri hareketli hem de morfolojik olarak normal sperm yüzdesi

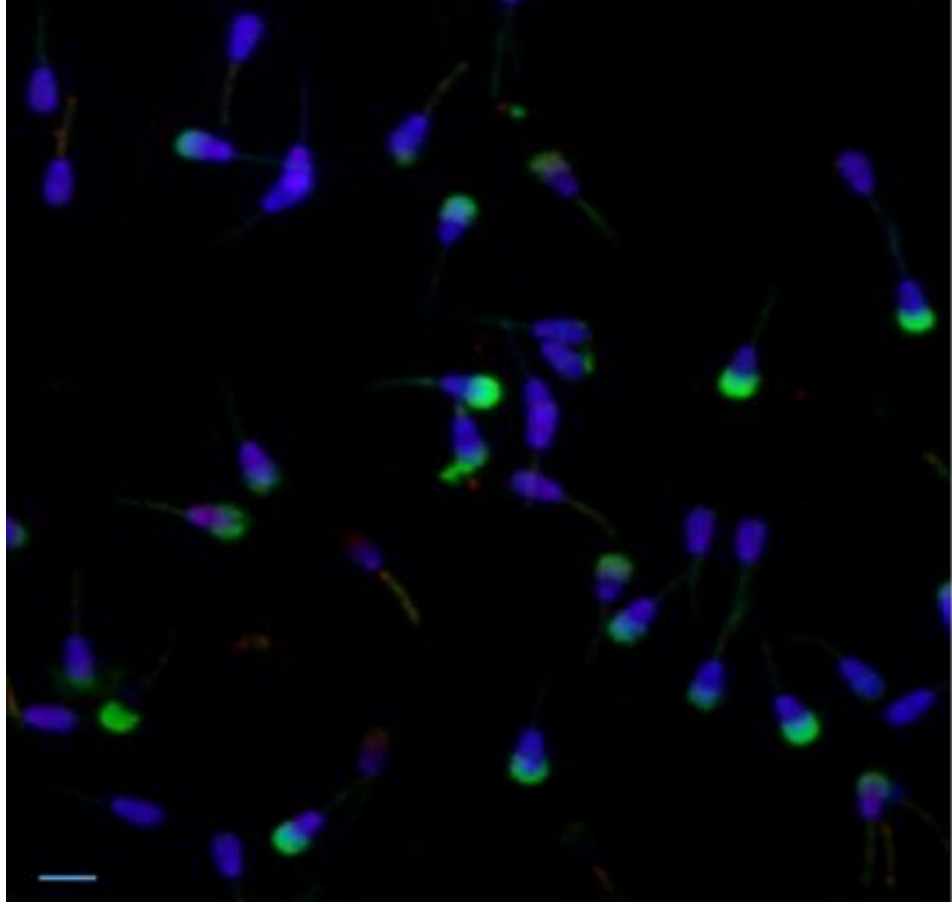
- **Oligoteratozoospermi:** Alt referans limit değerlerinden daha düşük toplam sperm sayısı ve morfolojik olarak normal sperm yüzdesi
- **Oligoozoospermi:** Alt referans limit değerlerinden daha düşük toplam sperm sayısı
- **Teratozoospermi:** Alt referans limit değerlerinden daha düşük yüzdede morfolojik olarak normal sperm

2.8. Sperm Analiz Yöntemleri

2.8.1. Floresan Prob Yöntemi

Cisimlerin belli dalga boyundaki ışık ile uyarılması sonucu oluşan foton enerjisini farklı ve tek bir dalga boyunda yansıtmasına floresan denir (Şekil 2.6) [45].

Floresan mikroskobu ile sperme ait hücre membranı, akrozom ve kromatin gibi özellikler gözlenerek spermin membran bütünlüğü ve hücre içi fonksiyonu incelenebilmektedir. Floresan mikroskopinin en önemli avantajı sperm hücrelerinin tek tek gözlemlenebilmesidir [45]. Şekil 2.6'da 4 ayrı floresan probu ile işaretlenmiş sperm görüntüleri mevcuttur ve mordan yeşile doğru giden renk skalası sperm akrozomlarının durumuna göre değerlendirilir. Homojen mor renkte olanlar akrozomu sağlam, yeşil renkte olanlar ise zarar görmüş akrozoma sahip, DNA fragmentasyonuna uğramış spermelerdir.

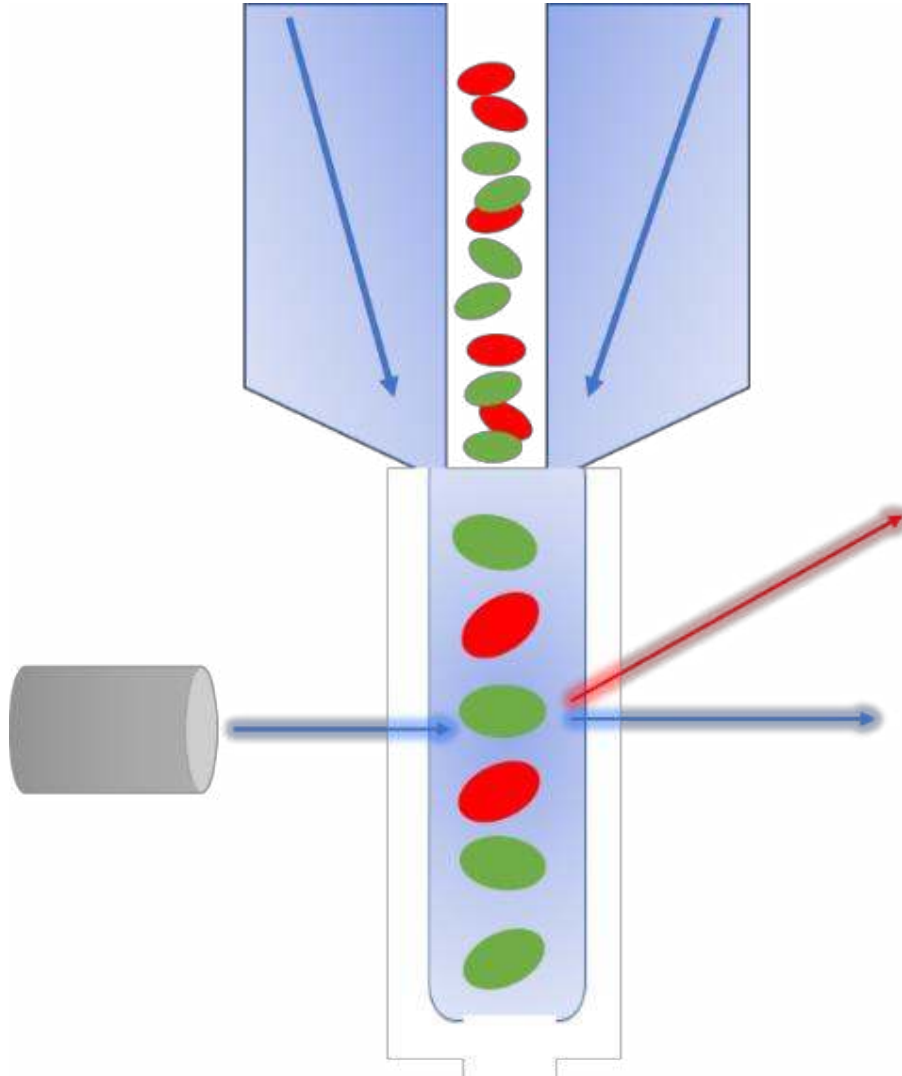


Şekil 2.6. Floresan tekniği kullanılarak görüntülenen sperm hücreleri [46].

2.8.2. Akış Sitometrisi Yöntemi

Akış sitometrisi yöntemi, floresan mikroskopi yöntemi ile benzerlik göstermektedir. Floresan yönteminden farklı olarak daha karmaşık ışık kaynakları, foton çoklayıcı tüp ve filtre üniteleri bulundurur. Böylece sperm varlığı çok daha hassas bir şekilde tespit edilebilir. Sperm sıvısı, ışık geçirgenliği olan bir ölçüm küvetine konulur. Şekil 2.7’de şematize edildiği gibi ölçüm küveti içerisindeki spermelerin üzerine uygulanan dik ışık demetlerinin foton çoklayıcı tüp tarafından toplanarak yorumlanır [45]. Sperm hücresinin plazma membran ve akrozom bütünlüğünü beraber değerlendirilmesine imkan sağlayan akış sitometrisi yöntemi, floresan boyaları sisteme adapte ederek hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlar. Akış sitometrisi ile sperm hücrelerinin hacmi, büyüklüğü, DNA-RNA dizilimleri, enzim aktiviteleri, çekirdek ölçümleri yapılabilmektedir [45].

Floresan yöntemler ve akış sitometrisi sperm analizi için kullanılabilir yöntemler olmasına rağmen kesin ve doğru ölçüm için daha detaylı analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Gelişen teknoloji ve görüntü işleme sistemleri ile sperme ait karakteristik parametrelerin belirlenmesi ve kullanıcıya doğrudan sunulması için CASA sistemleri geliştirilmiştir. Manuel metotlara göre daha doğru analiz yapılabilmesini sağlayan CASA yöntemleri, diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında maliyet olarak en optimal yöntemdir.



Şekil 2.7. Akış sitometrisi şematiği [47].

2.8.3. CASA Yöntemi

CASA sistemleri, donanım ve yazılım olarak iki ayrı kısımdan oluşan otomatik sistemlerdir. Sperm görüntülerini dijitalleştirerek görselleştirir. Bu sayede görüntülerin işlenebilmesi ile kesin ve anlamlı bir sperm analizi gerçekleştirilir.

CASA sisteminde hastadan alınan sperm numunesi görüntü işlemek için uygun şekilde hazırlanır. Normal CASA sistemlerinde hareket analizi 3 ana kısımdan oluşur. İlk olarak spermilerin sıralı görüntüsü alınır daha sonra alınan bu görüntülerde sperm hücresinin tespiti yapılır. Tespit edilen sperm hücrelerinin takibi ve kinematik parametreleri ölçülür. Alınan görüntülerde kinematik parametrelerin ölçümü için imajlarda çeşitli iyileştirmeler yapılmalıdır. Bu iyileştirmelerden biri ışık mikroskobu kullanmak yerine faz kontrast mikroskop kullanmaktır. Sperm hücresinin düşük maliyetli mikroskoplarla ve kamera sistemleriyle ölçümü görüntü işlenmesinde yetersiz olacağından, görüntü üzerinde yazılım ile iyileştirmeler yapılır. İmajlarda sperm hücrelerini daha iyi gözlemleyebilmek için kontrast düzenlemesi yapılır. Daha homojen görüntüler elde etmek adına görüntü gri skalaya çevrilir. Sperm analizi sırasında hücre rengi ile ilgili herhangi otomatik analiz yapılmadığından görüntü üzerinde renkli analiz yapılmasının bir anlamı olmayacaktır. Gri skalaya dönüştürülen imajlardan kafa karışıklığına neden olacak nesnelerin algılanmaması ve yine daha homojen bir görüntü için arka plan çıkartma işlemi gerçekleştirilir.

Görüntülerde kontrast ayarı, gri skalaya çevirme ve arka planı kaldırılarak iyileştirmeler yapıldıktan sonra spermilerin izleme işlemine geçilir.

2.8.3.1. CASA Avantajları

CASA sistemi birçok hastanede ve klinik laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bu sistem sayesinde sperm hareketleri ve parametreleri analizleri yapılarak hastalık tanısı yapılabilir. CASA sistemi, görsel değerlendirmeye kıyasla daha nesnel çıktılar vermektedir. Bu dayanakla beraber numunenin kabul görmesi ya da reddedilmesi hakkında daha güvenilir ölçütler sunar ve manuel metotlara göre daha hızlı analiz yapılmasını sağlar. Hazırlanan bir preparatla defalarca analiz yapılmasına ve daha sonrasında da numunenin saklanması olanak tanır. Gözle analiz edilebilecek parametreler kısıtlı olabileceğinden ölçüm parametrelerinin skalası geniştir ve her bir sperm için ayrı ayrı analiz yapılmasına mümkündür. Bunlara örnek olarak hız parametreleri manuel metotlarda sperm hücrelerinin lamdaki gridlerden geçtiği süre sayılarak ölçülmektedir. Bu sayım hatalara çok açık olmakla beraber kesin bir değer de vermez. CASA'nın oluşturabileceği parametrelerle ilgili sorunlar yazılım geliştirilmesi ile ortadan kaldırılabilir ve istenen ölçümün yapılmasını sağlar.

2.8.3.2. CASA Dezavantajları

Her sistemin ve analizinin olduğu gibi CASA sisteminin de eksi yönleri bulunmaktadır. Bu eksilerden en önemlisi maliyettir. İnsan gücü teknolojiye kıyasla daha ucuzdur fakat analiz kalitesi açısından CASA tercih edilmelidir. CASA’da ne kadar kaliteli ve detaylı analiz yapılması istenirse kullanılan mikroskobun, kameranın, ekranın maliyeti bir o kadar artar. Bununla beraber sistemin uzun ömürlü olabilmesi adına oluşan bakım maliyetleri ve doğru ölçüm için yine periyodik olarak cihaz kalibrasyonlarının yapılması gerekmektedir. Bunlar da mevcut maliyete ek olarak oluşan bir başka kalemdir.

Maliyet dışında oluşturulan CASA sisteminde kullanılacak mikroskop, kamera vb. komponentler değiştirilip farklı bir sistem oluşturulduğunda ölçümde farklılıkların olacağıdır.

CASA sistemleri birbirleri ile benzer ilkelere sahip olsalar da oluşturulan her CASA sisteminin ölçüm değerleri kullanılan mikroskopların, yazılımların, kameraların derinlikleri vb. farklı olacağından birbirinden farklı olur.

2.8.3.3. CASA Terminolojisi

Çok sayıda sperm hücresi varlığı nedeniyle, sperm analizlerinde otomatik sperm takibi yapılması bir zorunluluktur. Kullanılan en yaygın bilgisayarlı izleme tekniği olan, hareketlilik ve yüzme hızı gibi hareket parametrelerini farklı görüntü işleme teknikleri ile analiz etmek için gereken mikroskop, kamera, bilgisayar gibi donanımlar ve yazılımlar bütünü olan CASA sistemidir [20]. CASA sistemi, yapay döllenme için sperm değerlendirmesi ve güvenilirliğin bir ölçüsü olarak sperm hareketinin nesnel ve tekrarlanabilir olması için kullanılır [48]. Tipik bir CASA sistemi, hareket analizini üç adımda gerçekleştirir;

- Sperm görüntü diziliminin yakalanması,
- Nesne algılama,
- Nesne takibi,
- Eğrisel yol hızı, ortalama yol hızı, düz çizgi hızı gibi parametrelerin hesaplanması.

VCL: Eğriçizgisel hız (curvilinear velocity). Sperm hücresinin başının eğriçizgisel yolu boyunca zaman göre ortalama hızıdır.

VSL: Doğrusal hız (linear velocity). Sperm hücresinin başının algılandığı ilk konumu ile algılanan son konumu arasında çizgisel düzlemde zamana göre ortalama hızıdır.

VAP: Ortalama yol hızı (average path velocity). Sperm hücresinin başının ortalama yol boyunca zamana göre ortalama hızıdır.

ALH: Yanal kafa genişliği (amplitude of lateral head). Sperm hücresinin başının ortalama yola göre dış yana doğru hareketinin boyutudur.

LIN: Doğrusallık (linearity) eğriçizgisel yolun doğrusallığını ifade eder. Doğrusal hızın, eğriçizgisel hıza oranlanması (VSL/VCL) x100 ile bulunur.

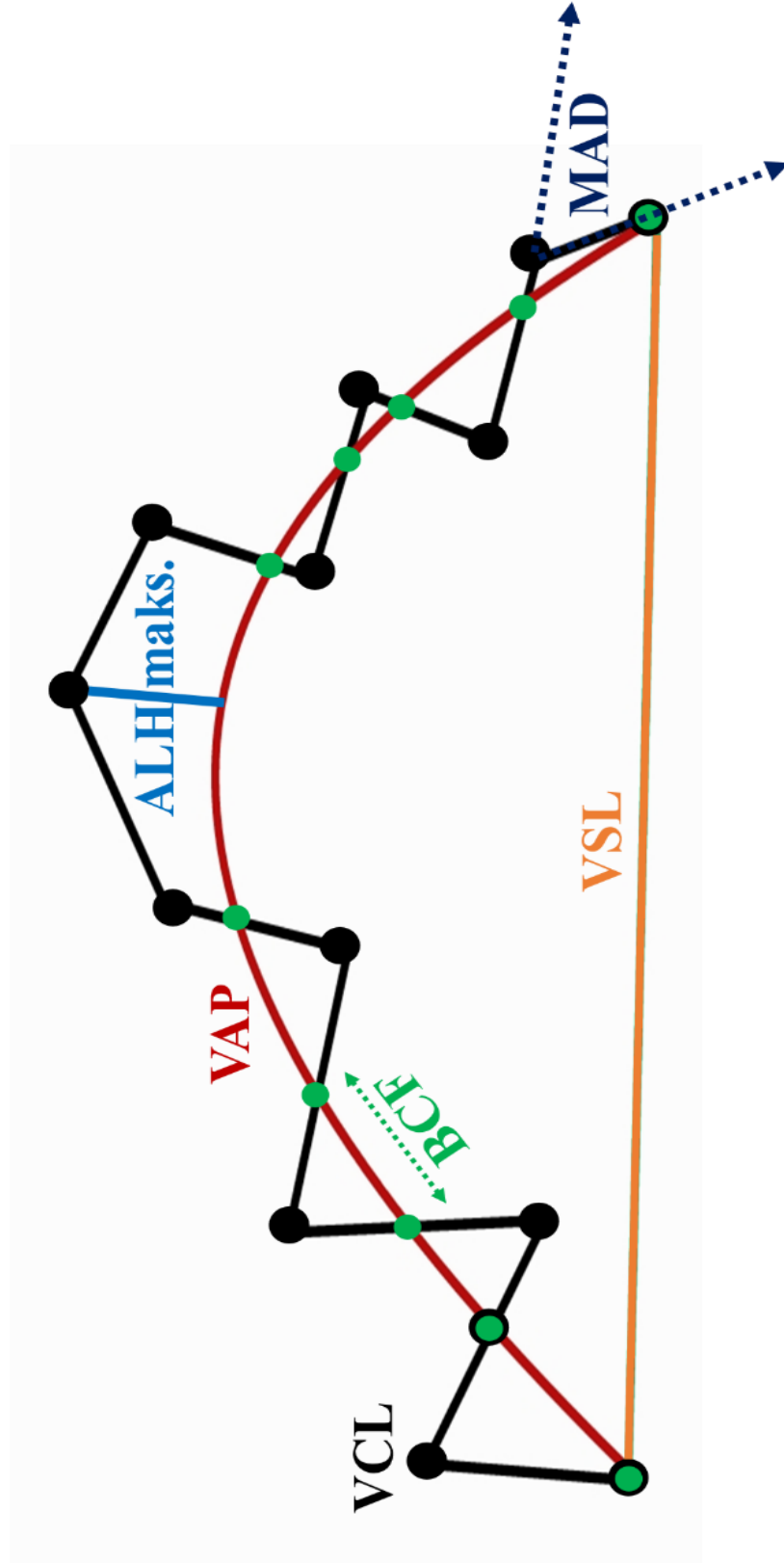
WOB: Salınım hareketi (wobble). Sperm hücresinin hareket yolunun, ortalama yola göre ne kadar salınım hareketi yaptığının ölçüsüdür. Ortalama yol hızının eğriçizgisel hıza (VAP/VCL) x100 oranlanması ile bulunur.

STR: Doğrusallık (straightness). Ortalama sperm hareket yolunun doğrusallık derecesini ifade eder. Doğrusal hızın ortalama yol hızına (VSL/VAP) x100 oranı ile bulunur.

BCF: Çaprazlama sıklığı, çapraz vuruş frekansı (beat-cross frequency). Eğriçizgisel yolun ortalama yolu çaprazlama sıklığıdır.

MAD: Ortalama açısal yer değiştirme (mean angular displacement): Sperm hücresinin baş kısmının eğriçizgisel yol boyunca anlık dönüş açısının zamana göre ortalama mutlak değeridir.

Kinematik parametreler VCL, VAP, VSL, maksimum ALH, BCF ve MAD, Şekil 2.8’de illüstre edilmiştir.



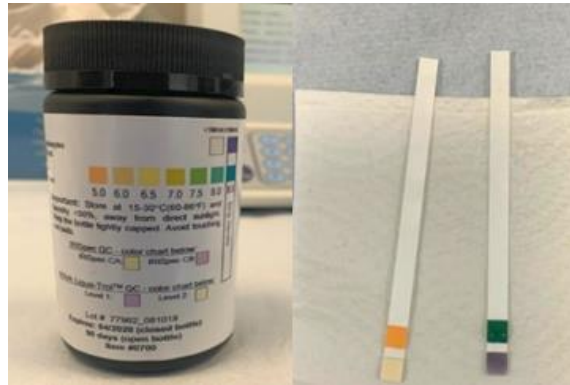
Şekil 2.8. Ölçülen sperm kinematik parametreleri [20]

3. YÖNTEMLER VE ARAŞTIRMA BULGULARI

Ankara Şehir Hastanesi Onkoloji Binası Androloji-Üroloji Kliniği'nden alınan veriler ile yapılan ve T.C. Sağlık Bakanlığı İl Sağlık Müdürlüğü Ankara Şehir Hastanesi 2 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı E2-21-930 no'lu çalışma olan Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemi çalışması 13.10.2021 tarihinde etik açıdan uygun bulunmuştur.

Klinikten 10 hasta için alınan verilerden tek bir hastanın verileri işlenerek CASA sistemi geliştirilmiştir. Bu hasta Denek A olarak adlandırılmıştır. 18 yaşındaki Denek A'nın numunesi griopak renkte, homojen dağılım gösteren 3 ml hacimdedir.

Klinikte hastalardan 72 saat cinsel perhiz sonrasında mastürbasyon yolu ile toplanan numuneler sperm numune kabı ile numune toplama noktasına getirir. Alınan numuneler burada 30 dakika bekletilerek numunelerin likefaksiyona uğraması yani sperm numunesinin ejakülasyondan sonra biraz sıvılaşması beklenir. Numunelerin kap içerisinde strip yardımıyla önce numunenin pH değerine ve lökosit varlığı kontrol edilir. Şekil 3.1'de striplerden sol tarafta bulunan turuncu strip, pH ölçümü, sağ tarafta bulunan yeşil strip ise lökosit varlığını gösterir. pH sribinden değer tayini, kutu üzerinde yer alan renk skalasından yapılır. Turuncudan yeşile doğru pH değeri yükselir. Lökosit ise var veya yok diye tayin edilir. Eğer strip mora dönüyorsa lökosit varlığı tanımlanır, beyaz renge dönerse yok olduğu tespit edilir. 18 yaşındaki Denek A için pH değeri 7,5 olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.1. pH ölçüm ve lökosit tayin stribi.

Bu çalışmada alınan numuneler pipet yardımı ile bir miktar numune lam ve lamel arasına alınır. Lam ve lamel arasında sperm hücrelerinin hareketini sağlamak açısından 50 µm boyutundaki çift taraflı bant lamelin iki tarafına da yapıştırılarak, lam ve lamel arasında

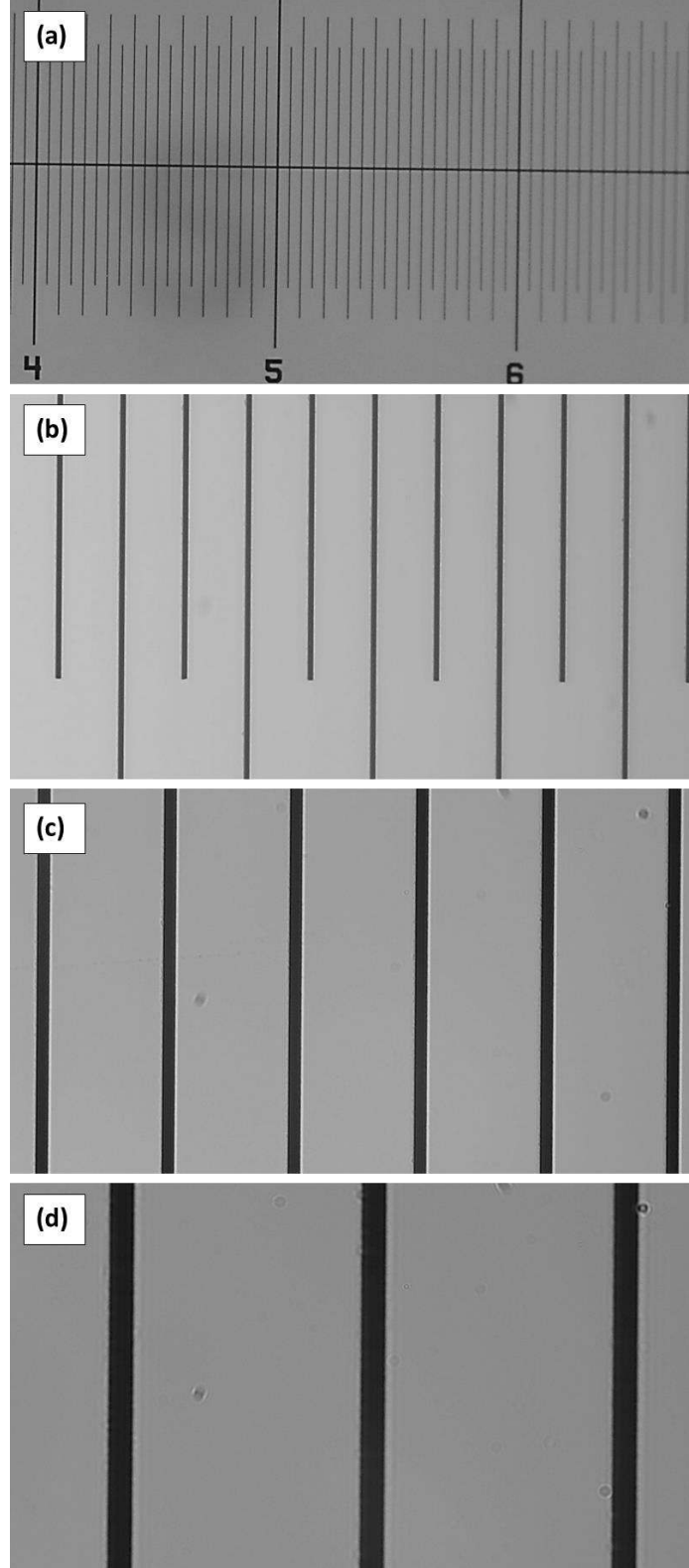
50 μm 'lik boşluk oluşturulmuştur. Böylece lam ve lameli birbirine yapıştırmadan sperm hareketleri gözlemlenebilir. Lam ve lamelin arasına sperm numunesinden bir miktar damlatılarak Olympus marka, CX21 model mikroskobun altında 2M piksel kamera ile görüntü aktarımı sağlanmıştır. 2 megapikselli kameraadan alınan görüntülerin eni 1.920 piksel, boyu ise 1.080 pikseldir. Mikroskopta Olympus marka 4 farklı büyötmeye sahip objektif bulunmaktadır: 4X (0,1 sayısal açıklık (NA)), 10X (0,25 NA), 20X (0,40 NA) ve 40X (0,65 NA).

Tablo 3.1. Farklı büyötmelerde kalibrasyon skalası kullanılarak elde edilen kalibrasyon değeri, görüntöleme alanları ve görüntöleme hacimleri. Hacim hesabında 50 mikron kanal derinliğı kullanılmıştır.

Objektif	4X	10X	20X	40X
Uzunluk [px]	679	1.595	1.767	1.416
Uzunluk (gerçek) [μm]	1.000	450	250	100
Kalibrasyon Faktörü	1,47	0,28	0,14	0,07
Görüntöleme Alanı [μm^2]	4.497.648	165.055	41.508	10.342
Görüntöleme Hacmi [μm^3]	224.882.386	8.252.749	2.075.400	517.093

Farklı büyötmelerde alınan görüntülerde piksel kalibrasyonu Thor Labs R1L3S1P referans mikrometre lamı kullanılarak elde edilmiştir.

Şekil 3.2 'de referans lamının 4 farklı büyötmeye alınan görüntüleri görünmektedir. Referans lamında her çizgi arası 50 μm olarak tanımlanmıştır. Belirlenen iki çizgi arasındaki mesafe piksel değeri olarak ölçölmüş ve çizgiler arasındaki gerçek mesafeye bölünerek kalibrasyon faktörü elde edilmiştir. Tablo 3.1'de her bir objektif için kalibrasyon faktörü, gerçek görüntöleme alanı ve görüntöleme hacmi verilmiştir. Örneğın, 10X büyötmeye 1 piksel 0,28 μm , 40X büyötmeye ise 1 pikselin 0,07 μm olduğı bulunmuştur. Buna göre 2 megapiksel kamera ile alınan eni 1.920 piksel, boyu 1.080 piksel olan görüntülerin alanları; en ve boyun çarpılması ile bulunmuştur. Bulunan değeri piksel cinsinden olduğı için ve çalışmadaki parametreler mikrometre üzerinden hesaplandığı için bulunan 0,28 kalibrasyon faktörü ile piksel cinsinden bulunan alan çarpıldığında 165.054 μm^2 'lik görüntü alanı bulunur. Aşağıda 10X büyötmeye ve 40X büyötmeye olmak üzere iki farklı büyötmeye alan ve hacim değeri gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı büyütmelerde kalibrasyon skala görüntüleri. (a) 4X (b) 10X (c) 20X (d) 40X büyütme değerlerinde.

10X büyütmede;

- Görüntüleme alanı = $165.054 \mu\text{m}^2$
- Görüntüleme hacmi = $165.054 \mu\text{m}^2 \times 50 \mu\text{m} = 8.252.749 \mu\text{m}^3$

40X büyütmede;

- Görüntüleme alanı = $10.341 \mu\text{m}^2$
- Görüntüleme hacmi = $10.341 \mu\text{m}^2 \times 50 \mu\text{m} = 517.092 \mu\text{m}^3$

Bulunan alan ve hacim değerlerinin anlamlı bir şekilde kullanılabilmesi ve WHO Örgütü standartlarına göre 1 ml hacimli sperm sıvısı içerisinde 15×10^6 - 259×10^6 sperm bulunması gerektiği için ejakülasyonda belirli milimetre hacimde olan sperm için aşağıdaki belirtilen dönüşümler yapılarak 10X ve 40X büyütmelerde incelenen sperm gözlem alanı için sperm sayısının olması gereken aralıklar bulunmuştur.

1 ml = 1.000 mm^3 olduğu bilindiğine göre; WHO'nun belirlemiş olduğu 1ml'deki sperm sayısının 15 milyon ile 259 milyon arasında olması gerekmektedir. Mililitredeki sperm sayısını mikrometre küpteki sperm sayısına aşağıdaki dönüşümler ile çevrilebilir.

- 15×10^6 ile 259×10^6 sperm/ml
- 15×10^3 ile 259×10^3 sperm/ mm^3
- 15×10^{-6} ile 259×10^{-6} sperm/ μm^3

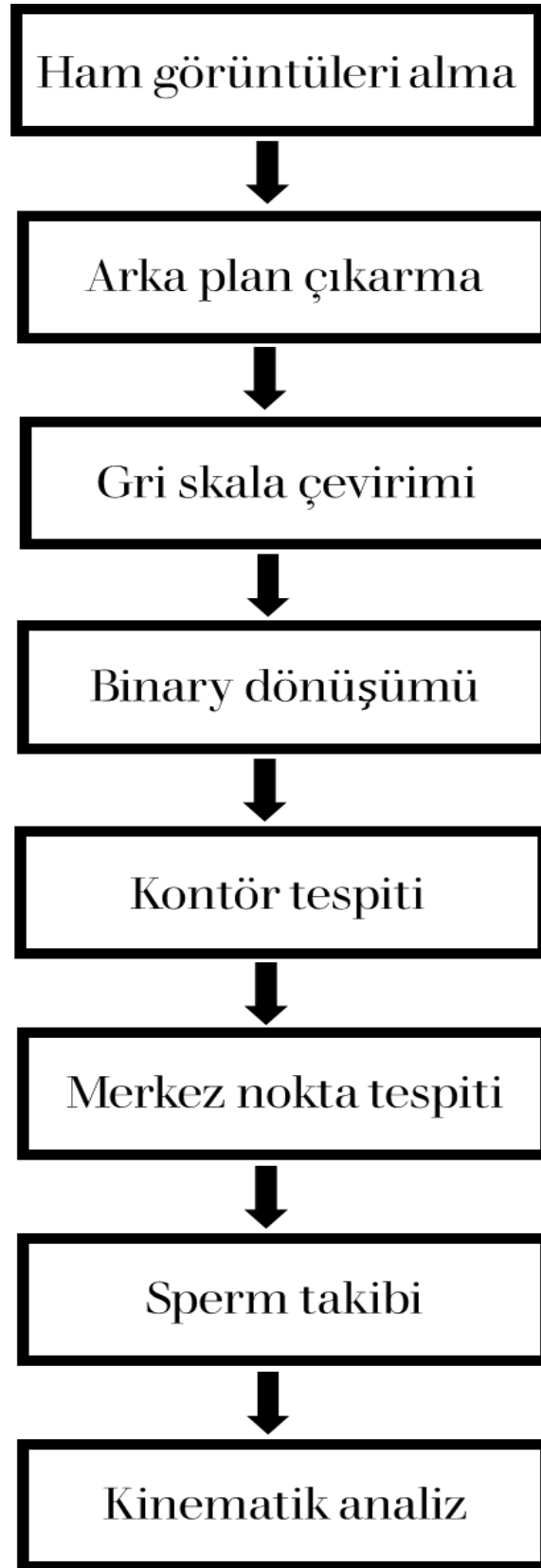
Bu durumda bir resimde N tane sperm hücresi bulunduğunda;

- 10X büyütmede = $N / 8.252.749 \text{ sperm}/\mu\text{m}^3$
- 40X büyütmede = $N / 517.092 \text{ sperm}/\mu\text{m}^3$

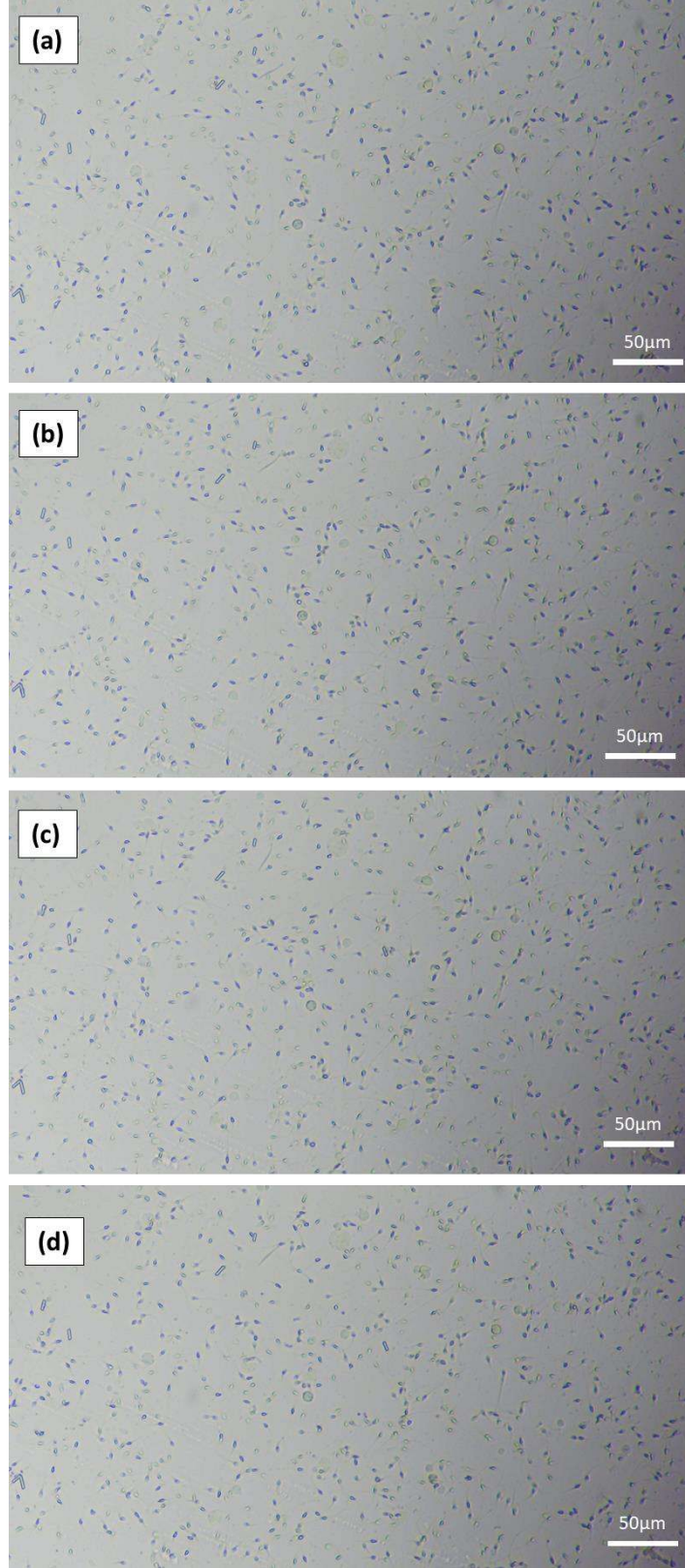
Sperm kinematik ölçümleri genellikle 10X büyütmede alınan görüntüler üzerinde yapılmaktadır [25]. Bunun nedeni 4X büyütmede yaklaşık $4 \mu\text{m}$ olan sperm hücre başının tespitinde kullanılacak piksel sayısının az olması (yaklaşık sadece 4 piksel), 20X veya 40X büyütmede ise alan derinliğinin küçük olmasıdır. Odak alan derinliği içerisinde bulunan sperm hücreleri odakta görünür ve görüntü üzerinde tespiti mümkün olur. Odak alanı derinliği azaldıkça derinlik dışında kalan hücrelerin tespiti zorlaşır. 10X büyütmede alan büyüklüğü yaklaşık $10 \mu\text{m}$ iken 20X ve 40X büyütmede 5 ve $1 \mu\text{m}$ 'dir. Bu yüzden 10X

büyütmede sperm hücreleri daha fazla süre odak alanı içerisinde bulunacağından spermilerin daha uzun zamanlarda takibi mümkün olur. Bu yüzden analizleri 10X büyütmede aldığımız görüntülerde gerçekleştirdik.

10X büyütmede 30 fps'de aldığımız her biri 130 görüntü içeren 4 farklı veri seti için yapılan analizleri Şekil 3.3'de olduğu sıra ile gerçekleştirildi. İlk önce mikroskopumuz ile aldığımız ham görüntüleri inceledik. Görüntülerde mikroskopun aydınlatmasından kaynaklı homojen olmayan aydınlanma alanları görülmektedir. Bu görüntüleri daha homojen hale getirip görüntü analizini gerçekleştirmek gerektiğinden 130 görüntü toplanarak ortalaması alınmış arka plan elde edildi. Bu arka plan her bir görüntüden çıkarıldı ve arka planı çıkartılmış görüntüleri gri sklaya çevirerek analiz için uygun görüntüler elde edildi. 8 bitlik görüntülerde binary dönüşümü uygulanarak, Python yazılım programına opencv kütüphanesinde bulunan kontör tespiti komutu ile sperm kafalarını çevreleyen sınırları bulundu. Bulunan sınır değerlerinin koordinatlarının ortalaması alınarak sperm başlarının merkez nokta tespiti gerçekleştirildi. Merkez noktaları tespit edilen spermilerin sperm takibi açısından uygun hale gelmesi ile yapmış oldukları sperm rotaları hesaplanarak kinematik analizler gerçekleştirildi.

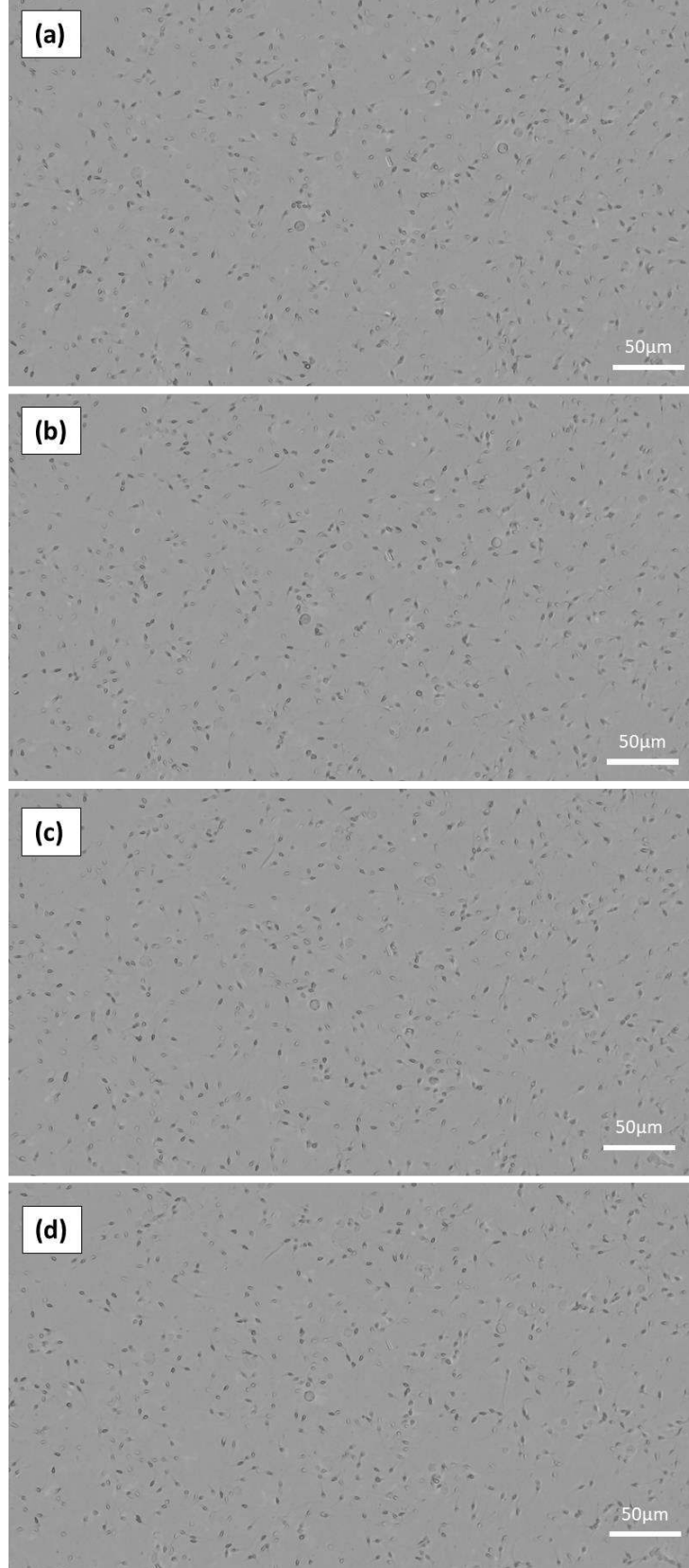


Şekil 3.3 Yapılan analizlerin akış seması ile gösterimi



Şekil 3.4. 10X büyütmede 0,5 saniye aralıklarla alınan görüntüler. (a) 0,5 sn, (b) 1,0 sn, (c) 1,5 sn, (d) 2,0 sn.

Denek A'dan numuneler üzerinde üçer dakika arayla 4 farklı görüntü serisi alınmıştır. Görüntü serilerinin her biri veri seti olarak adlandırılmıştır. 10X büyütmede alınan her bir veri seti 130 görüntü içermektedir. Görüntüler 30 fps'de alındığından her bir set için ölçüm zaman 4,3 saniyedir. Şekil 3.4'de bir veri setinde 0,5 saniye farkla alınan 4 adet görüntü mevcuttur. Homojen olmayan aydınlatmadan dolayı görüntüler üzerinde bölgesel piksel yoğunluk farklılıkları oluşmaktadır. Bu farklılıklar sabit eşik değeri ile sperm tespitini görüntünün bazı bölgelerinde zorlaştırabilmektedir. Bu farklılıkları ortadan kaldırmak için her bir set içerisinde 130 adet görüntü serisinin ortalaması alınarak arka plan görüntüsü elde edilmiş ve bu arka plan görüntüsü her bir görüntüden çıkarılmıştır. Şekil 3.5' de 30 fps'de alınan 130 adet görüntülük seride arka planı çıkartılarak oluşturulan 0,5 saniye farkla 4 adet görüntü gösterilmiştir.



Şekil 3.5. 10X büyütmede 0,5 saniye aralıklarla alınan arka plan çıkartılmış görüntüler.
(a) 0,5 sn, (b) 1,0 sn, (c) 1,5 sn, (d) 2,0 sn.

Bir veri setinde her bir görüntü önce gri skalaya çevrilip sonra Otsu methodu [49] kullanılarak binary görüntüye çevrilmiştir. Daha sonra Python opencv kütüphanesi kullanılarak elde edilen binary görüntüler üzerinde sperm başını çevreleyen sınırlar bulunmuştur. Her bir sınırın x ve y pozisyonları ortalananarak sperm başının merkezinin x_c ve y_c pozisyonları bulunarak kaydedilmiştir. N nokta içeren bir sınır için merkez pozisyonlarının x koordinatları Eşitlik (3.1) ile koordinatları ise eşitlik (3.2) ile hesaplanmıştır.

$$x_c = \frac{\sum_i^N x_i}{N} \quad (3.1)$$

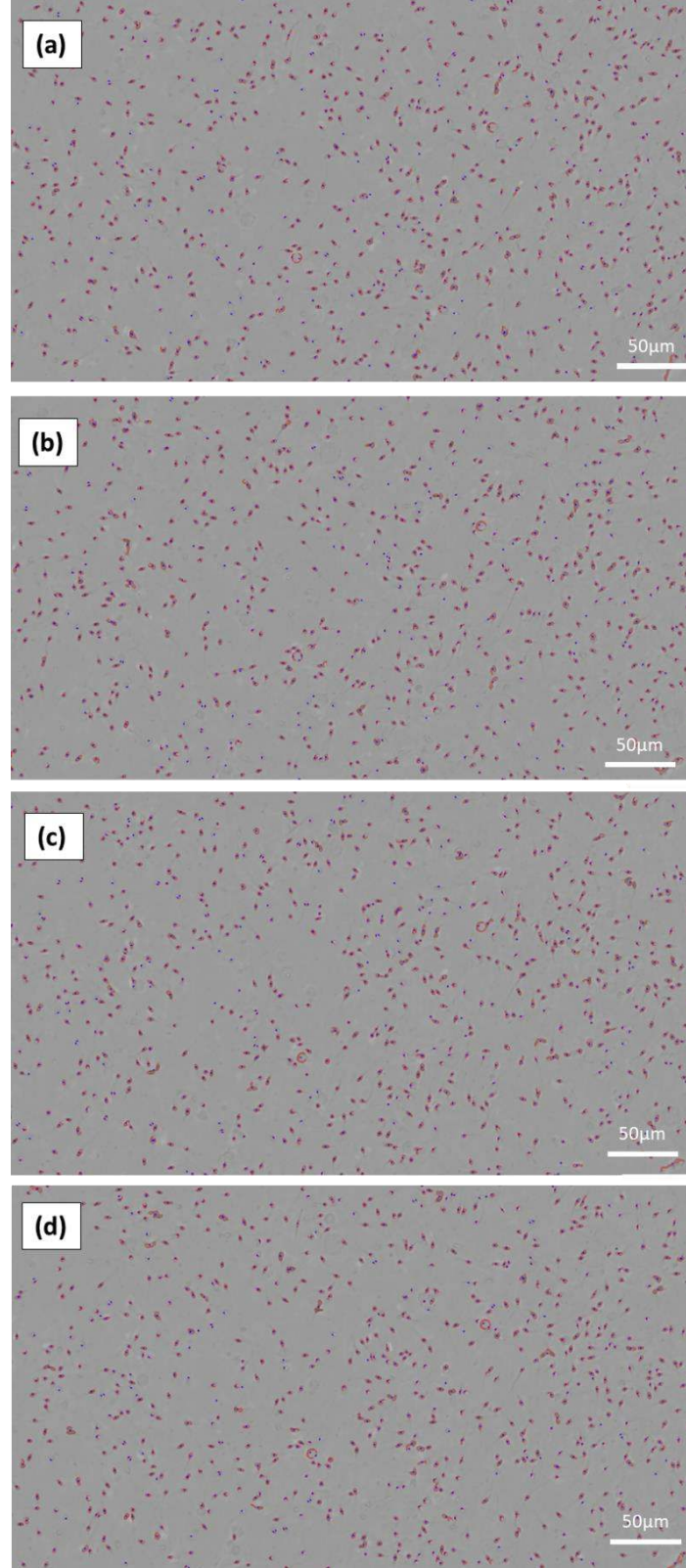
$$y_c = \frac{\sum_i^N y_i}{N} \quad (3.2)$$

Şekil 3.6’de 0,5 saniye farkla alınan 4 farklı görüntüde bu metotla tespit edilen hücreler gösterilmektedir. Tespit edilen sperm hücrelerinin sınırları kırmızı şekilde çizilmiş, hücrenin merkezi ise mavi nokta ile gösterilmiştir. Her bir veri seti içerisinde merkez noktaları hesabın yapıldığı görüntüleme zamanı ile kaydedilmiştir. Bu parametreler tespit edilen spermelerin ardışık görüntülerde takip edilmesinde kullanılmıştır.

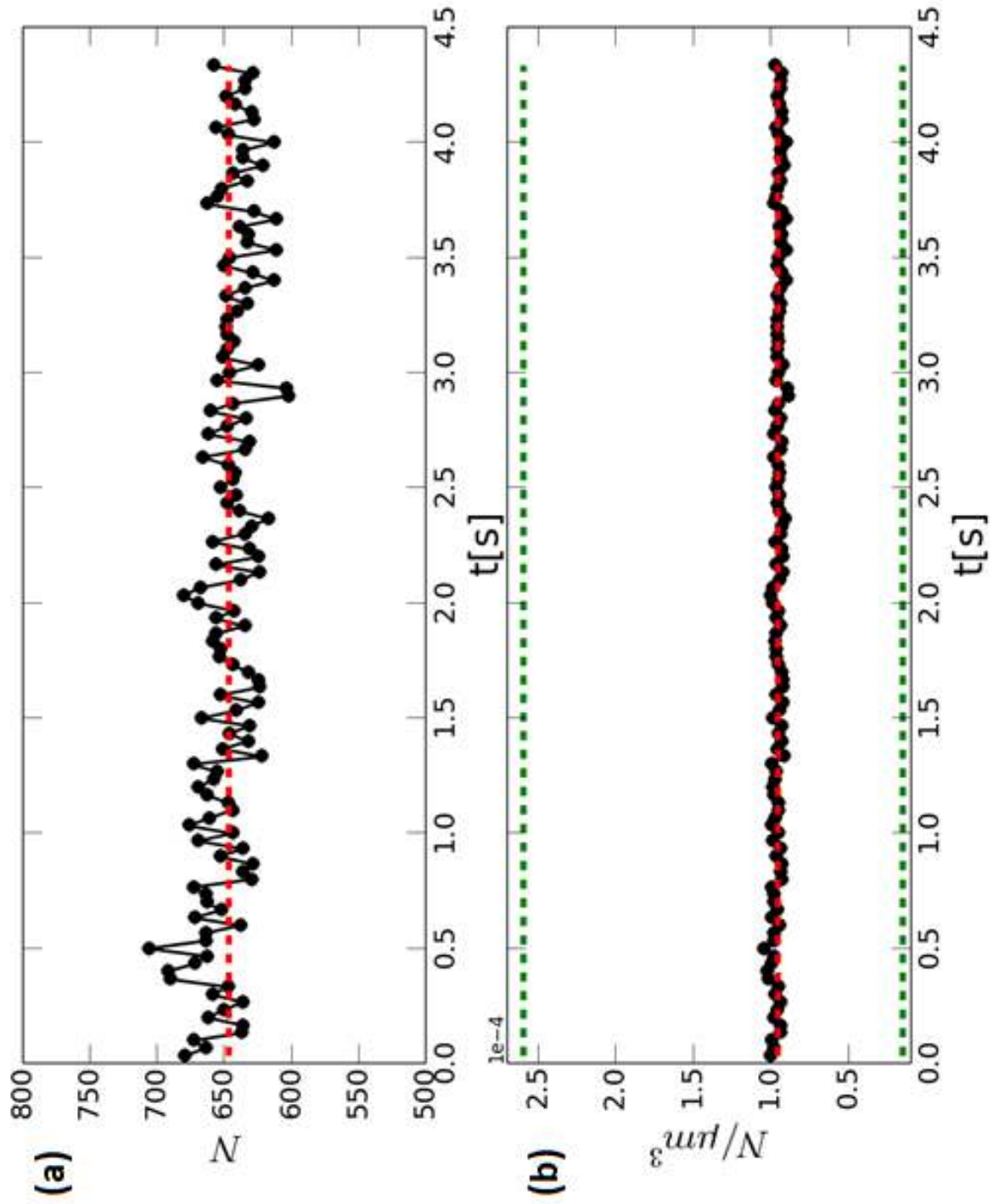
Sperm hücreleri her bir 130 görüntü içerisinde tespit edildikten sonra sperm sayısı yaklaşık 4,3 saniyelik zaman boyunca hesaplanmıştır. Şekil 3.6(a)’da sperm sayısının zamana göre değişimi 2 numaralı veri seti için gösterilmiştir. Ölçüm zamanı boyunca sperm sayısı ortalama değer etrafında düşük değişim göstermektedir. Benzer şekilde Şekil 3.6(b)’de her mikrometre küpe düşen sperm sayısının zamana göre değişimi görülmektedir. Kırmızı tireli çizgiler ortalama değeri gösterirken WHO referans değerleri de grafikte yeşil tireli çizgiler ile gösterilmiştir. Her bir veri seti için bu analizler tekrarlanarak ortalama sperm sayısı ve ortalama mikrometre küpe düşen sperm sayısı üçer dakika arayla alınan 4 veri seti için hesaplanmıştır.

Tablo 3.2’de her bir veri seti için ortalama değerler 25. ve 75. yüzdeler dilim çeyrekler arası aralıklarla beraber verilmiştir. Verinin %50’si istatistiksel olarak tabloda belirtilen aralıklardadır. Veriler arasında ortalama sperm sayısı en az 557, mikrometre küpte sperm sayısı ise en az $82,2 \times 10^{-6}$ olarak bulunmuştur. Tüm veri setleri düşünüldüğünde

ortalama sperm sayısı $609,1 \pm 60,3$ ve mikrometre küpte sperm sayısı $89,9 \times 10^{-6} \pm 8,9 \times 10^{-6}$ olarak tespit edilmiştir. Tüm veri setlerinde ve veri setlerinin mikrometre küpteki ortalama değerleri WHO referans (15×10^{-6} - 259×10^{-6}) değerlerinin içerisinde dir.



Şekil 3.6. 10X büyütmede 0,5 saniye aralıklarla tespit edilen spermiler. Spermilerin merkezleri mavi nokta, kafa bölgesi ise kırmızı çizgi ile gösterilmiştir. (a) 0,5 sn, (b) 1,0 sn, (c) 1,5 sn, (d) 2,0 s.

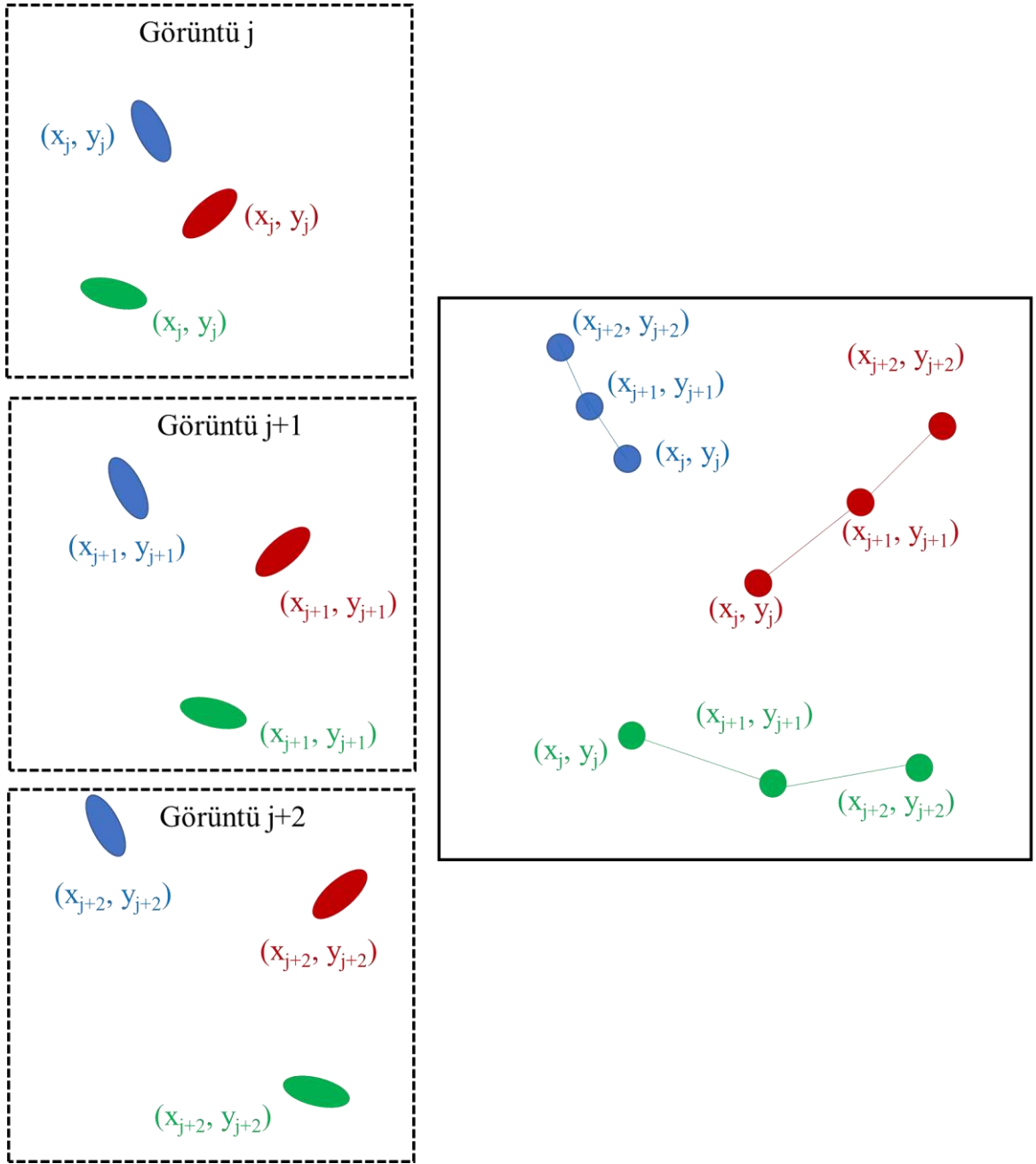


Şekil 3.7. 2 numaralı veri setinde elde edilen ortalama sperm sayısı ve mikrometre küpe denk gelen sperm sayısı. Kırmızı tireli çizgi ortalama değeri, yeşil tireli çizgiler ise WHO referans limitlerini göstermektedir.

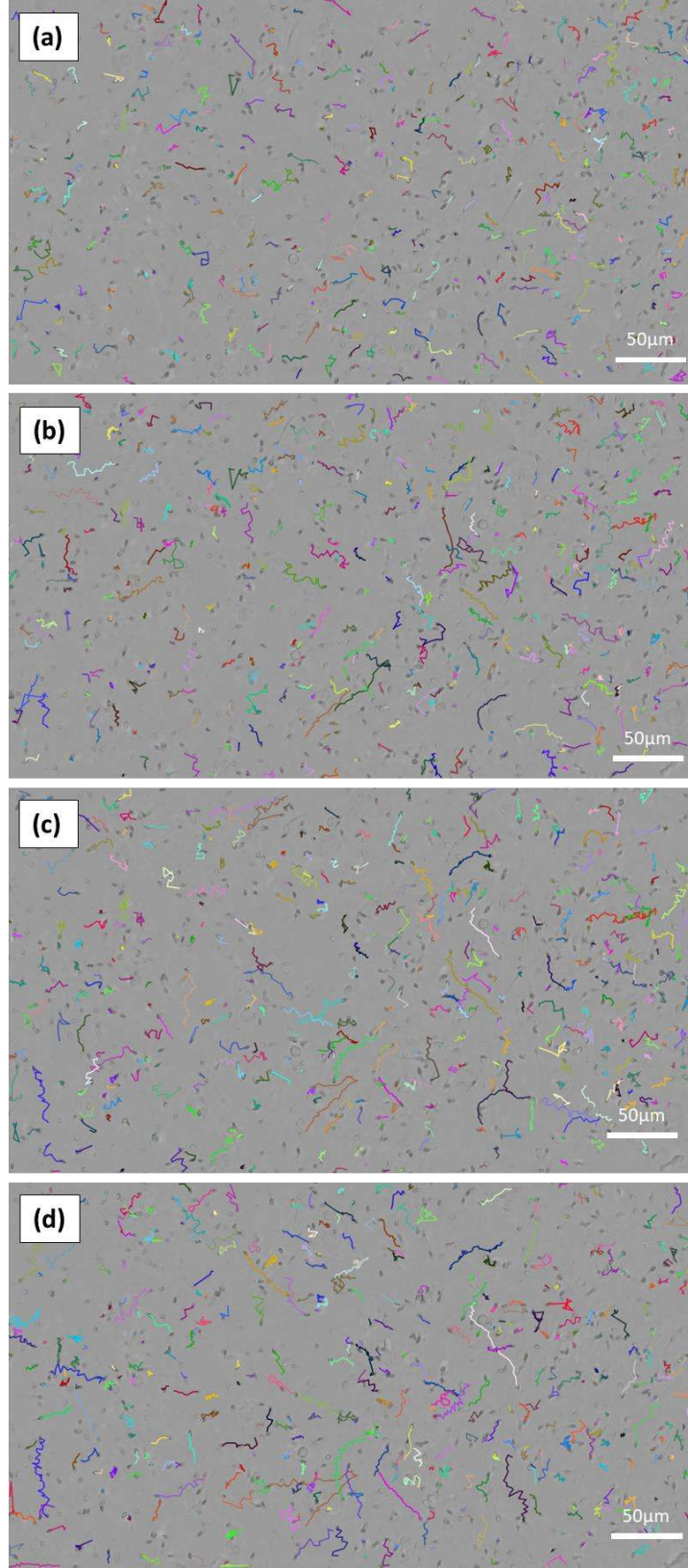
Tablo 3.2. 4 veri setinde elde edilen ortalama sperm sayısı ve mikrometre küpe denk gelen sperm sayısı. Köşeli parantez içerisindeki değerler 25. ve 75. yüzdelerlik dilim çeyrekler arası aralıkları göstermektedir. Tüm veri setleri üzerinden ortalama sperm sayısı 609,1 (standart sapması 60,3) ve mikrometre küpte sperm sayısı $89,9 \times 10^{-6}$ 'dır (standart sapması $8,9 \times 10^{-6}$).

Veri Seti	N	$N/\mu\text{m}^3 \times 10^{-6}$
1	557,3 [547,0-567,5]	82,2 [80,7-83,8]
2	646,1 [634,5-657,0]	95,4 [93,6-97,0]
3	674,7 [662,5-687,0]	99,6 [97,8-101,4]
4	558,4 [535,5-580,5]	82,4 [79,0-85,7]

Ardışık görüntülerde sperm rotaları farklı görüntüleme zamanına göre atanan merkez noktaları kullanılarak elde edilmiştir [50]. Şekil 3.8'da rotalama işlemi basit olarak ardışık üç görüntü (j , $j+1$, $j+2$) üzerinde illüstre edilmiştir. Bir sperm hücresinin merkezi görüntü j anında tespit edilir. Tespit edilen bir spermin j görüntüsündeki merkezi, görüntü $j+1$ 'deki tüm sperm merkezleri ile karşılaştırılır ve en yakın uzaklıktaki merkezle eşleştirilerek o spermin $j+1$ görüntüsündeki merkezi olarak kaydedilir. Bu eşleştirme j görüntüsü üzerinde tespit edilen her bir sperm için yapılır. Benzer şekilde eşleştirmeler $j+1$ ve $j+2$ görüntüleri arasında ve diğer ardışık görüntüler arasında yapılır ve her bir spermin rotası zamana bağlı merkez noktasının değişimi olarak hesaplanır. Bu takip işleminde takip edilen her bir sperm numaralandırılır. Sperm numarası, görüntü numarası (zamanı) ve sperm merkez pozisyonları ile beraber kaydedilir. Şekil 3.8'da rotalama işlemi ardışık görüntülerde eşit sayıda tespit edilen sperm hücreleri için gösterilmiştir. Bir sonraki görüntüde eğer M sayıda daha az sperm tespit edilirse bu M sayıda sperm rotasının bir önceki görüntüde sonlandırıldığını ifade eder. Diğer taraftan, bir sonrası görüntüde eğer M sayıda daha fazla sperm tespit edilirse bu M sayıda yeni sperm rotalarının bir sonraki görüntüde sıfırdan başladığını ifade eder. Spermilerin başlangıç ve bitiş görüntü zamanları doğal olarak birbirinden farklılık gösterebilir. Bu yüzden spermilerin rota uzunlukları birbirinden farklı olabilir.



Şekil 3.8. Ardışık 3 görüntü üzerinde sperm merkez noktaları kullanılarak elde edilen sperm rota illüstrasyonu.



Şekil 3.9. 10x büyütmede spermilerin farklı görüntülerdeki rotaları. Takip edilen her bir sperm farklı renk ile gösterilmiştir. (a) 0,5 sn, (b) 1,0 sn, (c) 1,5 sn, (d) 2,0 sn

Kinematik analizlerde sadece ardışık en az 5 görüntü boyunca takip edilebilen spermier düşünölmüştür. Sperm dışında olan hücre (lökosit gibi) ve diğier yabancı yapıların olası rotalarını elemek için bir morfolojik parametre olan dairesellik kullanılmıştır. Sadece rotası boyunca dairesellik değieri 0,7'den büyük olan yapılar analizde düşünölmüştür. Dairesellik değieri eşitlik (3.3) ile hesaplanır. Burada A yapının toplam alanını ve P ise çevresini tanımlamaktadır.

$$\frac{\sqrt{4\pi A}}{P} \quad (3.3)$$

Şekil 3.9' de farklı zamanlarda sperm rotaları farklı renkler ile gösterilmiştir. Aynı sperm için rota renkleri aynı olarak kodlanmıştır. Bazı rotaların tüm görüntülerde devam ettiğı bazı rotaların sonlandırıldığı bazıının ise yeni rotaların oluşturulduğu görölmektedir. Kinematik parametrelerin, özellikle VAP parametresinin hesabında en az ardışık 5 görüntüde rotalanmış spermier kullanılmıştır.

Eğriçizgisel hız VCL hesabında, sperm hücresinin ardışık görüntülerdeki merkez noktalarının arasındaki uzaklık kullanılmıştır. Örneğın görüntü j 'de pozisyonu (x_j, y_j) ve görüntü $j+1$ 'de pozisyonu (x_{j+1}, y_{j+1}) olan spermın j pozisyonundaki VCL hızı eşitlik (3.4) ile hesaplanır.

$$\frac{\sqrt{(x_{j+1} - x_j)^2 + (y_{j+1} - y_j)^2}}{\Delta t} \quad (3.4)$$

Burada $\Delta t = 1/\text{fps}$ ardışık iki görüntü arasındaki zaman farkını göstermektedir. Sperm rotası boyunca VCL hız değierleri bulunup, o sperm için ortalama VCL hız değieri hesaplanır ve kaydedilir.

Doğrusal hız VSL hesabında, sperm hücresinin ilk ve son görüntüsündeki merkez noktalarının arasındaki uzaklık kullanılır. Örneğın ilk görüntüde pozisyonu (x_0, y_0) ve son görüntüde pozisyonu (x_M, y_M) olan spermın VSL hızı eşitlik (3.4) ile hesaplanır.

$$\frac{\sqrt{(x_M - x_0)^2 + (y_M - y_0)^2}}{\Delta t} \quad (3.4)$$

Ortalama yol hızı VAP, her bir spermin rotası hareketli ortalama kullanılarak hesaplanır. Hareketli ortalama değeri 5 görüntü olarak alınmıştır. Örneğin görüntü j’de düzleştirilmiş pozisyonu (x_j, y_j) ve görüntü j+1’de düzleştirilmiş pozisyonu (x_{j+1}, y_{j+1}) olan spermin j pozisyonundaki VAP hızı eşitlik (3.5) ile hesaplanır.

$$\frac{\sqrt{(x_{j+1} - x_j)^2 + (y_{j+1} - y_j)^2}}{\Delta t} \quad (3.5)$$

Sperm rotası boyunca VAP hız değerleri bulunup, o sperm için ortalama VAP hız değeri hesaplanır ve kaydedilir.

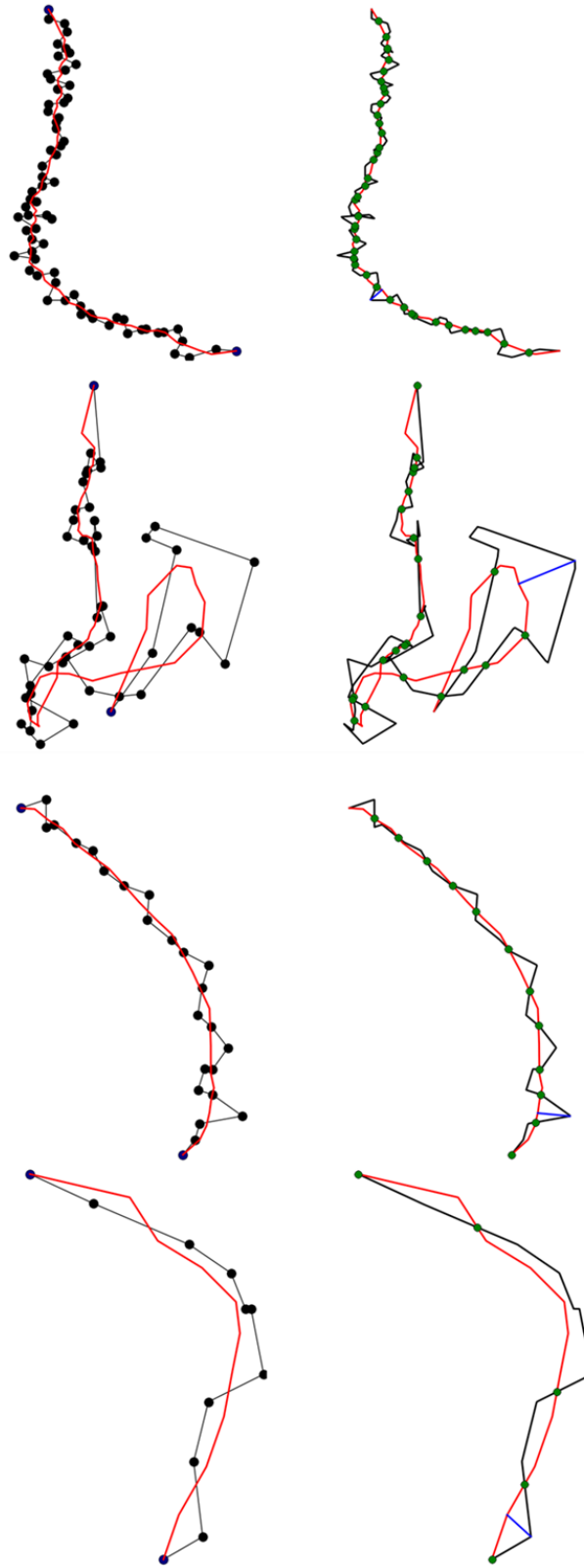
Yanal kafa genliği ALH, VCL ve VAP eğrilerinin birbirinden genlik farkı olarak hesaplanır. Her bir spermin rota boyunca maksimum ALH ve ortalama ALH değerleri bulunmuştur.

Çapraz vuruş frekansı BCF, VCL ve VAP eğrilerinin birbirini kestiği noktalardan hesaplanır. Bu kesişim noktaları arasındaki zaman farkı frekans hesabında kullanılmıştır. Rota boyunca elde edilen BCF değerlerinin ortalaması her bir sperm için bulunmuştur.

Ortalama açısal yer değiştirme MAD hesabında, ardışık görüntülerdeki merkez noktaları kullanılmıştır. Örneğin görüntü j’de pozisyonu (x_j, y_j) ve görüntü j+1’de pozisyonu (x_{j+1}, y_{j+1}) olan spermin j pozisyonundaki MAD değeri eşitlik (3.6) ile hesaplanır.

$$\cos^{-1}\left(\frac{x_j x_{j+1} + y_j y_{j+1}}{\sqrt{x_j^2 + y_j^2} \sqrt{x_{j+1}^2 + y_{j+1}^2}}\right) \quad (3.6)$$

Burada $\Delta t=1/\text{fps}$ ardışık iki görüntü arasındaki zaman farkını göstermektedir. Sperm rotası boyunca MAD değerleri bulunup, o sperm için ortalama MAD değeri hesaplanmıştır. Şekil 3.9’da zamana bağlı takip edilen farklı uzunluklara sahip bazı sperm rota örnekleri gösterilmiştir. Sol sütunda, siyah noktalar her bir takip edilen spermin farklı görüntülerdeki pozisyonu yani VCL eğrisini göstermektedir. Ortalama alınarak hesaplanan VAP eğrisi kırmızı çizgi ile gösterilmektedir. VSL analizinde kullanılan başlangıç ve bitiş pozisyonları ise mavi noktalar ile işaretlenmiştir. Sağ sütunda ise, BCF analizinde kullanılan VCL ve VAP eğrilerinin kesişimleri yeşil noktalar ile, VCL ve VAP eğrisi arasındaki maksimum ALH değerinin ölçüldüğü mesafe ise mavi çizgi ile belirtilmiştir. Belirtilen bu hesaplamalar 4 veri setinde takip edilen her bir sperm rotası için ayrı ayrı hesaplanıp kaydedilmiştir.



Şekil 3.10. Zamana bağlı takip edilen farklı uzunluklara sahip sperm rota örnekleri.

Eğriçizgisel yolun doğrusallığını ifade eden LIN, her bir sperm rotası boyunca elde edilen ortalama VSL ve VCL değerlerinin birbirine yüzdesel oranlanmasıyla bulunmuştur. Sperm hücresinin hareket yolunun, ortalama yola göre ne kadar salınım hareketi yaptığının ölçüsü olan WOB ise VAP ve VCL değerlerinin her bir sperm için yüzdesel oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Ortalama sperm hareket yolunun doğrusallık derecesini ifade eden STR parametresi ise VSL ve VAP değerlerinin birbirine yüzdesel oranlanmasıyla belirlenmiştir. Hareketlilik parametresi MOT, ortalama VCL değeri 5 $\mu\text{m/s}$ den büyük olan spermelerin sayısının toplam sperm sayısına oranı ile bulunmuştur. Hızı bu değerden küçük olan sperm sayısının toplam sperm sayısına oranı ise hareketsizlik parametresi IM hesabında kullanılmıştır. Ayrıca, VCL hız değeri 25 $\mu\text{m/s}$ den büyük olan spermeler progresif motilite ve hız değeri 25 $\mu\text{m/s}$ den küçük olan spermeler nonprogresif motilite olarak tanımlanmıştır. Progresif sperm sayısının toplam sperm sayısına yüzdesel oranı PR ve nonprogresif sperm sayısının toplam sperm sayısına yüzdesel oranı NP olarak tanımlanıp hesaplanmıştır.

Tablo 3.3’de 4 veri seti içerisindeki tüm spermeler ile elde edilen ortalama kinetik parametreler gösterilmektedir. 130 adet görüntü içeren her bir setin toplam tespit ve takip dahil toplam analiz zamanı 240 sn.’dir. Toplam takip edilen ve analizlerde kullanılan sperm sayısı 1.178 ile 1.399 arasında değişmektedir. Parantez içerisindeki değerler 25. ve 75. yüzdelik dilim çeyrekler arası aralıkları göstermektedir. İstatiksel olarak verilerin %50’si bu aralıklar arasındadır. VCL değeri tüm veri setlerinde 70 $\mu\text{m/s}$ ’den büyük, VAP ve VSL değerleri ise 45 $\mu\text{m/s}$ ve 36 $\mu\text{m/s}$ ’den büyük olarak bulunmuştur. Beklenildiği gibi VCL değeri VAP’tan, VAP değeri de VSL değerinden büyüktür. Ortalama ALH değeri yaklaşık olarak 1 μm iken maksimum ALH değerinin 3 μm civarı olduğu görünmektedir. BCF değeri tüm setlerde yaklaşık 15 Hz. olarak hesaplanmıştır. Doğrusallık LIN %50 civarı bulunmuş, salınım değeri WOB ise %60’tan büyük olarak hesaplanmıştır. STR değeri tüm veri setlerinde %80’e yakın olup, genel olarak spermelerin doğrusal bir hareket izlediği gözlemlenmiştir. Hareketlilik MOT %95 üzeri bulunmuş olup takip edilen spermelerin çoğunun rotası boyunca ortalama VCL hızının 5 $\mu\text{m/s}$ den büyük olduğu görünmüştür. Hareketsiz IM olan spermelerin yüzde oranı düşük olup %5’ten küçüktür. Progresif olan spermelerin oranı PR, tüm veri setlerindeki spermelerin %75’ten büyük kısmının hızının 25 $\mu\text{m/s}$ yüksek olduğunu göstermekte olup, hızının 25 $\mu\text{m/s}$ düşük spermelerin oranı NP’nin ise yüzde 20% civarı olduğu görülmüştür.

Tüm veri setleri üzerinden ortalama alınarak hesaplanan kinematik parametreler Tablo 3.4’de gösterilmektedir. Standard sapma değerleri veri setleri arasında değişimin düşük olduğunu ifade etmektedir. Denek A için $VCL = 1,58 \times VAP$ ve $VAP = 1,25 \times VSL$ olduğu ve VCL’nin VSL’den yaklaşık 2 kat büyük olduğu görünmektedir. Bu, salınım değeri WOB’un %63, STR değerinin %80 ve doğrusallığın (LIN) %50 civarı olduğu göstermektedir. VCL ve VAP eğrileri arasındaki maksimum mesafe 2,8 μm ve ortalama mesafe 1 μm ’dir. BCF değerinin yaklaşık 15 Hz (fps/2) olması genel olarak VCL ve VAP eğrilerinin her iki görüntüde bir kesiştiğini ifade etmektedir. Yüksek motilite değerine (%96) sahip Denek A’dan alınan sperm numunelerin de aynı zamanda yüksek progresif sperm sayısına (%76) sahip olduğu bulunmuştur.

Tablo 3.3. 4 veri setinde ölçülen kinematik parametreler. Parantez içerisindeki değerler 25. ve 75. yüzdilik dilim çeyrekler arası aralıkları göstermektedir.

VERİ SETİ	1	2	3	4
N	1254	1317	1399	1178
VCL [$\mu\text{m/s}$]	73,8 (46,0, 97,8)	72,7 (43,2, 97,8)	73,8 (47,5, 96,7)	76,3 (47,0, 103,2)
VAP [$\mu\text{m/s}$]	45,8 (26,2, 62,3)	45,6 (24,5, 63,5)	46,6 (27,0, 63,4)	49,5 (27,2, 68,3)
VSL [$\mu\text{m/s}$]	36,5 (16,5, 53,5)	36,1 (14,9, 53,5)	37,0 (16,3, 54,2)	40,4 (15,3, 60,2)
ALH maks. [μm]	2,8 (1,6, 3,8)	2,9 (1,5, 3,8)	2,8 (1,7, 3,6)	2,8 (1,6, 3,8)
ALH ort. [μm]	1,1 (0,6, 1,5)	1,0 (0,6, 1,4)	1,0 (0,6, 1,4)	1,0 (0,6, 1,4)
BCF [Hz]	15,2 (11,7, 18,4)	15,3 (12,0, 18,3)	15,3 (11,7, 18,5)	15,6 (12,5, 18,8)
MAD [$^{\circ}$]	30,2 (18,2, 39,0)	31,3 (18,4, 40,5)	31,0 (17,9, 39,7)	29,5 (17,5, 37,2)
LIN [%]	49,5	49,6	50,1	52,9
STR [%]	79,7	78,8	79,3	81,7
WOB [%]	62,1	63	63,2	64,8
MOT [%]	95,7	96,2	95,2	98,9
PR [%]	76,3	74,8	76,6	76,2
NP [%]	19,4	21,4	18,6	22,7

Tablo 3.4. 4 veri setinden elde edilen kinematik parametrelerin ortalaması ve standart sapması.

	ORT.	SS
VCL [$\mu\text{m/s}$]	74,2	1,5
VAP [$\mu\text{m/s}$]	46,9	1,8
VSL [$\mu\text{m/s}$]	37,5	2,0
ALH maks. [μm]	2,8	0,1
ALH ort. [μm]	1,0	0,1
BCF [Hz]	15,4	0,2
MAD [$^{\circ}$]	30,5	0,8
LIN [%]	50,5	1,6
STR [%]	79,9	1,3
WOB [%]	63,3	1,1
MOT [%]	96,5	1,7
PR [%]	76,0	0,8
NP [%]	24,0	0,8

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ankara Şehir Hastanesi Androloji-Üroloji kliniğinden alınan 18 yaşındaki Denek A'dan alınan sperm numunesinden 4 ayrı veri seti alınarak 14 farklı kinematik parametre için algoritmalar geliştirilerek sperm analizi için özgün bir CASA sistemi geliştirildi. Denek A'dan üçer dakikalık ara ile alınan dört farklı veri seti için her bir kinematik parametre ayrı ayrı ölçülerek yazılımın güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği sağlandı. Bu parametreler daha önce literatürde yapılan benzeri çalışmalar ile karşılaştırıldı ve anlamlı sonuçlar elde edildiği tespit edildi. WHO'nun sperm kinematik parametreleri için referans değerleri belirlememesinden dolayı hız ölçümleri için alt veya üst referans değerleri arasında olup olmadığı yorumu yapılamamaktadır. Fakat Tablo 4.1.'de gösterildiği üzere yapılan benzeri çalışmalarla ve veri setlerimiz arasındaki değişkenlik göz önünde bulundurulduğunda anlamlı sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

Ölçülen bazı sperm kinematik değerleri literatürde bulunabilen daha önce ölçülmüş parametrelerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda genel olarak değerlendirildiğinde temel kinematik parametrelerin tümünün ölçülmediği ve ölçüldüyse de geliştirilen bir algoritma ile değil, hastanelerde ya da klinikler mevcut olarak kullanılan CASA sistemleri ile yapıldığı görülmüştür.

Örneğin Slotter et al., yapmış oldukları çalışmada tüm kinematik parametrelerin sonuçlarını birbirleri ile karşılaştırarak yaş faktörünün sperm hızına etkisini araştırmışlardır. Burada hastanede mevcut HTM-Ceros isimli CASA sistemi ile ölçümleri gerçekleştirmişlerdir ve bu ölçülen değerler bu çalışmadan ölçtüğümüz parametreler ile karşılaştırılmıştır. Literatür araştırması sırasında yanıl kafa genliğinin bazı çalışmalarda ortalama değerini bazı çalışmalarda ise maksimum değerini hesapladıkları görüldü. Geliştirilen algoritma ile spermin VCL hızı ile VAP hızı arasında iki nokta arası uzaklık formülünden maksimum uzaklığa sahip değer bulunarak ALH_{max} olarak isimlendirildi. VCL ve VAP arasındaki tüm noktalar arası mesafe hesaplanarak ALH_{ort} değeri hesaplandı.

Davis et al., yaptıkları çalışmada farklı fps değerlerinde alınmış hem manuel hem de iki farklı CASA sisteminde VCL, VSL ve ALH_{max} değerlerini ölçümünü gerçekleştirmiş ve bu sistemleri birbirleri ile karşılaştırmıştır.

Kraemer et al., sıcaklık artışının sperm hareketleri üzerindeki etkisini araştırdığı için sperm kinematik parametreleri diğer çalışmalarda ölçülen parametrelere kıyasla daha yüksek çıkmıştır.

Di Caprio et al, ise sperm hareketlerini geliştirdikleri algoritma sayesinde 4 boyutlu olarak gerçekleştirmişlerdir ve sperme ait VCL, VSL ve VAP hızlarını ölçmüşlerdir.

VCL, VAP, VSL, ALH ve BCF değerleri bu çalışmada ölçülen değerlerle paralellik göstermektedir. Tablo 4.1’de yapılan bu çalışmada ([*]) ölçülen parametreler literatürdeki parametrelerle karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.1. Ölçülen bazı kinematik parametrelerin literatürde bulunan değerler ile karşılaştırılması.

	VCL [µm/s]	VAP [µm/s]	VSL [µm/s]	ALH maks. [µm]	ALH ort. [µm]	BCF [Hz]
[*]	74,2	46,9	37,5	2,8	1,0	15,4
Sloter et al. [14]	80,7	55,8	49,1	3,7	-	25,2
Kraemer et al. [12]	119,0	-	54,0	7,5	-	-
Di Caprio et al. [19]	69,5	67,7	22,4	-	-	-
Hirano et al. [13]	82,5	46,1	56,1	4	-	23,6
Akashi et al. [15]	57,4	-	-	-	1,4	10,0
Mortimer et al. [11]	83,5	-	-	3,8	2,4	-
Davis et al. [10]	52,0	-	32,3	3,0	-	-

Bu tezde insan sperm kinematik parametrelerin ölçümünü sağlayan bir CASA analiz yöntemi geliştirilmiştir. 14 parametrenin ölçülebildiği bu sistemde bir denekten alınan numune üzerinde detaylı analizler yapılmıştır. Mikroskobik görüntüleme tekniğine dayalı olarak geliştirilen bu sistem aynı zamanda ölçülen parametrelerin WHO veya başka kurumlar tarafından tanımlanan referans değerleri içinde olup olmadığı kontrol edebilmektedir. Bu sistemde ölçülen parametreler ile insan infertilitesi hakkında kesin bir yargıya varılamasa da erkek infertilitesi için kantitatif değerlendirmeler yapılmasını sağlar.

Mevcut geliştirilen sistem ileriki aşamalarda standart parametrelere ek üremeyi olumlu ya da olumsuz yönde etkileyecek parametrelerin incelenerek literatüre kazandırılması ve üremeyi etkileyecek parametrelerle ilgili yapılacak çalışmaların önünün açılması öngörülmektedir. Bu tür çalışmalar ile, infertiliteyi etkileyen spermin sayısı, hareketi ve morfolojik yapısı daha doğru şekilde incelenebilecek ve CASA yönteminin uygun ve doğru bir tanı yöntemi olarak kullanılabileceği tüm yönleriyle değerlendirilebilecektir.

Literatürde yer alan örneklerin çoğu hayvan semeniyle yapılmış çalışmalardır olup insan spermi ile yapılan çalışmalarda ise kinematik parametrelerin çoğu ölçülmemiştir. Yapılan bu çalışma ile insan spermi çalışmaları örneklendirilerek daha sonra yapılacak çalışmalar için daha kapsamlı bir sistem geliştirilebilir.

İleride yapılacak çalışmalarda ise ölçülen 14 sperm kinematik parametrelerinin çoklu sperm örnekleri ile hastalık bazlı incelemeleri yapılarak sperm hareketlerinden belli bir hastalık tanısı konulması veya erkek üroloji sistemi karakteri ile ilgili farklı yorumlar yapılmasına olanak sağlayabilir.

Yapılacak diğer çalışmalarda ise sıcaklık değişimi, kimyasal ve diğer çevresel faktörlerin sperm motilitesi üzerindeki olumlu veya olumsuz etkileri detaylı olarak araştırılarak analiz edilebilir.

CASA sisteminde ölçülen makroskobik ve mikroskobik incelemelerde makroskobik inceleme sırasında ölçülen hacim, pH, sıcaklık gibi parametrelerin, analizin sadece mikroskobik olarak incelenmesine olanak sağlanabilmesi için sperm analizine özel tasarlanacak mikrokanallar geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] W. Cui, “Mother or nothing: the agony of infertility.,” *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 88, no. 12. pp. 881–882, 2010. doi: 10.2471/blt.10.011210.
- [2] F. Erdemir, F. Firat, and Y. Gencten, “The Evaluation and Clinical Significance of Sperm Morphology,” *Türk Üroloji Seminerleri/Turkish Urology Seminars*, vol. 2, no. 1, pp. 11–17, Jan. 2011, doi: 10.5152/tus.2011.03.
- [3] “Modern Yaşamın İnfertilite Üzerine Etkisi [Effect of the Modern Life on Infertility]”, doi: 10.5455/pmb.
- [4] A. Gokce, “Standard Semen Analysis Criteria of World Health Organization,” *Türk Üroloji Seminerleri/Turkish Urology Seminars*, vol. 2, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2011, doi: 10.5152/tus.2011.01.
- [5] J. C. Lu, Y. F. Huang, and N. Q. Lü, “Computer-aided sperm analysis: Past, present and future,” *Andrologia*, vol. 46, no. 4, pp. 329–338, 2014, doi: 10.1111/and.12093.
- [6] World Health Organization., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. World Health Organization, 2010.
- [7] Z. Nur, Ü. Günay, İ. Doğan, B. Başpınar, and Mk. Soylu, “Teke Spermasının Morfolojik Değerlendirilmesinde Farklı Boyama Metotlarının Kullanılması,” 2003.
- [8] R. P. Amann and D. F. Katz, “Andrology Lab Corner* Reflections on CASA After 25 Years.”
- [9] Vandemark N L, *Exploration of electronic methods for evaluating sperm motility*. 1958.

- [10] R. O Davis and D. F. Katz, "Standardization and Comparability of CASA Instruments." doi: 10.1111/j.1939-4640.1992.tb01632.x.
- [11] S. T. Mortimer and M. A. Swan, "Variable kinematics of capacitating human spermatozoa*," 1995. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/10/12/3178/626747>
- [12] M. Kraemer, C. Fillion, B. Martin-Pont, and J. Auger, "Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system," *Human Reproduction*, vol. 13, no. 3, pp. 611–619, 1998, doi: 10.1093/humrep/13.3.611.
- [13] Y. Hirano *et al.*, "Accuracy of sperm velocity assessment using the Sperm Quality Analyzer V," *Reprod Med Biol*, vol. 2, no. 4, pp. 151–157, Dec. 2003, doi: 10.1111/j.1447-0578.2003.00039.x.
- [14] E. Slotter, T. E. Schmid, F. Marchetti, B. Eskenazi, J. Nath, and A. J. Wyrobek, "Quantitative effects of male age on sperm motion," *Human Reproduction*, vol. 21, no. 11, pp. 2868–2875, 2006, doi: 10.1093/humrep/del250.
- [15] T. Akashi, A. Watanabe, A. Komiya, and H. Fuse, "Evaluation of the Sperm Motility Analyzer System (SMAS) for the assessment of sperm quality in infertile men," *Syst Biol Reprod Med*, vol. 56, no. 6, pp. 473–477, Dec. 2010, doi: 10.3109/19396361003786293.
- [16] V. S. Abbiramy, V. Shanthi, and C. Allidurai, "Spermatozoa detection, counting and tracking in video streams to detect asthenozoospermia," in *Proceedings of the 2010 International Conference on Signal and Image Processing, ICSIP 2010*, 2010, pp. 265–270. doi: 10.1109/ICSIP.2010.5697481.
- [17] C. Leung, Z. Lu, N. Esfandiari, R. F. Casper, and Y. Sun, *Detection and Tracking of Low Contrast Human Sperm Tail*. 2010.

- [18] M. Ravanfar and M. H. Moradi, "Low contrast sperm detection and tracking by Watershed algorithm and Particle filter," in *2011 18th Iranian Conference of Biomedical Engineering, ICBME 2011*, Jan. 2011, pp. 260–263. doi: 10.1109/ICBME.2011.6168568.
- [19] G. di Caprio *et al.*, "4D tracking of clinical seminal samples for quantitative characterization of motility parameters," *Biomed Opt Express*, vol. 5, no. 3, p. 690, Mar. 2014, doi: 10.1364/boe.5.000690.
- [20] M. Elsayed, T. M. El-Sherry, and M. Abdelgawad, "Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J," *Theriogenology*, vol. 84, no. 8, pp. 1367–1377, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.021.
- [21] L. F. Urbano, P. Masson, M. Vermilyea, and M. Kam, "Automatic Tracking and Motility Analysis of Human Sperm in Time-Lapse Images," *IEEE Trans Med Imaging*, vol. 36, no. 3, pp. 792–801, Mar. 2017, doi: 10.1109/TMI.2016.2630720.
- [22] M. Mawhinney and A. Mariotti, "Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system."
- [23] Ozan H, *Erkek genital sistemi anatomisi*, 2. Baskı. Ankara: Klinisyen Tıp Kitabevleri, 2005.
- [24] N. E. Bachtell, J. Conaghan, and P. J. Turek, "The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation," 1999.
- [25] "ÜREME SİSTEMİ VE ANATOMİSİ." Accessed: May 08, 2022. [Online]. Available:

https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/4402/mod_resource/content/0/3-4.%20hafta.pdf

- [26] J. S. Dixon, P. Y. P. Jen, and J. A. Gosling, “Structure and Autonomic Innervation of the Human Vas Deferens: A Review,” 1998.
- [27] *Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi* Ramazan Aşcı • Selahittin Çayan • Fikret Erdemir İrfan Orhan • Önder Yaman • Mustafa Faruk Usta Muammer Kendirci • Oğuz Ekmekçioğlu • Ateş Kadioğlu. [Online]. Available: www.istanbultip.com.tr
- [28] D. E. Brooks, “Epididymal Functions and their Hormonal Regulation*,” 1983.
- [29] D. W. Fawcett, *A textbook of Histology, in: Male reproductive system*, Twelfth edition. NEY-USA: Chapman&Hall, 1994.
- [30] C. Foresta *et al.*, “Analysis of Meiosis in Intratesticular Germ Cells from Subjects Affected by Classic Klinefelter’s Syndrome,” 1999. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jcem/article/84/10/3807/2660736>
- [31] S. M. Shalet, “Normal testicular function and spermatogenesis,” in *Pediatric Blood and Cancer*, Aug. 2009, vol. 53, no. 2, pp. 285–288. doi: 10.1002/pbc.22000.
- [32] V. Şahintürk, “Subfertil erkeklerin sperm morfolojilerinin ışık mikroskopik ve floresan yöntemlerle incelenmesi,” *Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.*, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2000.
- [33] L. Dee. Russell, *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, 1990.
- [34] Oenhninger SC and Kruger TF, *Spermatozonun Anatomisi ve Moleküler Morfolojisi. Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi Kitabı*, Türkçe Çeviri. İstanbul: Habitat Yayıncılık, 2010.

- [35] F. Erdemir, F. Firat, and Y. Geneten, “The Evaluation and Clinical Significance of Sperm Morphology,” *Türk Üroloji Seminerleri/Turkish Urology Seminars*, vol. 2, no. 1, pp. 11–17, Jan. 2011, doi: 10.5152/tus.2011.03.
- [36] R. Menkveld, F. S. H. Stander, T. J. V. Kotze, T. F. Kruger, and J. A. van Zyl, “The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria,” 1990. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/5/5/586/598899>
- [37] T. F. Kruger *et al.*, “Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization,” 1988.
- [38] G. Haidl and W.-B. Schill, “SPERM MORPHOLOGY IN FERTILE MEN,” 1993.
- [39] O. Bulduk, N. Cengiz Sakarya Üniversitesi, S. Bilimleri Enstitüsü, and H. ve Embriyoloji Anabilim Dalı, “MORPHOLOGICAL OVERVIEW OF INFERTILITY: SPERM HEAD DEFECTS AND FERTILIZATION İNFERTİLİTEYE MORFOLOJİK BAKIŞ: SPERM BAŞ DEFEKTLERİ VE FERTİLİZASYON.”
- [40] Doç.Dr.Esat Orhon, *Sperm Morfoloji Atlası*. İstanbul: Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları, 1995.
- [41] K.-E. Andersson and G. Wagner, “Physiology of Penile Erection,” 1995. [Online]. Available: www.physiology.org/journal/physrev
- [42] R. J. Levin, “The mechanisms of human ejaculation - A critical analysis,” *Sexual and Relationship Therapy*, vol. 20, no. 1, pp. 123–131, Feb. 2005, doi: 10.1080/14681990500037212.

- [43] R. D. Amelar, L. Dubin, and C. Schoenfeld, "Sperm motility," *Fertility and Sterility*, vol. 34, no. 3. pp. 197–215, 1980. doi: 10.1016/s0015-0282(16)44949-6.
- [44] H. E. Chemes and V. Y. Rawe, "Sperm pathology: A step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men," *Human Reproduction Update*, vol. 9, no. 5. pp. 405–428, Sep. 2003. doi: 10.1093/humupd/dmg034.
- [45] A. T. M. Cunha, J. D. O. Carvalho, and M. A. N. Dode, "Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes," *Semina:Ciencias Agrarias*, vol. 36, no. 6, pp. 4365–4376, 2015, doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4365.
- [46] A. Komsky-Elbaz and Z. Roth, "Fluorimetric techniques for the assessment of sperm membranes," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2018, no. 141, Nov. 2018, doi: 10.3791/58622.
- [47] H. Y. Huang, H. T. Fu, H. Y. Tsing, H. J. Huang, C. J. Li, and D. J. Yao, "Motile human sperm sorting by an integrated microfluidic system," *J Nanomed Nanotechnol*, vol. 5, no. 3, 2014, doi: 10.4172/2157-7439.1000199.
- [48] T. G. Leite *et al.*, "Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry," *Anim Reprod Sci*, vol. 120, no. 1–4, pp. 31–38, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.04.005.
- [49] J. Yousefi, "Image Binarization using Otsu Thresholding Algorithm," 2011, doi: 10.13140/RG.2.1.4758.9284.
- [50] N. Chenouard *et al.*, "Objective comparison of particle tracking methods," *Nat Methods*, vol. 11, no. 3, pp. 281–289, Mar. 2014, doi: 10.1038/nmeth.2808.