

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Farklı Likefaksiyon Sıcaklıklarının Semen Osmolalitesi ve Sperm Canlılığı Üzerine Etkileri

Duru ARAS TOSUN¹, Elmas Yaren SUIÇMEZ², Derya GÖKMEN³,
İskender Sinan ÖZKAVUKÇU⁴

¹ Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

⁴ Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi, Ankara.

ÖZET

Semen likefaksiyonu, jel görünümlü semenin prostatta üretilen proteazların enzimatik aktivitesi ile sıvılaştığı proteolitik bir işlemdir. Semen likefaksiyonu için üremeye yardımcı tedavi laboratuvarları arasında farklı uygulamalar benimsenmiştir. Farklı sıcaklıkların semen osmolalitesinde yol açtığı değişikliklerin sperm canlılığı üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bu metodolojik çalışmanın amacı, semen likefaksiyonu farklı sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinde semen osmolalitesinde meydana gelebilecek olası değişimlerin sperm canlılığına etkilerini ortaya koymaktır. Çalışmaya bir Üreme Yardımcı Tedavi Merkezi'ne semen analizi veya intrauterin inseminasyon için başvuran erkek hastalar dahil edilmiştir. Toplam 15 hastadan alınan semen örnekleri iki gruba ayrılarak 37°C'de veya oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Her bir örnek için osmolalite ölçümü likefaksiyonu takiben donma noktası depresyon osmometresi ile yapılmıştır. Sperm hareketliliği Makler sayım kamarasıyla belirlenmiş ve hareket tipleri Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan Semen Analizi Kılavuzu'nda belirtildiği şekilde sınıflandırılmıştır. Sperm canlılığı eozin-nigrozin boyamasıyla test edilmiştir. Gruplar arasındaki fark student's t testiyle belirlenmiştir. Sonuçlar p<0,05 için anlamlı olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında semen osmolalitesi veya sperm hareketliliği ve canlılığı açısından anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Sonuç olarak semen osmolalitesinin veya sperm hareketliliği ve canlılığının likefaksiyon sıcaklığından etkilenmediği belirlenerek üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde rutin olarak kullanılan her iki yöntemin de uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Likefaksiyon. Sıcaklık. Semen osmolalitesi. Sperm canlılığı.

The Effects of Different Liquefaction Temperatures on Semen Osmolality and Sperm Viability

ABSTRACT

Semen liquefaction is a proteolytic process in which semen is liquefied by the enzymatic activity of proteases derived from the prostate. Different practices are adopted among assisted reproduction laboratories for semen liquefaction. Effects of different temperatures to sperm viability due to osmotic changes are unknown. The aim of this methodological study is to reveal the changes in semen osmolality and sperm viability when liquefied at different temperatures. Male patients who applied to an Assisted Reproduction Technologies Center for semen analysis or intrauterine insemination were included to the study. Semen samples from 15 individuals were divided into two groups before liquefaction and were incubated at 37°C or room temperature. For each sample, osmolality measurement was performed with freezing point depression osmometer. Sperm motility was determined by the Makler counting chamber and motility types were classified as specified in the Guideline for Semen Analysis published by the World Health Organization. Sperm viability was determined by eosin-nigrosine staining following liquefaction. Student's t-test was utilized to compare groups and the significance level was set at p<0.05. No significant difference was found between the groups in terms of semen osmolality or sperm motility and viability. As a result, we have shown that semen osmolality or sperm motility and viability are not affected by liquefaction temperature, therefore both practices may be used for semen liquefaction in infertile patients.

Key Words: Liquefaction. Temperature. Semen osmolality. Sperm viability.

Geliş Tarihi: 05.Mart.2022

Kabul Tarihi: 22.Nisan.2022

Dr. Duru ARAS TOSUN
Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi,
Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı,
Ankara.
Tel: 0533 256 18 65
E-posta: duruaras@gmail.com

Yazarların ORCID Bilgisi:

Duru ARAS TOSUN: 0000-0001-8236-4315
Elmas Yaren SUIÇMEZ: 0000-0001-8498-8068
Derya GÖKMEN: 0000-0001-6266-3035
Sinan ÖZKAVUKÇU: 0000-0003-4525-9027

Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT) laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan sperm fonksiyon testleri, fertilizasyonun gerçekleşmesi için en önemli özelliğın erkek üreme hücresinin genotipi olduğu varsayımına dayanarak geliştirilmiş ve sperm sayısı, hareketliliği, canlılığı ve morfolojisini bir arada değerlendirecek şekilde tasarlanmıştır. Bununla birlikte son çalışmalar, genotip-evre etkileşimlerinin sperm hücresinin işlevini düzenlediği yönünde kanıtlar sunmaktadır^{1,2}. Gelişimsel veya çevresel bir uyaran tarafından tetiklenen ve gen ifadesini etkileyen epigenetik değişiklikler paternal kalıtımla nesilden nesile aktarılmaktadır³. Üreme organlarının viskozitesi, hidrojen iyon potansiyeli ve ozmolalitesi sperm fonksiyonlarını etkilemektedir⁴. Bu nedenle YÜT laboratuvarlarında rutin olarak uygulanan tekniklerin sperm hücreleri üzerine fizikokimyasal etkilerinin araştırılması uygulamaların iyileştirilmesi ve başarının arttırılması açısından önemlidir.

Ejeklatta bulunan tüm sperm hücreleri oosite ulaşmak için kat ettikleri yol boyunca -serviksten⁵ tuba uterinalara⁶ kadar- farklı ozmotik ve iyonik streslere maruz kalır. Bu süreç ileri hareketli ve döllenme potansiyeline sahip bir sperm alt popülasyonunun seçilmesi için gereklidir. Kapasitasyon olarak tanımlanan bir grup fonksiyon değişikliği bu seçilimde büyük rol oynar. Sperm hücreleri, fizyolojik koşullarda ozmotik strese maruz kalan tüm diğer hücreler gibi, ozmoregülatör mekanizmalara sahiptir⁷. Ancak spermin ozmoadaptasyon yeteneğinin laboratuvar koşullarında farklı kültür ortamları ve sıcaklıkların yaratacağı ozmotik farklara direnci bilinmemektedir.

Ejekülasyon sırasında prostat sıvısı izotonik durumdaki servikal mukusa seminal vezikül sıvısından daha önce temas eder⁸. İn vivo koşullarda sperm hücrelerinin büyük bir kısmı seminal vezikül sıvısıyla önemli bir temasları olmaksızın izotonik prostat sıvısıyla birlikte atılır⁹. Ancak laboratuvar koşullarında vücut dışına alınan sperm likefaksiyon süreci ve sonrasında hiperozmotik seminal vezikül sıvısına maruz kalır¹⁰. Likefaksiyon, jel görünümlü semenin sıvılaştığı proteolitik enzimlere bağımlı bir sretir¹¹. Holmes ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada likefaksiyon sırasında ozmolalitenin arttığı gsterilmiřtir¹⁰. Dünya Sağlık rgt tarafından yayımlanan semen analizi kılavuzunda ise semen likefaksiyonu için gerekli inkübasyon sıcaklığıyla ilgili net bir öneri olmamasına rağmen, 37°C'de inkübasyon tercih edilmesi gerekliliği ifade edilmektedir¹². Ancak semen ozmolalitesindeki artışın sıcaklıkla ilişkisinin incelendiği bir çalışmada 37°C'de gerçekleştirilen inkübasyonun, oda sıcaklığında likefaksiyona bırakılan örneklere göre daha yüksek ozmolaliteye sahip olduğu tespit edilmiřtir¹³. Yine farklı sreler ve sıcaklıklarda inkübe edilen semen örneklere

değerlendirildiğinde 37 derecelik inkübasyonun DNA fragmantasyonu, metilasyon paterni ve oksijen radikali oluşumu gibi parametrelerde bozulmalara yol açabileceği ifade edilmiştir^{14,15}.

Semen likefaksiyonu için Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) laboratuvarları arasında farklı uygulamalar benimsenmiştir. Likefaksiyon sonunda daha homojen bir karışım elde etmek için numunenin çift boyutlu karıştırıcıyla döndürülmesi gibi yöntemler nerilmekteyse de; rutin uygulama ejaklatın kendi kendine likefiye olmak üzere çoğunlukla 15, nadiren 60 dakikaya uzayan bir süre boyunca oda sıcaklığında veya 37°C'de bekletilmesidir. İki uygulama arasında sıcaklığa bağlı ozmotik değişimlerin varlığı bilinmektedir¹³, ancak bu değişimlerin sperm canlılığıyla ilişkisi bilinmemektedir. Yalnız bir çalışmada artan ozmolaliteyle sperm motilitesi arasında negatif bir korelasyon bulunmuşsa da, sonuçlar likefaksiyon süreciyle iliřkilendirilmemiřtir¹⁶.

Bu çalışmanın amacı, yaygın olarak benimsenen iki farklı likefaksiyon yönteminin semen ozmolalitesine etkilerinin belirlenmesi ve sperm canlılığıyla ilişkisinin ortaya konmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Örneklere toplanması ve deney planı

Çalışma bir ÜYTE merkezine semen analizi ya da intrauterin inseminasyon (IUI) için başvuran normozoospermik erkeklerden alınan semen örneklere gerçekleştirildi (n=15). Çalışmanın etik kurallara uygunluğu yerel İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'na onaylandı (Karar no: İ5-286-21). Çalışmaya yalnız yerel etik kurul tarafından onaylanan Gönüllü Onam Formu'nu imzalayan hastalar dahil edildi. Her bir örnek için gruplar oda sıcaklığı ve 37°C olmak üzere belirlendi.

Ozmolalitenin belirlenmesi

İki ya da üç günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla elde edilen semen örneklere androloji laboratuvarına ulaştığı anda (likefiye olmadan) iki adet santrifüj tüpüne (352095, Falcon, Corning, NY) pastör pipeti yardımıyla eşit hacimde paylaştırıldı. Tüplerden bir tanesi 37°C'lik etüvde (MCO-15AC, Sanyo, Panasonic, Tokyo, Japonya), diğerisi ise oda sıcaklığında (20-25 °C) likefiye olması için 30 dakika süreyle bekletildi. Likefaksiyon sonrası her iki tp içerisindeki örneklere mikropipetr yardımıyla 50 l alınarak 500 l'lik mikro tüplere aktarıldı ve donma noktası depresyon ozmometresiyle (Osmomat 030, Gonotec, Berlin, Almanya) ozmolalite ölümü yapılarak ölümler kaydedildi.

Likefaksiyon Sıcaklığının Sperm Canlılığına Etkisi

Sperm hareketliliğinin belirlenmesi

Likefiye olan semen örnekleri Makler sayım kamarasıyla sperm hareketliliği açısından değerlendirildi ve hareket tipleri Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan Semen Analizi Kılavuzu'nda belirtildiği şekilde hızlı ileri hareketli, yavaş ileri hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz (sırasıyla a, b, c ve d derece) olmak üzere sınıflandırıldı¹².

Sperm canlılığının belirlenmesi

Sperm canlılığının test edilmesi için eozin-nigrozin canlılık boyası kullanıldı. 0,67 g eozin Y (renk indeksi:45380) ve 0,9 g sodyum klorür 100 ml saf su içinde yavaş yavaş ısıtılarak çözüldü. Elde edilen 100 ml eozin Y çözeltisine 10 g nigrozin (renk indeksi: 50420) eklendi. Süspansiyon kaynatıldı ve daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Elde edilen eozin-nigrozin çözeltisi kaba ve jelatinimsi çökeltileri uzaklaştırmak üzere filtre kâğıdından geçirilerek süzülme ve koyu renk cam şişede saklandı¹⁶.

Canlılığın değerlendirilmesi için 5 µl eozin-nigrozin çözeltisiyle 1:1 oranında karıştırılan semen örnekleri 30 saniye oda sıcaklığında inkübe edildi. Semen-boya karışımı lam üzerine yayılarak havada kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparat Entellan ile kapatıldı. Her preparattan farklı alanlardaki 200 sperm hücresi sayılarak; eozin boyasını almayan beyaz hücreler canlı, pembe hücreler ise ölü olarak değerlendirildi ve her bir örnek için canlılık yüzdesi hesaplandı.

Biyostatistiksel analiz

Her bir deney grubu için veriler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler bilgisayar temelli bir yazılım olan SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki fark student's t testiyle belirlenmiştir. Sonuçlar p<0.05 için anlamlı olarak kabul edilmiştir.

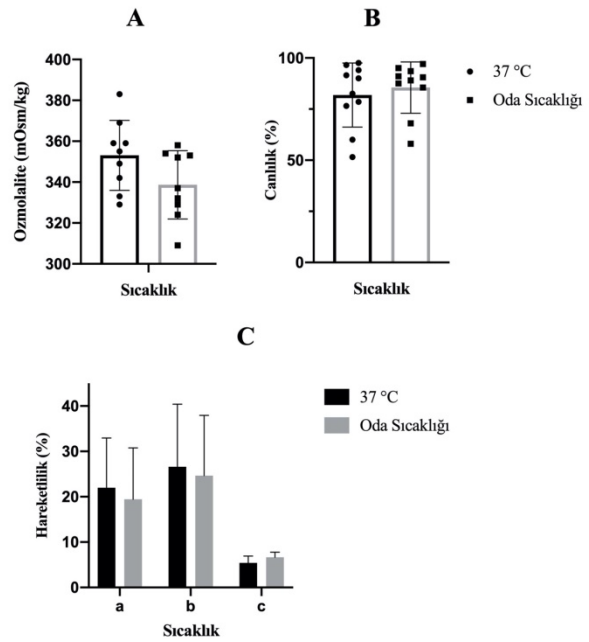
Bulgular

Ejekülasyon sonrasında laboratuvar koşullarında bekletilen tüm örneklerin 30 dakika içerisinde likefaksiyona uğradığı tespit edildi. Etüvde ya da oda sıcaklığında bekletilen aynı kişiye ait örneklerin ortalama ozmolalitesi sırasıyla 353,12 ± 16,14 mOsm/kg ve 338,67 ± 15,73 mOsm/kg olarak belirlenmiştir (Şekil 1A). İstatistiksel analizler sonucunda inkübasyon sıcaklığının semen ozmolalitesini anlamlı düzeyde etkilemediği ortaya konmuştur (p=0,603). Tüm örneklerin ortalaması 345,89 ± 18,11 mOsm/kg olarak belirlenmiştir.

Ozmolalitenin belirlenmesinin ardından eozin-nigrozin boyasıyla işaretlenen sperm hücreleri canlılık açısından değerlendirilmiştir (Şekil 2). Otuz yedi

derecelik etüvde bekletilen aynı kişiye ait örneklerin canlılık oranı %82 ± 0,15 iken, oda sıcaklığında bekletilen örneklerin canlılık oranı %86 ± 0,12 olarak belirlenmiştir (Şekil 1B). Gruplar arasında canlılık oranı açısından istatistiksel anlamlı bir farka rastlanmamıştır (p=0.457). Sperm sayısının ozmolalite (p=0,358) ve sperm canlılığı (p=0,527) ile ilişkisi incelendiğinde anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir.

Otuz yedi derecede likefiye edilen aynı kişiye ait örneklerin hareketlilik oranları a, b ve c dereceler için sırasıyla ve % 22 ± 10,95, %26,6 ± 13,79 ve %5,4 ± %1,52; oda sıcaklığında likefiye edilen örneklerin hareketlilik oranları ise a, b ve c dereceler için sırasıyla %19,40 ± 11,35, %24,6 ± 13,3 ve 6,6 ± 1,14 olarak belirlenmiştir (Şekil 1C). Gruplar arasında a, b ve c derece hareketli sperm sayısı açısından istatistiksel anlamlı bir farka rastlanmamıştır (a, b ve c derece için sırasıyla p=0,970, p=0,986, ve p=0,997).



Şekil 1.

Likefaksiyon sıcaklığının semen ozmolalitesi (A), sperm canlılığı (B) ve sperm hareketliliği (C) ile ilişkisi. (a) hızlı ileri hareketli (b) yavaş ileri hareketli (c) yerinde hareketli.

Farklı likefaksiyon sıcaklıklarının semen ozmolalitesi, sperm hareketliliği ve sperm canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir.



Şekil 2.

Sperm canlılığın eozin-nigrozün boyamasıyla belirlenmesi.

Alandaki ölü hücreler eozini içine alarak pembe renk ile işaretlenmiştir (→). Her bir örnek için canlılık yüzdesi farklı alanlardaki 200 sperm hücresi sayılarak hesaplanmıştır. Ölçek: 10 µ

Tartışma ve Sonuç

Laboratuvar ortamında ejakülasyonunun hemen ardından toplama kabına alınan semen, tipik olarak yarı katı, koagüle bir kitle şeklindedir. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde genellikle likefiye olmaya başlar. Likefaksiyon devam ederken semen daha homojen ve hemen hemen su kıvamında bir sıvı haline gelir. Örneğin tümü genellikle 15 dakika içinde likefiye olur, bu durum nadiren 60 dakika veya daha uzun bir zamana yayılabilir¹⁸. Çalışmamızda kullanılan örneklerin tamamı 30 dakika sonunda likefaksiyonunu tamamlamıştır. Semen numunesi sıvılaşır sıvılaşmaz spermelerin canlılık derecesi tercihen 30 dakika içerisinde değerlendirilmelidir. Dehidratasyonun veya ısı değişikliklerinin sperm vitalitesi üzerine zararlı etkilerini sınırlamak için, en geç ilk 1 saat içinde değerlendirme yapılması önerilir¹⁷. Metodolojik araştırma olarak planlanan bu çalışmada ÜYTE merkezine başvuran 15 hastadan alınan örnekler Cooper ve arkadaşlarının önerisine uygun olarak 30. dakikada sperm hareketliliği ve canlılığı açısından değerlendirilmiştir.

Epididimis ve vas deferensin sıvı içerikleri birbirine benzer olarak yaklaşık 342 mOsm/kg'lık bir ozmolaliteyle karakterizedir. İn vitro koşullarda bekletilen semenin ozmolalitesinin ejakülasyonun ardından 5. dakikada epididimis ve vas deferensin sıvı içeriklerinden daha düşük olduğu (294 ± 4 mOsm/kg), ancak likefaksiyonla birlikte bu değer anlamlı olarak artarak, 312 ± 5 mOsm/kg'a kadar ulaştığı bildirilmiştir¹⁷. Çalışmamızda likefaksiyonun ardından ozmolalite açısından değerlendirilen semen örneklerinde literatürde bildirilen sonuçlarla karşılaştırıldığında hiperozmotik olarak nitelendirile-

bilecek sonuçlar elde edilmiştir. Ancak gerek 37°C'de, gerekse oda sıcaklığında likefiye olan örneklerde bu değerler sperm hareketliliğini veya canlılığını etkilememiştir. Bu nedenle Holmes ve ark.¹⁰ tarafından ejakülat ozmolalitesini düşürmek için önerilen ejakülatın dilusyonu gibi seçeneklerin gerekliliği sperm hareketliliği veya canlılığı açısından tartışmalıdır. Likefaksiyon sırasında ozmolalitenin yükseldiğini bildiren bir başka çalışmada, bu yükselişin sıcaklık artışıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir¹³. Bu sonuçlara karşıt olarak çalışmamızda oda sıcaklığı ve 37°C'de inkübe edilen semen örnekleri arasında ozmolalite açısından istatistiksel anlamlı bir fark izlenmemiştir. Ameen¹⁶ tarafından 2021 yılında yayınlanan bir çalışmada ejakülasyon sonrasında semen ozmolalitesinin 300 mOsm/kg'dan düşük ve 400 mOsm/kg'dan yüksek olmak üzere değişen aralıklarda olabileceği gösterilmiş, ancak çalışmada ozmolalite ölçümünün ejakülasyondan ne kadar süre sonra yapıldığı belirtilmemiştir. Buna karşın semen ozmolalitesinin sperm sayısı, toplam sperm konsantrasyonu, sperm canlılığı ve sperm morfolojisiyle ilişkili olmadığı ortaya konmuştur. 170 semen örneğiyle gerçekleştirilen ve likefaksiyonla ilişkilendirilmeyen bu çalışmada semen ozmolalitesinin yalnız sperm hareketliliğini istatistiksel anlamlı olarak olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir¹⁶. Ancak çalışmamızda likefaksiyonla değişen ozmolalitenin gerek sperm hareketliliği gerekse sperm canlılığı üzerine olumlu veya olumsuz bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda YÜT'de yaygın olarak kullanılan likefaksiyon yöntemleri arasında ozmolalite ve sperm hareketliliği veya canlılığı açısından bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular literatürle birlikte değerlendirildiğinde gerek sperm hareketliliği gerekse sperm canlılığı açısından her iki likefaksiyon yönteminin kullanımının uygun olduğu düşünülmektedir.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan

Araştırmaları Etik Kurulu

Onay Tarihi: 06.05.2021

Karar No: İ5 – 286 – 21

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: İ.S.Ö., D.G.; Veri toplama ve işleme: İ.S.Ö.,

E.Y.S., D.G.; Analiz ve verilerin yorumlanması: D.G., D.A.T.;

Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: D.A.T., İ.S.Ö.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalede yer alan çalışmalar için herhangi bir kurum tarafından finansal destek sağlanmamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Reinhardt K, Dobler R, Abbott J. An ecology of sperm: sperm diversification by natural selection. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2015;46:435-459.

Likefaksiyon Sıcaklığının Sperm Canlılığına Etkisi

2. Lupold S, Pitnick S. Sperm form and function: What do we know about the role of sexual selection? *Reproduction*. 2018;155(5):R229-R243.
3. Kayman-Kurekci G, Bunsuz M, Önal G, Dincer P. Kazanılmış epigenetik değişikliklerin kalıtımı ve hastalıklara yatkınlıktaki rolü. *J Ist Faculty Med*. 2017; 80:1:45-53
4. Lavanya M., Selvaraju S, Krishnappa B, ve ark. Microenvironment of the male and female reproductive tracts regulate sperm fertility: Impact of viscosity, pH, and osmolality. *Andrology*. 2022;10:92-104.
5. Katz D, Bloom T, Bondurant R. Movement of bull spermatozoa in cervical mucus. *Biol Reprod*. 1981;25(5):931-937.
6. Ho H-C, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*. 2001;122(4):519-526.
7. Zhang Z, Ferraris JD, Brooks HL, Brisc I, Burg MB. Expression of osmotic stress-related genes in tissues of normal and hyposmotic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(4):F688-F693.
8. Cooper, TG, Yeung CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Micros Res Tech* 2003;61(1):28-38.
9. Björndahl L, Kvist U. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod BioMed Online*. 2003;7(4):440-448.
10. Holmes E, Björndahl L, Kvist U. Possible factors influencing post-ejaculatory changes of the osmolality of human semen in vitro. *Andrologia*. 2019;51:e13443.
11. Anamthathmakula P, Winuthayanon W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception. *Biol Reprod* 2020;103(2):411–426.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th edition. Geneva: World Health Organization; 2021.
13. Holmes E, Björndahl L, Kvist U. Post-ejaculatory increase in human semen osmolality in vitro. *Andrologia*. 2019;51:e13311.
14. Nematollahi S, Mehdizadeh M, Hosseini S, ve ark. DNA integrity and methylation changes of mouse spermatozoa following prolonged incubation. *Andrologia*. 2019;51(6):e13276.
15. Matsuura R, Takeuchi T, Yoshida A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2010;12(5):753-759.
16. Ameen, EM. Relationships of osmolality and oxidative stress with semen quality and their effects on male fertility. *IHJPAS*. 2021;IHCPAS:1-9.
17. Cooper TG, Barfield JP and Yeung CH. Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *Int J Androl*. 2005;28:58-60.
18. Emami N, Deperthes D, Malm J, Diamandis EP. Major role of human KLK14 in seminal clot liquefaction. *J Biol Chem*. 2008;283(28):19561-19569.

