

T.C.  
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



VERAPAMİL'İN İN VİTRO SPERM PARAMETRELERİ  
ÜZERİNDE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECE KUŞCU

TEZ DANIŞMANI  
Dr. Öğretim Üyesi Elif ŞAHİN

İSTANBUL, 2024

T.C.  
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



VERAPAMIL'İN İN VİTRO SPERM PARAMETRELERİ  
ÜZERİNDE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECE KUŞCU

TEZ DANIŞMANI  
Dr. Öğretim Üyesi Elif ŞAHİN

İSTANBUL, 2024

T.C.  
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
TEZ ONAY BELGESİ

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı 21111102007 numaralı öğrencisi Ece KUŞCU'nun "Verapamil'in In Vitro Sperm Parametreleri Üzerinde Etkisi" adlı tez çalışması, Enstitümüz Yönetim Kurulunun 28.05.2024 tarih ve 2024/11 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından oy birliğiyle Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi:** 11.06.2024

Dr. Öğr. Üyesi Elif ŞAHİN  
Tez Danışmanı

Prof. Dr. Tülay İREZ  
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Elif Sinem BİRELLER  
Jüri Üyesi

## ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tezde;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

03 / 06 / 2024

Ece KUŞCU

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam sürecinde, beni her daim motive edip bütün sorularımı sonsuz sabırla cevaplayan, her adımda bana destek olan çok kıymetli danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Elif ŞAHİN** ve bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın **Prof. Dr. Tülay İREZ**'e;

Androloji laboratuvarımın imkanlarından faydalanabilmem için destek veren **Dr. Öğr. Üyesi Latif Celal KÜPELİOĞLU**'na;

Tüm çalışmalarım süresince bilgi birikimi ve yardımlarını esirgemeyen değerli sorumlum **Emb. Zeynep ÖZTEL ERFİDAN** ve neşesiyle beni sürekli motive eden, bütün zorlandığım anlarda yanıma koşan canım çalışma arkadaşım **Tuğçe KARAKAŞ**'a;

Son olarak hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, daima yanımda olan annem **Nevin TAN** ve ablam **Çağla KUŞCU AYAR**'a bu zorlu süreçte bana göstermiş oldukları anlayış, destek ve sevgilerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İSTANBUL, 2024

Ece KUŞCU

# İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	İ
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Vi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Erkek İnfertilitesi.....	3
2.2. Semen .....	3
2.2.1. Seminal veziküller .....	4
2.2.2. Prostat bezi .....	4
2.2.3. Bulboüretal (Cowper) bezler.....	4
2.3. Sperm .....	5
2.3.1. Spermatogenez (Proliferasyon).....	5
2.3.2. Spermiyogenez (Farklılaşma) .....	6
2.3.3. Kapasitasyon.....	8
2.3.4. Spermin yapısı .....	8
2.4. Semen Analizi .....	10
2.4.1. Semen makroskopik değerlendirilmesi.....	10
2.4.2. Semen mikroskopik değerlendirilmesi .....	12
2.5. Semen Terminolojisi .....	15
2.6. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	16

2.6.1. Swim-up (doğrudan yüzdürme) yöntemi.....	17
2.6.2. Dansite gradient yöntemi.....	18
2.7. DNA Fragmantasyon .....	19
2.7.1. Comet testi (Single cell gel electrophoresis): .....	20
2.7.2. Terminal transferaz tailing assay (TUNEL): .....	21
2.7.3. Sperm chromatin dispersion (SCD) Testi:.....	22
2.7.4. Sperm chromatin structure assay (SCSA): .....	23
2.7.5. Acridine Orange (Akridin Oranj, AO) tekniği: .....	24
2.8. Hipertansiyon .....	24
2.9. Verapamil .....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Çalışmanın Tasarımı.....	29
3.2. Çalışmaya Dahil Etme ve Dışlama Kriterleri.....	29
3.3. Çalışmada Kullanılacak Yöntemler .....	29
3.3.1. Örnek toplanması.....	29
3.3.2. Semen analizi .....	30
3.3.3. Gradient yöntemi .....	31
3.3.4. Verapamil uygulaması .....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. İstatistiksel Analizler .....	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
6. KAYNAKLAR .....	45

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Semen parametreleri en düşük referans aralığı.....	10
Tablo 3.1: Çalışma grupları .....	32
Tablo 4.1: Gradient yıkama öncesi ve sonrası semen parametreleri.....	34
Tablo 4.2: Verapamil uygulaması sonrası sperm değerleri.....	35
Tablo 4.3: (Gradient Çalışma Öncesi / Gradient Çalışma Sonrası) Değişkeni Wilcoxon Tablosu.....	36
Tablo 4.4: (Gradient Çalışma Sonrası / 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası) Değişkeni Wilcoxon Tablosu .....	37
Tablo 4.5: (Gradient Çalışma Sonrası / 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası) Değişkeni Wilcoxon Tablosu .....	39
Tablo 4.6: (0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası / 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası) Değişkeni Wilcoxon Tablosu.....	40

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Spermatogenez'in şematik gösterimi (Rato vd., 2012) .....	5
Şekil 2.2: Spermin yapısı (Junqueira's Temel Histoloji).....	9
Şekil 2.3: Semen analizi sırasında çekilmiş, kırmızı çember içerisinde aglütinasyon görüntüsü (kendi çekimim) .....	13
Şekil 2.4: Diff-Quick boyama yöntemi ile hazırlanmış, ışık mikroskopunda normal sperm morfoloji görüntüsü (kendi çekimim) .....	15
Şekil 2.5: Swim up yöntemi (Beydola vd., 2013).....	17
Şekil 2.6: Çift fazlı gradient yöntemi (Beydola vd., 2013).....	18
Şekil 2.7: Comet testi floresan mikroskobu görüntüsü .....	20
Şekil 2.8: TUNEL Testi (Floresan mikroskobu).....	21
Şekil 2.9: SCD Testi.....	23
Şekil 3.1: (A)Makler sayma kamarası (B)Makler kamarası mikroskop görünümü (URL-2).....	30

## KISALTMALAR LİSTESİ

**AO:** Acridine Orange

**AOT:** Akridin Oranj Tekniği

**AR:** Akrozomal Reaksiyon

**ARB:** Anjiyotensin II reseptör blokerler

**ART:** Yardımcı üreme teknolojileri

**ATP:** Adenozin trifosfat

**BB:** Beta-blokerler

**DNA:** Deoksiriboz Nükleik Asit

**EB:** Etidyum Bromür

**ED:** Erektıl disfonksiyon

**GBD :** Global Hastalık Yüğü Araştırması (Global Burden of Disease)

**gr:** gram

**ICSI :** İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

**IVF :** In vitro fertilizasyon

**KKB:** Kalsiyum Kanal Blokerler

**m:** Molar

**Mg:** Miligram

**ml:** Mililitre

**mm:** milimetre

**PAP:** Prostat Asit Fosfataz

**pH:** Power of Hydrogen

**PSA:** Prostat Spesifik Antijen

**SCD:** Sperm Chromatin Dispersion

**SCSA:** Sperm Chromatin Structure Assay

**sDF :** Sperm DNA fragmantasyonu

**SKH :** Spermatogonyal Kök Hücreler

**TUNEL:** Terminal Transferaz Tailing Assay

**WHO:** Dünya Sağlık rgt (World Health Organization)

**ZP:** Zona Pellucida

**$\mu$ l:** Mikrolitre

**$\mu$ m:** Mikrometre

**$^{\circ}$ C :** Santigrat Derece

## ÖZET

### VERAPAMIL'İN IN VITRO SPERM PARAMETRELERİ ÜZERİNDE ETKİSİ

Bu çalışma in vitro Verapamil uygulamasının semen parametreleri etkilerinin incelenmesini içermektedir. Çalışma Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Merkezine Spermiyogram testi için başvuran, örnekleri normozoospermi özelliği gösteren 26 sağlıklı erkekte alınan semen örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Eylül 2023-Mayıs 2024 tarihleri arasında alınan örnekler Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Androloji Laboratuvarında çalışılmıştır.

Çalışmada, hipertansiyon tedavisinde kullanılan ve kalsiyum kanal blokerleri (KKB) grubunun üyesi olan Verapamil'in iki farklı konsantrasyonunun (0,4 ve 0,8 µl) sperm hareketliliği üzerindeki etkileri karşılaştırıldı. Her iki dozda da belirgin bir şekilde yerinde hareketli (+2 motil, c) sperm sayısında artış gözlemlerken, ileri hareketli (+4 motil, a) sperm sayısının ise azaldığı sonucuna ulaşıldı.

Sonuç olarak Verapamil'in semen parametreleri üzerindeki etkileri konusunda aynı sonuçlara ulaşan yeterli sayıda çalışma olmadığı ve bu konuda daha fazla araştırmanın gerekli olduğu görülmektedir. Dünya çapında semen kalitesinin bozulması ve erkek infertilitesine yol açan nedenleri ile ilgili daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Hipertansiyon, Verapamil, İnfertilite

Ece KUŞCU, 2024

## ABSTRACT

### EFFECT OF VERAPAMIL ON IN VITRO SPERM PARAMETERS

This study includes the examination of the effects of in vitro verapamil administration on semen parameters. The study was conducted using semen samples taken from 26 healthy men who applied to Bahçelievler Medical Park Hospital In Vitro Fertilization Center for Spermogram test and whose samples showed normozoospermia. The samples taken between September 2023 and May 2024 were studied in Bahçelievler Medical Park Hospital In Vitro Fertilization Andrology Laboratory.

In the study, the effects of two different concentrations (0.4 and 0.8  $\mu$ l) of Verapamil, a member of the calcium channel blocker group used in the treatment of hypertension, on sperm motility were compared. While we observed a significant increase in the number of motile (+2 motile, c) sperm in both doses, it was concluded that the number of forward motile (+4 motile, a) sperm decreased.

As a result, it seems that there are not enough studies reaching the same conclusions about the effects of Verapamil on semen parameters and more research is required on this subject. More clinical studies are needed on the deterioration of semen quality and its causes leading to male infertility worldwide.

**Keywords:** Hypertension, Verapamil, Infertility

Ece KUŞCU, 2024

## 1. GİRİŞ

İnfertilite, 1 yıl boyunca hiçbir korunma yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanır (Boitrelle vd, 2021; Aka Satar vd., 2023). Erkek üreme fizyolojisi çeşitli faktörlerden etkilenerek daha az sayıda ve düşük motilitede sperm üretir ve erkek infertilitesinin temel sebeplerinden olan anormal sperm morfolojisi gösterebilir (Harris vd., 2011).

Hipertansiyon, erkeklerde fertilitiyi olumsuz etkileyebilecek sistemik bir hastalıktır. Ülkemizde hipertansiyon oranı yaşla birlikte hızla artış göstermektedir. Stresli yaşam, kötü beslenme şartları, fiziksel aktiviteden yoksun yaşam şekli gibi koşullara bağlı olarak genç yetişkinlerde de hipertansiyon tanısı giderek artmaktadır (Kılıç ve Üstü, 2012).

Hipertansiyon tanısı alan hastalarda yaşam şekli tedavisi olarak da adlandırılan non-farmakolojik tedavi oldukça önemlidir. Bu kapsamda kan basıncını kontrol altında tutabilmek amacıyla kan basıncı artışını tetikleyen faktörler üzerinden, yaşam şekli açısından hastanın bilgilendirilmesi ve bu bilgilendirmeye uyumunun artırılması gerekir. Bu durumda hastalara sağlıklı beslenme, düzenli egzersiz, sigara ve alkol kullanımının azaltılması gibi çeşitli değişiklikler önerilir. Bununla birlikte birçok hastada bu değişikliklere ek olarak medikal tedavinin de sürece dahil edilmesi gerekir. Medikal tedaviye başlanmış hastalarda genellikle ömür boyu ilaç kullanımı gerekmektedir (Kılıç ve Üstü, 2012; Arıkan vd., 2020).

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar, kan basıncını düşürmek ve komplikasyon riskini azaltmak amacıyla çeşitli mekanizmalarla etki eder. Aynı zamanda yüksek kan basıncı, genital bölgedeki kan akışını azaltarak spermatogenez sürecini olumsuz etkileyebilir ve erektil disfonksiyona (ED) sebep olabilir (Mensah ve Bakris, 2010; Kılıç ve Üstü, 2012; Slivnick ve Lampert, 2019; Baldota vd., 2022). Erektil disfonksiyon, erkeğin cinsel ilişkiye girmek için yeterli ereksiyonunun sağlanamaması veya sürdürülememesi olarak tanımlanır.

Hipertansif hastalarda ED prevalansı normotansif popülasyondakinin yaklaşık iki katıdır. Hipertansiyonun erektil fonksiyon üzerindeki olumsuz etkisi, endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, eşlik eden diyabet, metabolik sendrom, obezite ve vasküler patolojiler ile de ilişkilidir. Hipertansiyon tedavisi süresi uzadıkça ED insidansı da artabilir (Simone ve Mancusi, 2020; Baldota vd., 2022).

Hipertansiyonla beraber, hipertansif ilaçların erektil disfonksiyona sebep olup olmadığına dair birçok bilimsel çalışma bulunurken bu ilaçların sperm kalitesi ile ilişkili semen parametrelerini ne yönde etkilediğine dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. Spermin kusurlu fonksiyonu, erkek infertilitesinin en büyük nedenlerinden biridir (Morakinyo, Ayodele vd., 2011). Bu sebeple hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçların sperm parametreleri üzerindeki etkilerini bilmek önemlidir. Kalsiyum kanal blokerleri sınıfından olan Verapamil, hipertansiyonu tedavi ederken sperm kalitesini olumsuz etkileyebilir, aynı zamanda yan etki olarak erektil disfonksiyona sebep olabilir. Bu nedenle bu ilaçla tedavi edilen erkeklerin üreme sağlığı yakından takip edilmelidir.

Verapamil, insan spermi üzerindeki in vitro etkileri, hücresel düzeydeki kalsiyum düzenlemesi ve sperm fonksiyonları üzerindeki potansiyel etkileriyle önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Bu tez çalışması, günümüzde oldukça yaygın kullanılan Verapamil'in insan spermi üzerindeki in vitro etkilerini detaylı bir şekilde inceleyerek, bu ilacın üreme sağlığı üzerindeki etkilerini anlamayı ve potansiyel terapötik kullanımını değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, 1 yıl boyunca hiçbir korunma yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanır. İnfertilite, reproduktif çağındaki çiftlerin %10-15'ini etkileyen bir sorundur ve bu sorunun yaklaşık %50'sini tek başına erkek faktörü oluşturmaktadır (Boitrelle vd., 2021; Aka Satar vd., 2023). Erkek üreme sisteminde infertiliteye sebep olabilecek birçok unsur vardır (URL-1). Bunlardan bazıları:

- Üreme sisteminde oluşan bir tıkanıklık sebebiyle ejakülatın dışarı atılmasındaki işlev bozuklukları,
- Hipofiz bezi, hipotalamus ve testisler tarafından üretilen hormonlarda anormalliklere yol açan hormonal bozukluklar,
- Varikosel, genital enfeksiyonlar, kriptorşidizm (inmemiş testis), sperm üretim mekanizmasını etkileyebilecek tıbbi tedaviler (kemoterapi, radyoterapi vb.),
- Çeşitli genetik hastalıklar (Klinefelter sendromu, Kallmann sendromu, Y kromozomu mikrodelsiyonları gibi)
- Anormal sperm fonksiyonu ve kalitesine (anormal motilite ve morfoloji) neden olabilecek durumlar,
- Aşırı alkol ve sigara tüketimi, obezite, stres gibi yaşam tarzına bağlı faktörler, çeşitli çevresel faktörler (toksinlere maruz kalma vb.) (Abu-Musa vd., 2008; Segal vd., 2019).

### 2.2. Semen

Semen, heterojen nitelikte ve ejakulasyon aracılığıyla salınan bir sıvıdır. Erkek üreme sistemindeki yardımcı genital bezlerde üreme işlevinin sürdürülmesi ve sperm üretilmesi için ejakulasyon sırasında sperm ile karışan salgılar üretilir. Bunlar seminal veziküller, prostat bezi ve bulboüretal (Cowper bezleri) bezlerdir (Junqueira Temel Histoloji, 2019).

### **2.2.1. Seminal veziküller**

İki adet olan seminal veziküller ekzokrin bezlerdir ve her biri 15 cm uzunluğunda, kıvrımlı kanallardan oluşur. Yapışkan ve sarımtırak salgının üretimi testosterona bağlıdır. Seminal veziküllerden salgılanan sıvı semenin büyük bir kısmını, yaklaşık %70'ini oluşturur. Bu sıvının bileşenlerinden fruktoz, sperm hücrelerinin enerji üretimi ve hareketliliği için önemlidir. Prostaglandinler, kadın üreme kanalında silya ve kas aktivitelerini uyarıp artırarak sperm etkinliğini desteklerken, fibrinojen ise ejakulasyon sonrasında semenin koagülasyonunu sağlar (Ross vd., 2003; Delilbaşı, 2010; Junqueira Temel Histoloji, 2019).

### **2.2.2. Prostat bezi**

Prostat bezi, idrar kesesinin altında konumlanan ve üretrayı saran bir organdır. Boyutları yaklaşık 2x3x4 cm, ağırlığı 20 gram civarındadır. Prostat bezi 30–50 adet dallanmış tübüloasiner bezden oluşmaktadır (Junqueira Temel Histoloji, 2019). Tübüloasiner bezlerin ürettiği sıvı çeşitli glikoproteinler, spesifik enzimler ve prostaglandin içerir. Ayrıca ejakulasyona kadar bunların depolanmasından sorumludur. Prostat spesifik antijen (PSA) ve prostat asit fosfataz (PAP) burada üretilir. Proteolitik enzim olan PSA, semenogelin proteinlerini parçalayarak spermin yavaş salınımında ve pıhtılaşan semenin sıvılaştırılmasında yardımcı olur. PSA ayrıca prostat kanseri için de bir biyobelirteç olarak kullanılır (Ross vd., 2003; Delilbaşı, 2010; Aalberts vd., 2014; Junqueira Temel Histoloji, 2019).

### **2.2.3. Bulboüretal (Cowper) bezler**

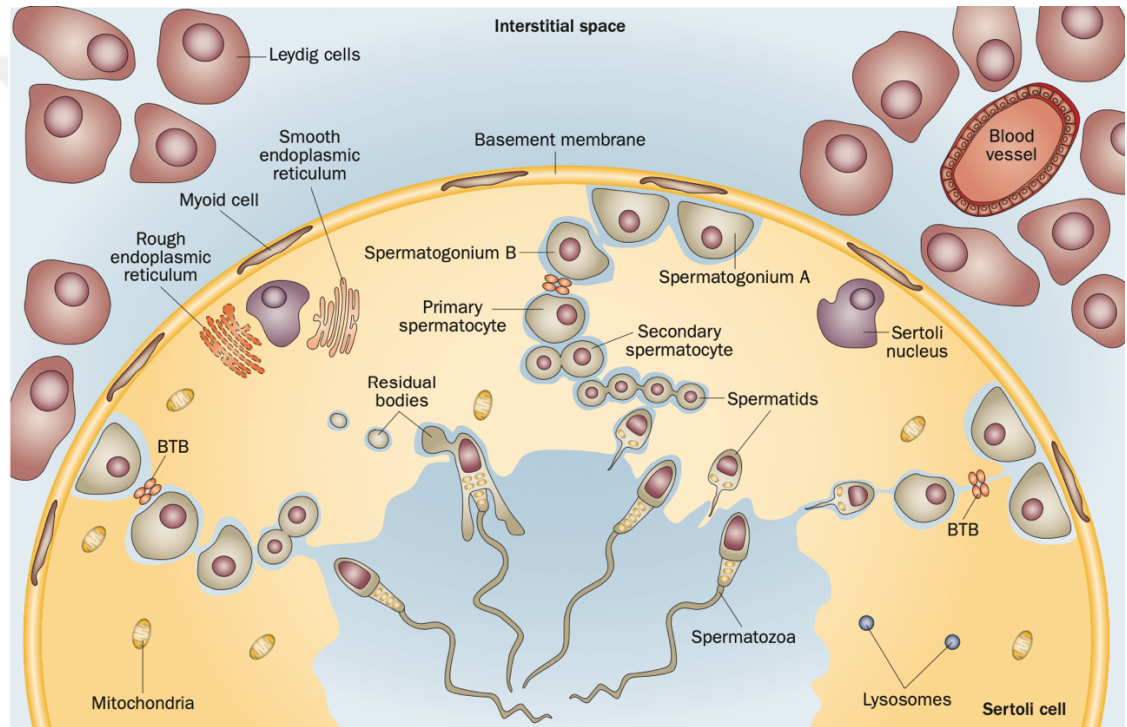
Ürogenital diyaframda bir çift halinde bulunan Cowper bezleri, 3-5 mm çapında ve yuvarlak şekillidir. Cowper bezleri, ereksiyon sürecinde penil üretra boyunca bulunan çok sayıdaki küçük ve histolojik açıdan benzer olan diğer üretral bezler ile birlikte salgıladıkları mukus benzeri sıvı ile üretrayı kayganlaştırarak sperm geçişine hazırlar (Ross ve Pawlina, 2014; Junqueira Temel Histoloji, 2019).

## 2.3. Sperm

### 2.3.1. Spermatogenez (Proliferasyon)

Puberte döneminde başlayan ve spermatogonyal kök hücreler (SKH) olan spermatogonyumların spermatozoaya dönüşmesini kapsayan tüm süreç spermatogenez olarak adlandırılır (Junqueira Temel Histoloji, 2019).

Şekil 2.1’de spermatogenez’in şematik gösterimi verilmiştir.



**Şekil 2.1:** Spermatogenez'in şematik gösterimi (Rato vd., 2012)

Spermatozoa, testiste bulunan seminifer tübüllerdeki germ hücrelerinden gelişir. Bu süreç, bazal membrana komşu kök germ hücrelerinin mitotik bölünmesiyle birlikte başlar. Bu mitotik bölünme sonucu **tip A spermatogonyumlar** oluşur. Tip A spermatogonyum üretiminin başlaması spermatogenezin başlamış olduğunun işaretidir.

Tip A hücreler sınırlı sayıda geçirdikleri mitoz bölünmelerle hücre kümeleri meydana getirirler. Son bölünmeden ortaya çıkan hücreye ise **tip B spermatogonyum** adı verilir (Rato vd., 2012; Junqueira Temel Histoloji, 2019).

Tip B hücrelerin bölünmesiyle de **primer spermatozoid** (46 kromozom, 44+XY, diploid) oluşur. Bu hücreler yaklaşık 3 hafta kadar sürede geçirdikleri I.mayoz bölünmenin sonunda **sekonder spermatozoid** (23 kromozom, 23+X veya 23+Y) olarak adlandırılırlar. Primer spermatozoidlerin aksine sekonder spermatozoidler, II.mayoz bölünmeye hızlı bir şekilde giren kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatozoidlerin bölünmesiyle iki adet 23 kromozom içeren haploid hücre oluşur. Bu hücreler ise **spermatid** olarak adlandırılır (Rato vd., 2012; Chojnacka vd., 2016; O'Donnell vd., 2017; Junqueira Temel Histoloji, 2019; Sadler, 2020).

### 2.3.2. Spermiyogenez (Farklılaşma)

Spermatidlerin spermatozoidlere dönüşmesiyle sonuçlanan değişim sürecindeki olayların tümüne spermiyogenez denir. Bu aşama spermatozoon üretiminin son aşamasıdır. Spermiyogenez, **akrozom** oluşumunu, çekirdek yoğunlaşması ve uzamasını, **flagellum (kamçı)** gelişimini ve sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içeren bir süreçtir (Junqueira Temel Histoloji, 2019).

Spermiyogenez dört evrede incelenebilir (Elder K. ve Dale B., 2011):

- **Golgi evresi:** Spermatidlerin sitoplazmasında belirgin bir golgi kompleksi, serbest ribozomlar, mitokondriler, bir çift sentriyol ve endoplazmik retikulum bulunur. Bu fazda golgi kompleksinden gelen küçük proakrozomal veziküller birleşerek tek katlı bir zarı olan akrozomal başlık (kep) oluşturur. İki adet olan sentriyoller akrozomal başlıktan en uzak noktaya göç eder, bir tanesi flagella aksonemini oluşturmaya başlar.

- **Kep evresi:** Bu fazda, yoğunlaşmış olan çekirdeğin yarısı akrozomal başlık ile kaplanmıştır. Akrozom, hiyalüronidaz ve akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir. Bu akrozomal enzimler lizozom gibi işlev görür.

Spermatozoon bir oosit ile karşılaştığında bu enzimler salınır ve akrozomun dış zarı ile spermatozoonun hücre zarı kaynaşır. Salınan enzimler oositi çevreleyen korona radiyata hücrelerini birbirinden ayırır, zona pellusidayı sindirir.

- **Akrozom evresi:** Gelişen spermin yoğunlaşan çekirdek ve akrozomu içeren baş kısmı, sertoli hücresinin içinde gömülü kalır. Aynı zamanda gelişen aksonem tubülün lümenine uzanır. Flagellumun kuyruk olarak oluşumu devam ederken, boyun kısmında ise mitokondriler birikerek kalınlaşmış orta parçayı oluşturur. Bu kısımda flagellum hareketi için önemli olan ATP üretimi yapılır.
- **Matürasyon evresi:** Hücreler arasındaki köprüler kaybolur, geriye kalan sitoplazma artık cisim olarak atılır. Olgunlaşmış ancak henüz işlevsel ve hareket kabiliyeti kazanmamış olan spermatozoon tubül lümenine bırakılır.

Tam olarak olgunlaştıktan sonra spermatozoa, seminifer epitelden ayrılır, seminifer tubül lümenine salınır ve buradan seminifer tubülün duvarındaki kontraktilemanlarla birlikte olgunlaşıp oositi dölleme yeteneğini kazanacakları epididime doğru itilir. Başlangıçta hareketli olmayan spermatozoa epididimde motilitesini en üst seviyeye çıkarır (Hermo vd., 2019; Junqueira Temel Histoloji, 2019; Sadler vd., 2020).

İnsanlarda, bir spermatozoonun olgun bir sperm hücresine dönüşmesi için gerekli olan süre yaklaşık 74 gündür. Testislerde bir günde yaklaşık 120 milyon sperm üretilir. Üretilen bu spermler vas deferenste depolanmaktadır ancak küçük bir bölümü epididimde de depolanabilir.

Sperm fertilizasyon özelliklerini kaybetmeden en az bir ay depolanabilir. Ancak ejaküle edilen sperm kadının genital kanalında sadece 1 ya da 2 gün yaşayabilir (Junqueira Temel Histoloji, 2019; Sadler, 2020).

### **2.3.3. Kapasitasyon**

Fertilizasyon süreci sperm ve oosit arasında senkronize bir etkileşim gerektirir. Spermin dişi üreme kanalındaki matürasyonuna kapasitasyon denir. Kapasitasyon, spermi hiperaktif hareketlilik kazanmaya ve akrozomal reaksiyona (AR) girmeye hazırlayan bir dizi biyokimyasal ve fizyolojik değişikliği, yani oosite ulaşmak ve onu dölmek için gerekli süreçleri içerir (Leemans vd., 2019; Martinez vd., 2022). Bu süreç sırasında sperm başının ucunda yer alan akrozomun içeriğinin bir kısmı serbest bırakılır. Bu kısım, spermin, zona pellucida (ZP) da dahil olmak üzere oositi çevreleyen katmanları geçmesine yardımcı olabilecek hidrolitik enzimleri içerir (Hirose vd., 2020; Carrasquel vd., 2022). Dişi üreme sisteminde gerçekleşen kapasitasyon insanlarda 6 saat kadar sürer (Elder K. ve Dale B., 2011).

### **2.3.4. Spermin yapısı**

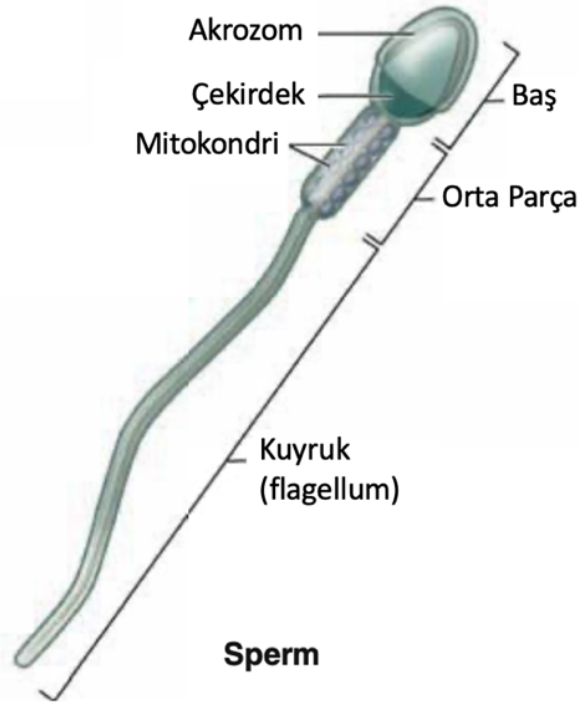
Olgun insan sperminin yapısı baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır.

Baş kısmı (3-5  $\mu\text{m}$ ) spermin en büyük bölümüdür ve büyük çoğunluğu paternal DNA'dan oluşan yoğun bir nükleus içerir. Nükleusun ön yüzü ise akrozom ile çevrilidir. Akrozom nükleusun 2/3'ünü kaplar. Akrozom; hyaluronidaz ve akrozin başta olmak üzere proteaz, asit fosfataz gibi çeşitli hidrolitik enzimleri içerir. Bu enzimler salındığında oositi çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellucidayı eriterek döllenme sürecinde büyük rol oynar (Junqueira Temel Histoloji, 2019; Sadler, 2020).

Baş ve kuyruğun bağlantısını sağlayan boyun kısmı sentriyollerden oluşan yoğun bir fibröz dokudur. Bu orta parça 7 µm uzunluğundadır. Mitokondrilerin bulunduğu bölgedir ve hareketlilik için enerji sağlar. Mitokondri tarafından üretilen ATP enerjisi sperm hareketi için gereklidir.

Kuyruk kısmı spermin hareketini sağlar. Orta kısımdan daha ince, yaklaşık 45 µm uzunluğunda, 0,5 µm çapında dıştan içe plazma membranı, fibröz kılıf, dış fibriller ve aksonemden oluşur. Aksonem kuyruk hareketindeki temel yapıdır (Junqueira Temel Histoloji, 2019; Sadler, 2020).

Olgun bir spermin yapısı Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2:** Spermin yapısı (Junqueira’s Temel Histoloji)

## 2.4. Semen Analizi

Semen analizi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde büyük önem taşır. Bu analizde spermatozoa sayısı testislerdeki sperm üretiminin yanı sıra kanal sisteminin açıklığını, epididim ve duktus (vas) deferensteki düz kas kasılmalarının spermatozoayı aktif olarak üretraya taşıma etkinliğini ve spermatozoayı dışarı atmak için ereksiyon ve ejakulasyon etkinliğini de yansıtır. Yardımcı bezlerin (seminal veziküller, prostat bezi, bulboüretal bezler) salgıladığı sıvının volümü ise bezlerin salgı aktivitesini ve her bir bezi etkinleştiren düz kas kasılmalarını yansıtır (WHO, 2021).

Günümüzde semen parametrelerinin değerlendirilmesi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından oluşturulan insan sperminin incelenmesi ve işlenmesine yönelik laboratuvar kılavuzunda tanımlanan standartlara dayanarak yapılmaktadır. Tablo 2.1’de WHO 2021 semen parametreleri gösterilmiştir.

**Tablo 2.1: Semen parametreleri en düşük referans aralığı**

Parametre	En düşük referans aralığı
Volüm (ml)	1.4 (1.3-1.5)
Sperm Konsantrasyonu ( $10^6/ml$ )	39 (35-40)
Total Motilite (%)	42 (40-43)
İleri Hareketli (%)	30 (29-31)
Yerinde Hareketli (%)	1 (1-1)
Hareketsiz (immotil) (%)	20 (19-20)
Vitalite (%)	54 (50-56)
Normal Morfoloji (%)	4 (3.9-4)

### 2.4.1. Semen makroskopik değerlendirilmesi

Semenin makroskopik olarak değerlendirilmesi, erkek üreme sağlığının değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. Bu değerlendirme sürecinde, semen örneğinin fiziksel özellikleri ve dış görünümü incelenir. Semen rengi, yoğunluğu, viskozitesi ve miktarı gibi faktörler değerlendirilerek, alınan örneğin sağlık durumu hakkında önemli bilgiler elde edilir.

**Volüm** : Semen volümü yardımcı bezlerin (seminal veziküller, prostat bezi, bulboüretal bezler) genel işlevselliğini yansıtır. Semen volümünün ölçülmesi, toplam spermatozoa sayısının hesaplanmasını belirlediği için önemli bir adımdır.

**Renk ve görünüm** : Likefiye olmuş bir ejakulat, makroskopik olarak homojen, gri-opelasan bir görünüme sahiptir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse daha az opak görülebilir. Uzun süreli yoksunluk sonrasında verilen örnekte renk hafif sarımsı, kırmızı kan hücreleri mevcut olduğunda kırmızı-kahverengi (hemospermi), sarılığı olan veya belirli vitamin ve ilaçları alan bir hastada daha açık sarı olabilir. Eğer ejakulat viskoz, tamamen berrak ve renksiz görünüyorsa, bu sadece erkeklerin uyarılma sırasında değişen miktarlarda ürettiği Bulboüretal bezlerden gelen ön boşalma olabilir. (Gökçe, 2011; Kadioğlu vd., 2011).

**Likefaksiyon (sıvılaşma süresi)** : Ejakulasyonun hemen sonrasında gözlemlenen ejakulat genellikle yarı katı, pıhtılaşmış, jel benzeri bir yapıdadır. Genellikle oda sıcaklığındaki ejakulat birkaç dakika içinde sıvılaşmaya (incelmeye) başlar ve daha homojen bir hale gelir. Yine de sudan daha yüksek bir viskoziteye sahiptir. 37°C'lik bir sıcaklık sıvılaşmasını kolaylaştıracaktır. Tamamen sıvılaşma normalde oda sıcaklığında 15-30 dakika içinde gerçekleşir. 30-60 dakika içinde tamamlanmazsa, bu durum not edilmelidir (Gökçe, 2011; Kadioğlu vd., 2011).

**Viskozite** : Likefaksiyondan sonra ejakulatın viskozitesi geniş çaplı, plastik, tek kullanımlık steril bir pipet ile semenin alınıp tekrar örnek kabına boşaltılması ile tahmin edilebilir. Normal likefiye olmuş bir ejakulat küçük ayrı damlalar halinde düşer. Viskozitenin anormal oluşu semenin pipete yavaş dolması ve bırakılırken damlanın oluşturduğu 2 cm'den daha uzun bir iplik görüntüsü ile anlaşılacaktır (Gökçe, 2011; Kadioğlu vd., 2011).

**pH** : Semen pH'sı, asidik prostat sekresyonu ile alkalik seminal veziküller sekresyonu arasındaki dengenin bir göstergesidir. pH'ın değerlendirilmesi için, bir pH kağıdı üzerine bir damla numune konulur ve elde edilen renk kalibrasyon şeridiyle karşılaştırılır.

Dünya Sağlık örgütünün kılavuzuna göre, alt eşik değeri pH 7,2 olarak belirlenmiştir (Gökçe, 2011; WHO, 2021). 7,2'nin altındaki bir pH değeri, alkali seminal veziküler sıvı eksikliğinin göstergesi ya da idrar kontaminasyonu kaynaklı olabilir. pH 7.2'nin üzerindeki durumlar ise genellikle numunenin kötü işlenmesi veya analizdeki gecikme ile ilişkilidir (WHO, 2021).

#### **2.4.2. Semen mikroskopik değerlendirilmesi**

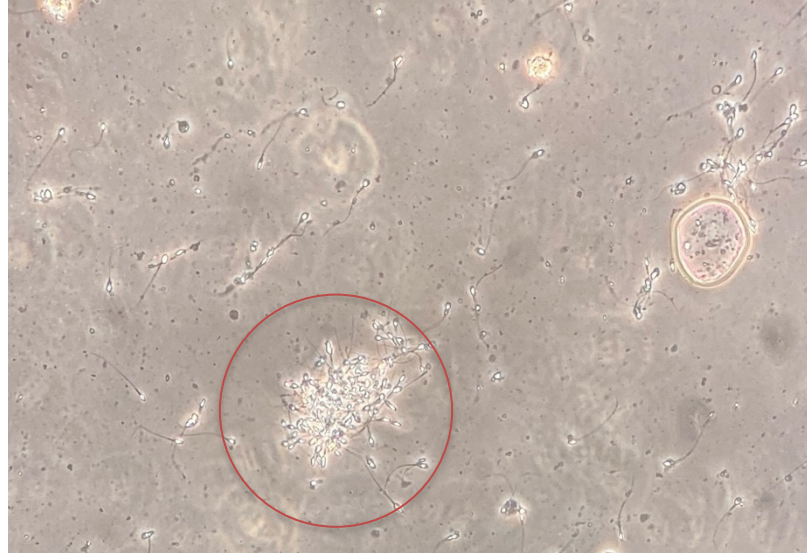
Makroskopik değerlendirme yalnızca genel bir değerlendirme sağlar ve spermin mikroskopik özelliklerini belirlemek için yeterli değildir. Mikroskopik analizler, spermlerin hareketliliği, morfolojisi ve DNA bütünlüğü gibi daha detaylı parametreleri değerlendirir ve infertilite teşhisinde daha spesifik bilgiler sunar.

Mikroskopik inceleme için iyi karıştırılmış numuneden alınan 10 µl sperm Makler sayma kamarasına damlatılır ve faz-kontrast mikroskobu ile değerlendirilmesi yapılır. Numunenin iyi karıştırılması aynı numunede yapılan incelemeler arasındaki farklılıkları ortadan kaldırmak ve doğru bir sonuç elde etmek için önemlidir. Yüksek hızda karıştırılması spermde hasara sebep olabilir. Bu sebeple geniş ağızlı plastik bir pipetle birkaç kez aspire edilerek karıştırılması yeterli olacaktır (Gökçe, 2011).

Yapılan değerlendirmede temel olarak sperm sayısı, sperm motilitesi ve morfolojisi incelenir. Aynı zamanda sperm aglütinasyonu ve spermatozoa dışında kalan (immatür germ hücreleri, epitel hücreleri, lökositler, eritrositler gibi) hücrelerin varlığı not edilir (WHO, 2021).

**Aglütinasyon:** Motil spermlerin baş-baş, kuyruk-kuyruk ya da karışık bir şekilde birbirlerine yapışmaları aglütinasyon olarak adlandırılır (Baskaran vd.,2020).

Agregasyon ise immotil spermlerin birbirine yapışması ile oluşan yapıya verilen addır. Aglütinasyon, agregasyondan ve motil spermlerin sperm dışı hücrelere yapışmasından ayırt edilmelidir (WHO, 2021). Şiddetli derecedeki aglütinasyon spermin motilite ve konsantrasyon değerlendirmesini etkileyebilir.



**Şekil 2.3:** Semen analizi sırasında çekilmiş, kırmızı çember içerisinde aglütinasyon görüntüsü (kendi çekimim)

**Sperm Motilitesi:** Ejakulatin likefaksiyonu 30 dakika içerisinde tamamlanırsa incelemelere başlanmalıdır. 30 dakika sonunda sıvılaşmanın tamamlanamaması durumunda numune 37 °C'lik inkübatör ya da ısıtıcı yüzey üzerinde 30 dakika daha bırakılmalı ve daha sonra çalışmaya başlanmalıdır.

Dünya sağlık örgütünün 2021 yılında yayımlanmış olduğu kılavuzda sperm motilitesini sınıflandırmak için dört kategorili bir sistem önerilir (WHO, 2021):

- a. Hızlı ileri hareketli (+4 motil, a) :** Sperm hücresi doğrusal olarak veya büyük dairesel düzlemde hızlı ve aktif olarak ileriye hareket eder.
- b. Yavaş ileri hareketli (+3 motil, b) :** Sperm aktif ama hızdan bağımsız bir şekilde doğrusal veya büyük dairesel düzlemde ileriye hareket eder.
- c. Yerinde hareketli (+2 motil, c) :** İlerlemenin olmadığı hareketlerin tamamını içerir. Etrafında daireler çizen sperm, kuyruk hareketiyle baş kısmı çok zor yer değiştiren sperm, sadece kuyruk hareketi olan sperm bu kategoride değerlendirilir.

**d. Hareketsiz (+1, immotil, d) :** Hiçbir hareketi olmayan spermeler bu kategoriye girer. Hareketsiz görülen her sperm ölü olarak kabul edilmez. İmmotil sperm ile ölü sperm birbirinden farklı kavramlardır (Kadıoğlu vd., 2011).

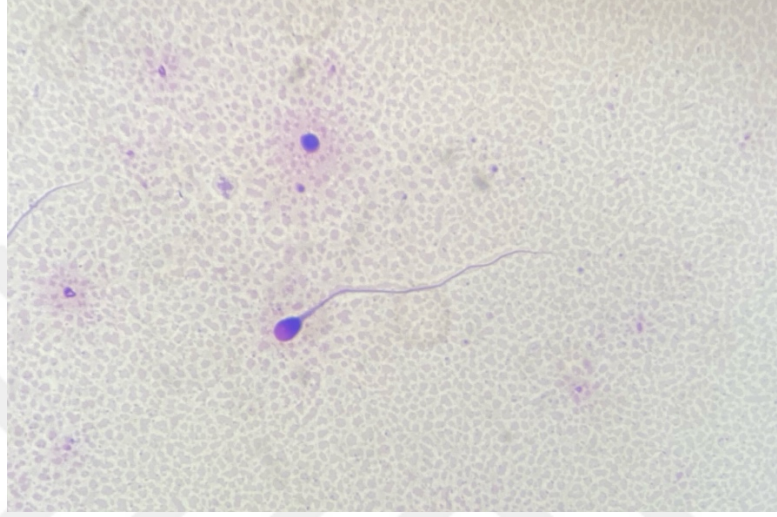
**Sperm Morfolojisi :** Sperm morfoloji değerlendirmesi aynı zamanda erkek üreme organlarının, özellikle de testislerin fonksiyonel durumuna ilişkin tanısal bilgilerdir. Bu değerlendirmede sadece normal spermatozoa oranının belirlenmesi yeterli değildir. Baş, boyun ve kuyruğun spesifik morfolojisini ve anormal sitoplazmik kalıntıların varlığını değerlendirmek önemlidir. Tüm insan ejakulatları geniş bir yelpazede farklı morfolojik görünümlere sahip spermatozoa içerir (WHO, 2021).

Bir sperm hücresinin normal kabul edilebilmesi için baş, boyun, kuyruk ve sitoplazmik kalıntının normal görünmesi gerekir (WHO, 2021).

Baş kısmı düzgün hatlı ve oval şekilli olmalıdır. Baş bölgesinin %40-70'ini kaplayan, net tanımlanabilen bir akrozomal bölge bulunmalıdır. Akrozomal bölge büyük vakuoller ve ikiden fazla küçük vakuol içermemelidir. Boyun ince, düzgün ve sperm başıyla hemen hemen aynı uzunlukta olmalıdır. Bu parça ile sperm kafasının ana eksenini aynı hizada bulunmalıdır.

Flagellum, uzunluğu boyunca aynı kalibreye sahip, boyun kısmından daha ince ve baş uzunluğunun ortalama 10 katı, yaklaşık 45 µm uzunluğunda olmalıdır. Keskin bir açıda kırılmış görünüme sahip olmaması koşuluyla, kendi üzerine doğru geri dönmüş olabilir. Sitoplazmik damlacıklar, normal sperm başı boyutunun üçte birinden az olduğu sürece normaldir (WHO, 2021).

Gerekli hazırlıklar (semen yayma preparatı havada kurutma, fiksasyon ve boyama) yapıldıktan sonra normal ve anormal morfolojideki spermleri değerlendirebilmek için 100X immersiyon objektifi ile en az 200 sperm sayılır. Sayım hatalarını azaltmak için gerekirse ikinci kez sayım yapılır (Gökçe, 2011). Normal forma sahip sperm hücreleri için en düşük referans değeri %4'tür (WHO, 2021).



**Şekil 2.4:** Diff-Quick boyama yöntemi ile hazırlanmış, ışık mikroskopunda normal sperm morfoloji görüntüsü (kendi çekimim)

## 2.5. Semen Terminolojisi

Semen terminolojisi, üreme sağlığı ve infertilite alanında temel bir öneme sahiptir çünkü doğru ve kapsamlı bir semen analizi, erkek üreme sağlığının değerlendirilmesinde kritik bir adımdır. Bu nedenle, semen terminolojisinin ve terimlerinin doğru anlaşılması, infertilite teşhis ve tedavilerinde başarılı sonuçların elde edilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 2010 parametrelerine göre sperm analizi terminolojilerinin tanımları:

- **Normospermi :** Normal sperm parametrelerine sahip olma durumu. Bu, sperm yoğunluğu, hareketliliği ve morfolojisi gibi faktörlerin normal aralıklarda olması anlamına gelir.

- **Oligoazospermi** : Sperm sayısının normalin altında olduğu bir durum. Oligoazospermi, sperm konsantrasyonunun 15 milyon sperm/ml'nin altında olduğu zaman tanımlanır.
- **Astenozoospermi** : Spermilerin normalden daha az hareketli olduğu bir durum. Sperm motilitesi, spermilerin ileri hareket etme yeteneği açısından değerlendirilir ve astenozoospermi durumunda bu hareketlilik düşüktür.
- **Teratospermi** : Spermilerin normal şekil ve yapıdan sapmalar gösterdiği bir durum. Bu durumda, spermilerin morfolojik olarak anormal olmaları söz konusudur.
- **Oligoasthenoteratospermi** : Sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisi açısından anormalliklerin bir arada olduğu bir durum. Bu terim, oligoazospermi, astenozoospermi ve teratospermiyi bir araya getirir.
- **Azospermi** : Ejakulatta sperm bulunmadığı durum. Azospermi, sperm sayısının sıfır olduğu bir durumu ifade eder.
- **Aspermi** : Seminal sıvı yokluğu, ejakulat bulunmaması durumu.
- **Globozoospermi** : Spermilerin baş kısmının normalden farklı bir yapıda olması ve başta akrozom eksikliği ile karakterize olan bir durum.

## 2.6. Sperm Hazırlama Yöntemleri

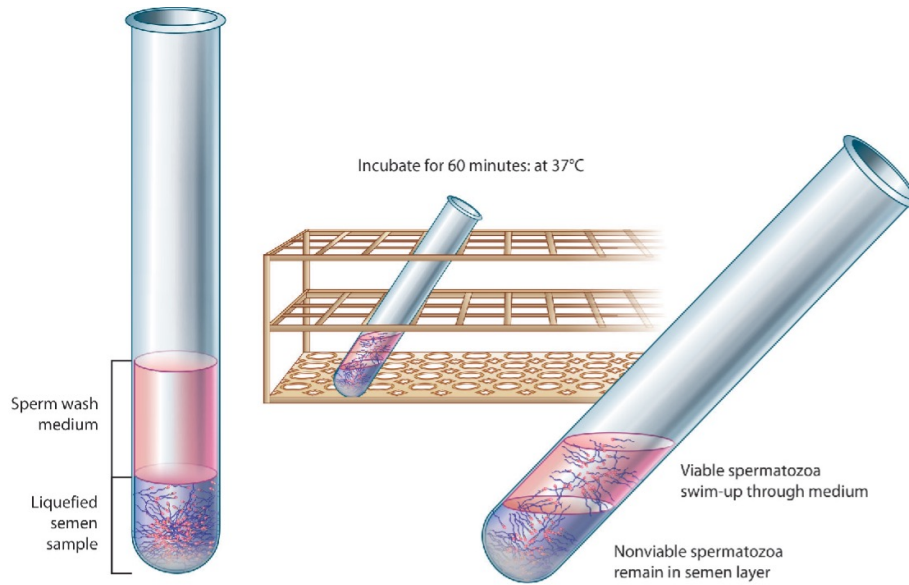
Yardımcı üreme teknolojileri (ART) için sperm hazırlama yöntemlerinde önemli olan iyi sperm kalitesinin sağlanması ve döllenmeye zarar veren faktörlerin ortadan kaldırılmasıdır. Seminal plazma içinde uzun süre beklemesi spermilerin fertilizasyonunu negatif yönde etkiler. Sperm in seminal plazmadan ayrılması ve yüksek oranda morfolojik olarak normal ve motil hücreler içeren, sperm DNA hasarı azaltılmış, ölü hücreler, lökositler, germ hücreleri ve çeşitli kalıntılardan arınmış bir preparat elde etmek üzere işlenmesi klinik uygulamalar için önemlidir. Sperm hazırlama tekniğinin seçimi, alınan semen numunesinin değerlerine ve amacına göre belirlenir. Geri kazanılan sperm uygun morfolojiye sahip olmalı ve değerlendirilen ART aralığı için fonksiyonel motiliteyi korumalıdır (WHO, 2021).

### 2.6.1. Swim-up (doğrudan yüzdürme) yöntemi

Swim-up (yüzdürme) yönteminde sperm, seminal plazmadan kültür ortamına yukarı doğru yüzebilme yeteneklerine göre seçilir. Prosedüre başlamadan önce alınan semen örneğinde seyreltme ya da santrifüleme yapılmamalıdır. Santifüleme işlemi sperm membranında oksidatif hasara neden olabilir (Aitken ve Clarkson, 1988).

Swim-up yönteminde;

1. Likefiye olmuş ve iyi karıştırılmış 1 ml semen üzerine 1,2 ml kültür medyumunu yavaşça bırakılıp 2 ayrı katman oluşturularak eklenir.
2. Kültür ortamının yüzey alanını artırmak için tüp yaklaşık 45°'lik bir eğimde 60 dakika inkübe edilir. Bu aşamada örnekte bulunan motil spermlerin kültür medyumuna yüzmesi beklenir.
3. Tüp yavaşça dik konuma getirilerek en üstteki besiyer alınır. Bu kısım motil spermler içerecektir.
4. Bu kısım 1,5-2,0 ml kültür medyumuyla seyreltilip santrifüjenir ve süpernatant atılır.
5. Sperm konsantrasyonu ve motilite değerlendirilir.

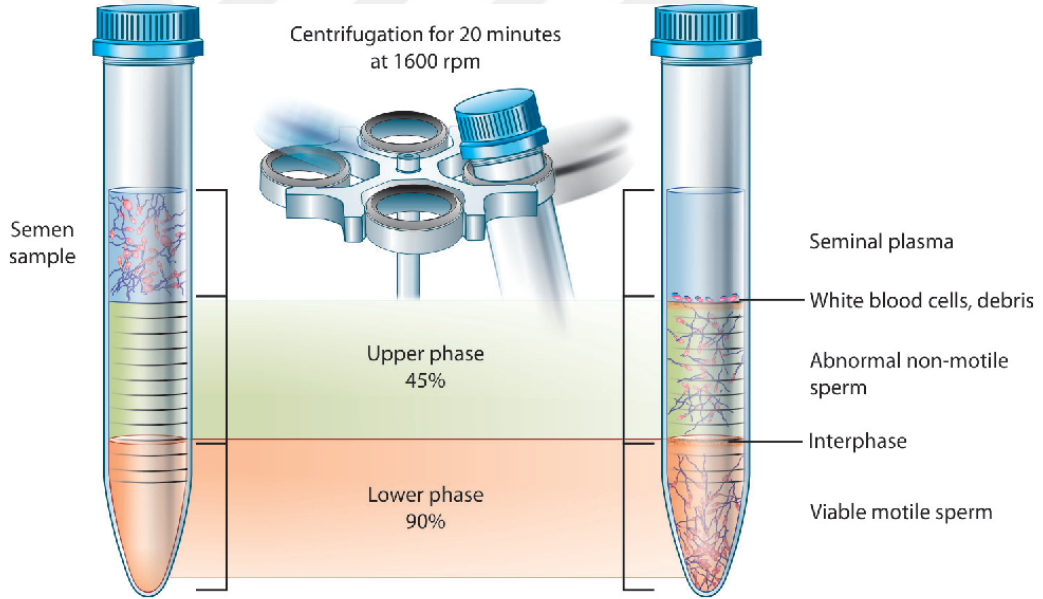


Şekil 2.5: Swim up yöntemi (Beydola vd., 2013)

Swim-up yöntemi yıkama yöntemine kıyasla daha düşük sperm verimi sağlar ancak yine de motiliteleri sebebiyle seçildiklerinden motil sperm yüzdesinin düşük olduğu durumlarda faydalıdır. Genellikle In vitro fertilizasyon (IVF) ve İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işlemleri için tercih edilmemektedir (WHO, 2021).

### 2.6.2. Dansite gradient yöntemi

Dansite gradient yöntemi, ART için yüksek kaliteli sperm toplamak amacıyla etkili bir yöntem olarak kullanılır. Çeşitli kalıntılardan, lökositlerden, germ hücreleri gibi diğer hücrelerden arınmış, iyi hareketli bir sperm seçimi sağlayabilir. Swim-up yöntemine kıyasla standardize edilmesi daha kolaydır, bu sebeple sonuçlar daha tutarlıdır. IVF ve ICSI'de kullanılmak üzere spermi hazırlamak için merkezlerde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.



**Şekil 2.6:** Çift fazlı gradient yöntemi (Beydola vd., 2013)

Bu yöntem, hücreleri yalnızca yoğunluklarına göre ayıran gradient medyumunu üzerinde semenin santrifüjlenmesini kullanır. Bu uygulamalarda genellikle çift fazlı gradient konsantrasyonu (%90 ve %45) daha yaygın olarak tercih edilir.

## 2.7. DNA Fragmantasyon

Erkek infertilitesini etkileyen ana faktörlerden biri spermin genetik materyalinin zarar görmesi veya parçalanmasıdır (Zequiraj vd., 2018). Sperm DNA hasarı, DNA'nın normal yapısındaki herhangi bir kimyasal değişiklik olarak tanımlanabilir. Bu değişiklikler arasında sperm DNA fragmantasyonu (sDF), tek ya da çift sarmal kırılması şeklinde genetik materyalini etkileyen en yaygın problemlerden biridir (WHO, 2021). Bu durum, erkek üreme sağlığının önemli bir göstergesi olarak kabul edilir çünkü sperm DNA'sındaki hasarlar, fertilizasyon sürecini ve embriyo gelişimini olumsuz etkileyebilir (Lewis ve Simon, 2010).

Sperm DNA fragmantasyonu, spermin üretim sürecinde ya da taşınması sırasında ortaya çıkabilir. Spermiyogenez sırasında DNA onarım mekanizmalarındaki bozukluklar, yaşam tarzı veya çeşitli çevresel durumlarla ilişkili olabilecek hücrenin apoptozu, oksidatif stres süreçleri, üretilen spermin seminifer tübüller ve epididim yoluyla taşınması sırasında oluşabilecek sorunlar ve radyoterapi, kemoterapi gibi tedaviler de dahil olmak üzere birçok farklı süreç tarafından tetiklenebilir (Sakkas, 2010; Muratori vd., 2015).

Genetik yatkınlık, endokrin faktörler, konjenital, intrauterin (örneğin annenin sigara kullanması) ve demografik faktörler (yaşlanma, sigara maruziyeti ve aşırı alkol kullanımı gibi) sperm kalitesinin azalmasında önemli risk faktörleri olarak bilinse de yapılan araştırmalar beslenmenin de bu konuda önemli bir rol oynayabileceğine dair kanıtları artırmaktadır (Attaman vd., 2012; Robinson vd., 2012; Jurewicz vd., 2018).

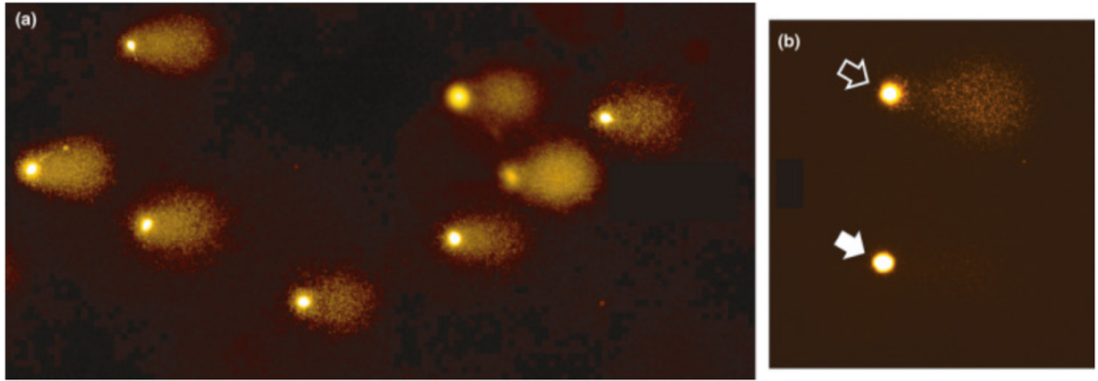
Beslenmenin erkek üreme potansiyeli üzerinde yapılan çalışmalar spesifik beslenme faktörlerinin (doymuş yağlar, omega-3 yağları, soya, sığır eti tüketimi, folat, çinko ve antioksidanlar) semen kalitesini (sperm konsantrasyonu, morfolojisi, motilitesi ve sperm anöploidisi) etkileyebileceği hipotezini destekler niteliktedir (Mendiola vd., 2010; Chavarro vd., 2011).

Sağlık bilincine sahip olarak nitelendirilebilir dengeli bir beslenme düzeni (yüksek sebze, meyve, balık ve tam tahıl alımı) ile yaşamını sürdüren erkeklerde sperm DNA hasarı (sDF) daha düşük olur (Vujkovic vd., 2009; Jurewicz vd., 2018).

Sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan çeşitli laboratuvar yöntemleri bulunmaktadır. En yaygın yöntemler arasında Comet testi, Terminal Transferaz Tailing Assay (TUNEL), Sperm Chromatin Dispersion (SCD) testi, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), Acridine Orange (AO) boyama gibi teknikler bulunur. Bu yöntemler, sperm DNA'sındaki hasarı değerlendirmek için kullanılır ve çeşitli avantaj ve dezavantajlar sunar (Zini ve Sigman, 2009; Boitrelle vd., 2021).

### 2.7.1. Comet testi (Single cell gel electrophoresis):

Comet testi, DNA hasarını değerlendirmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Sperm DNA'sındaki hasarlar jel elektroforezi ile görselleştirilir.



**Şekil 2.7:** Comet testi floresan mikroskobu görüntüsü

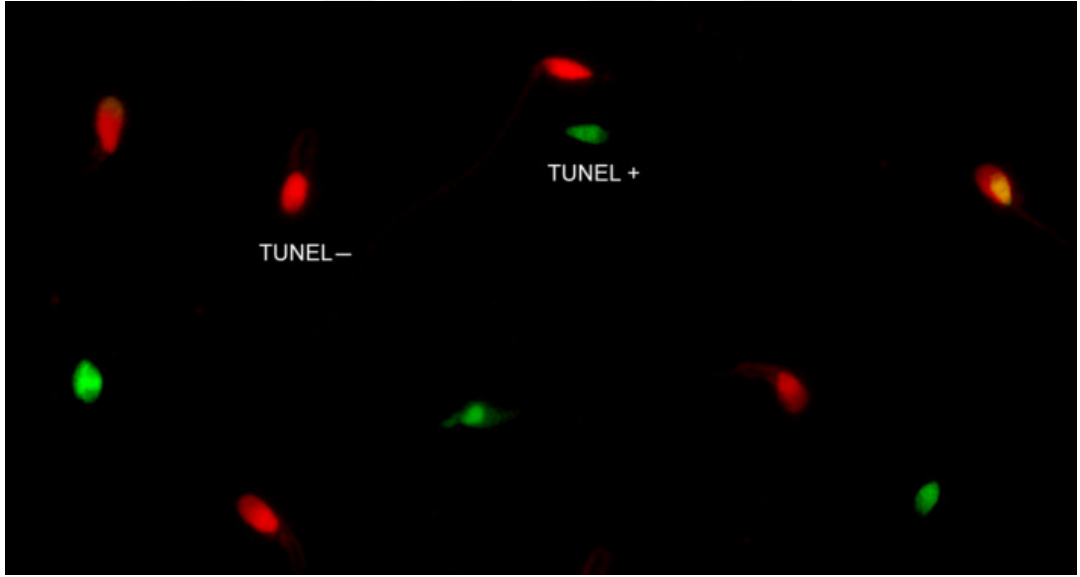
(a) DNA fragmentasyonu yüksek olan bir sperm örneği. Kuyruk görünümü ne kadar uzun ve parlak olursa, o kadar fazla parçalanma anlamına gelir. (b) DNA fragmentasyonu olan bir sperm (açık ok) ve minimum fragmentasyona sahip, neredeyse hiç kuyruk görülmeyen (beyaz ok) bir başka örnek (Esteves vd., 2021)

Bu yöntemde, spermiler agaroz jeline gömülür ve elektrik alanında hareket ettirilir. Hasarlı DNA parçaları floresan veya kontrast boya kullanılarak boyanır ve mikroskop altında incelenir. Hasarlı olan DNA parçaları daha uzun kuyruklar oluştururken, sağlam DNA parçaları daha kısa kuyruklar oluşturur (Şekil 2.7). Comet yöntemi sonuçları, hasarlı ve sağlam DNA parçalarının oranını belirlemek için kullanılır.

### 2.7.2. Terminal transferaz tailing assay (TUNEL):

Terminal transferaz tailing assay (TUNEL), apoptotik hücrelerdeki DNA parçalanmasını belirlemek için kullanılan bir laboratuvar yöntemidir. Bu yöntem, hücre DNA'sının uç kısımlarının (terminal uçlarının) belirlenmesi esasına dayanır, direkt olarak DNA kırıklarını ölçmektedir (Koyuncu, 2011).

Floresan mikroskobu ile incelenen TUNEL testi örnek görseli Şekil 2.8'de verilmiştir.



**Şekil 2.8:** TUNEL Testi (Floresan mikroskobu)

Propidium iyodür ile boyanmış slaytlarda yeşil renk TUNEL (+), DNA hasarı gösteren spermatozoayı; kırmızı renk TUNEL (-), DNA kırılmaları içermeyen spermatozoayı temsil eder (Esteves vd., 2021).

Programlanmış hücre ölümü yani apoptoz sürecindeki hücrelerde DNA parçalanması meydana gelir. Sperm örnekleri, döllenmeden sonra DNA parçalanmasını simüle eden özel bir reaksiyonla işlenir. Bu işlem sonucunda hasarlı DNA uçları floresan bir sinyalle işaretlenir.

Apoptotik hücrelerdeki işaretlenen parçalanmış DNA uçları, floresan mikroskop altında belirgin bir şekilde gözlemlenir (Sharma vd., 2013). Kırılma bölgeleri floresan mikroskobu ile olduğu gibi akış sitometrisi yardımıyla da tanımlanabilir (Esteves vd., 2021).

TUNEL yöntemi, apoptotik hücrelerin sayısını ve apoptozun yoğunluğunu belirlemek için kullanılır. Bu yöntem, hücre ölümü mekanizmaları üzerindeki araştırmalarda, tıbbi teşhislerde ve ilaç geliştirme süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

### **2.7.3. Sperm chromatin dispersion (SCD) Testi:**

Sperm chromatin dispersion (SCD) Testi, spermin DNA bütünlüğünü ve kromatin yapısını değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu test, spermin doğal kromatin organizasyonu bozulmuşsa, DNA'nın çevresinde bir halo görüntüsü oluşması temeline dayanır.

Sperm örnekleri, asit ve tuz çözeltileri kullanılarak işlenir, bu prosedür DNA'nın çevresindeki kromatin yapısının açılmasını sağlar. DNA'nın çevresinde oluşan halo, özel bir boyama işlemi ile belirgin hale getirilir. Boyanmış spermler, floresan mikroskop altında incelenir. Normal DNA yapısına sahip olan spermler, büyük çaplı bir halo oluştururken, hasarlı DNA yapısına sahip spermler çevrelerinde ya çok küçük bir halo oluştururlar ya da hiçbir halo oluşumu görünmez (Liffner vd., 2019). Normal ve hasarlı DNA yapısına sahip spermlerin SCD testi görüntüsü Şekil 2.9'da verilmiştir (Koyuncu, 2011). SCD Testi sonuçları, spermin DNA bütünlüğünü ve kromatin yapısını objektif bir şekilde değerlendirmeye yardımcı olur.

Bu yöntem, üreme sağlığı değerlendirmeleri, fertilizasyon başarısını öngörme ve infertilite nedenlerini anlama konularında önemli bir araçtır.



**Şekil 2.9:** SCD Testi.

Sağ üst köşede fragmente DNA'ya sahip sperm ve normal yapıdaki spermilerin oluşturduğu halo görünümü (Koyuncu, 2011)

#### **2.7.4. Sperm chromatin structure assay (SCSA):**

Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), sperm kromatin yapısı ve DNA bütünlüğünü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Alınan örnekte sperm DNA'sının çift zinciri arasındaki bağlar, asit çözeltileri veya yüksek sıcaklık gibi yöntemler kullanılarak ayrılır (Qiu vd., 2020). Denatüre edilmiş olan DNA, fiksasyon işleminden geçirilir ve floresan işaretli DNA bağlayıcı bir boya ile işlenir. Boyanmış DNA, floresan mikroskopu altında incelenir. Sağlam DNA yapısına sahip spermeler daha az floresan işareti gösterirken, hasarlı DNA yapısına sahip spermeler daha fazla floresan işareti gösterir (Hamilton ve Assumpção, 2019). Elde edilen görüntüler, özel yazılım ve analiz yöntemleriyle değerlendirilir ve hasarlı DNA yapısına sahip olan spermelerin yüzdesi ve floresan yoğunluğu gibi parametreler belirlenir. SCSA Testi sonuçları, sperm DNA bütünlüğünü ve kromatin yapısını objektif bir şekilde değerlendirmeye yardımcı olur.

### **2.7.5. Acridine Orange (Akridin Oranj, AO) tekniği:**

Akridin Oranj tekniği (AOT), sperm DNA'sının bütünlüğünü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir diğer floresan boya yöntemidir. Bu yöntemin temel prensibinde, sağlam ve hasarlı DNA parçaları farklı şekilde floresan renk verir, bu da hasarlı DNA miktarının belirlenmesine olanak tanır. AO, normal sperm başlarını yeşil floresan ile boyar. Denatüre olmuş ve fragmentasyon gösteren DNA taşıyan spermelere bağlandığında ise kırmızı/turuncu floresan renk verir (Evenson vd., 1999; Koyuncu, 2011). Yeşil ve kırmızı floresanın miktarı ve dağılımı, hasarlı DNA miktarının belirlenmesinde kullanılır. Elde edilen floresan verileri, çeşitli analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilir. Bu analizler sonucunda, sperm örneğindeki DNA fragmentasyonu oranları belirlenir (Cebesoy vd., 2006; Khalili vd., 2006).

Akridin Oranj boyama yöntemi, sağlam ve hasarlı DNA parçalarını ayırt etmek için kullanılan etkili bir araçtır. AO analizi, SCSA yöntemine benzer prensiplere dayanmasına rağmen, SCSA'ya göre daha hızlı, basit ve düşük maliyetlidir. Bununla birlikte, hızla solan renkler ve boyanın çıplak gözle yorumlanmasının zorluğu, bu testin dezavantajları arasındadır (Chohan vd., 2006).

### **2.8. Hipertansiyon**

Hipertansiyon, uygun koşullar altında yapılan en az iki kan basıncı ölçümünde değerlerin 140/90 mm Hg veya daha yüksek olduğu durumlarda ortaya çıkan bir hastalıktır. İdeal kan basıncı değerleri ise 120/80 mmHg'dir. Ancak hipertansiyon tanısı, belirli bir süre boyunca farklı zamanlarda yapılan birden fazla kan basıncı ölçümüne dayanmalıdır (Kılıç ve Üstü, 2012).

Kan basıncının normal değerlerin üzerinde olması, kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları için temel risk faktörüdür ve dünya genelinde ölüm ve sakatlığın başlıca nedenlerinden biridir. Global Hastalık Yüğü Araştırması'nın (Global Burden of Disease, GBD) sonuçlarına göre, 2013 ve 2015 yıllarında hipertansiyon, dünya genelinde en önemli metabolik risk faktörü olarak belirlenmiştir (Arıkan vd., 2020).

Genel toplumda hipertansiyon prevalansı %30-45 arasında değişmektedir (Mancia vd., 2013). Hipertansiyonun yaygınlığının artması; nüfus artışı, ileri yaş, sağlıksız beslenme (yüksek tuz tüketimi, düşük potasyum, kalsiyum ve magnezyum alımı gibi), aşırı alkol tüketimi ve tütün kullanımı, yetersiz fiziksel aktivite, obezite ve sürekli stres gibi davranışsal risk faktörlerine bağlıdır. Ayrıca genetik faktör etkisi göz ardı edilmemelidir. Ailesinde hipertansiyon öyküsü olan bireylerde risk daha yüksektir (Arıkan vd., 2020).

Antihipertansif tedaviye başlanması, kan basıncı seviyelerine ve toplam kardiyovasküler risk durumuna bağlıdır. Hipertansiyon tanısı alan hastalarda yaşam şekli tedavisi olarak da adlandırılan non-farmakolojik tedavi oldukça önemlidir. Bu kapsamda kan basıncını kontrol altında tutabilmek amacıyla kan basıncı artışını tetikleyen bütün bu faktörler üzerinden yaşam şekli açısından hastanın bilgilendirilmesi ve bu bilgilendirmeye uyumunun artırılması gerekir. Kilo kontrolü, düzenli egzersiz yapma, alkol tüketiminin sınırlandırılması, sigarayı bırakma, tuz alımının kısıtlanması ve meyve-sebze ile düşük yağlı süt ürünlerinin tüketilmesi gibi yaşam tarzı değişiklikleri, tüm hipertansif hastalara ve yüksek normal kan basıncı olan bireylere önerilir.

İlaç tedavisi ise risk altındaki hastalara hemen başlanmalıdır (Kılıç ve Üstü, 2012). Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar, kan basıncını düşürmek ve komplikasyon riskini azaltmak amacıyla çeşitli mekanizmalarla etki eder.

Başlıca antihipertansif ilaç grupları arasında Diüretikler, Beta-blokerler (BB), ACE inhibitörleri, Anjiyotensin II reseptör blokerleri (ARB'ler), Kalsiyum Kanal Blokerleri (KKB'ler), Alfa Blokerler ve Renin inhibitörleri bulunmaktadır (Mensah ve Bakris, 2010; Kılıç ve Üstü, 2012; Slivnick ve Lampert, 2019; Baldota vd., 2022).

- **Diüretikler:** Vücuttaki fazla sıvıyı atarak kan hacmini ve basıncını düşürürler.
- **Beta-blokerler:** Kalp atış hızını ve kalp kasının kasılma gücünü azaltarak kan basıncını düşürürler.
- **ACE inhibitörleri:** Anjiyotensin dönüştürücü enzimi bloke ederek damarların daralmasını engellerler.
- **ARB grubu:** Anjiyotensin II'nin etkilerini engelleyerek damarların daralmasını önlerler.
- **Kalsiyum kanal blokerleri:** Kalsiyumun kalp ve damar kaslarına girişini engelleyerek damarları genişletirler.
- **Alfa blokerler:** Damarların etrafındaki kasları gevşeterek kan basıncını düşürürler.
- **Renin inhibitörleri:** Renin adı verilen bir enzimi bloke ederek kan basıncını kontrol ederler.

Bazı hastalarda monoterapi işe yaramakla birlikte bazı hastalarda kombinasyon terapisi gerekebilir. Bununla birlikte kullanılan ilaçların verdiği faydanın yanı sıra yan etkileri de mevcuttur. Bazı antihipertansif ilaçların, kan basıncını düşürme özelliklerinden bağımsız olarak erektil fonksiyonu olumsuz etkileyebileceğine dair kanıtlar mevcuttur (Oliveira ve Nunes, 2021).

Erektil disfonksiyon (ED), cinsel ilişki için uygun sert bir penis ereksiyonunun sağlanamaması veya sürdürülememesi olarak tanımlanır (Hernández-Cerda vd., 2020; Leslie vd., 2024). Aslında erektil disfonksiyon, yetişkin erkeklerde yaygındır ve sıklıkla hipertansiyonla birlikte görülebilen bir rahatsızlıktır. ED'li erkeklerin %40'ından fazlasında hipertansiyon teşhis edilmiştir, bu da ED'nin hipertansiyonun erken bir işareti olabileceğini düşündürmektedir (Zhao vd., 2023).

Bu durum hem hipertansiyon hastaların hem de cinsel partnerlerinin hayat kalitesini önemli ölçüde olumsuz etkiler. Hipertansif bireylerde ED prevalansı, normotansif bireylere göre yaklaşık iki kat daha fazladır (Nilsson ve Viigimaa, 2020).

Yapılan çalışmalarda diüretiklerin, kombine antihipertansif tedavide kullanıldığında bile ED'yi bozduğuna inanılmaktadır (Doumas ve Viigimaa, 2013). Kalsiyum kanal blokerleri ve ACE inhibitörleri ile ilgili veriler henüz kesin olmasa da, ED üzerinde nötr bir etki bildirilmiştir (Grimm vd., 1997; Nilsson ve Viigimaa, 2020). Hipertansiyon ilaç tedavisinin erektil disfonksiyona sebep olup olmadığına dair birçok bilimsel çalışma bulunurken bu ilaçların sperm kalitesi ile ilişkili semen parametrelerini ne yönde etkilediğine dair yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Kalsiyum kanal blokerleri, kalsiyumun kalp ve damar duvarı kas hücrelerine girişini engelleyerek etki ederler. Sonuç olarak, damarlar genişler ve kan basıncı düşer. KKB ilaçlar kimyasal yapılarına göre iki ana gruba ayrılır:

- **Dihidropiridinler:** Ağırlıklı olarak damar genişletici etkiye sahiptirler. Amlodipin ve Nifedipin dihidropiridin grubuna aittir.
- **Non-dihidropiridinler:** Hem damar genişletici hem de kalp hızını düşürücü etkileri vardır. Verapamil ve Diltiazem bu gruptadır.

Bu moleküllerin ED'ye yol açma potansiyellerinin farklı olduğunu gösteren veriler bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda Verapamil ile ilişkili fertilizasyonda negatif etkilere yol açan sperm sayısında azalma ve morfolojik değişimler hayvan deneyleri ile gösterilmiştir.

Farklı antihipertansif ilaçları kullanan bireyler arasında yapılan bir çalışmada çeşitli farklılıklar gözlenmiştir. Yüksek hipertansiyon prevalansı göz önüne alınarak, hipertansiyon ile tedavi arasındaki ilişkiyi semen kalitesi üzerinde inceleyen bu çalışmaya göre, Beta-bloker kullanan erkeklerin, ilaç almayan erkeklere kıyasla hacim, konsantrasyon ve motilitede azalma olduğu kaydedilmiştir. ACE inhibitörü kullanan erkeklerde nispeten artan hacim ve azalmış sperm konsantrasyonu, ACEI kullanan erkeklerde ise hacim nispeten azalmış ve motilitesi azalmıştır.

Diüretik kullanan erkeklerin hacmi nispeten azalmış. Son olarak, kalsiyum kanal blokerleri kullanan erkeklerde ise sperm konsantrasyonunda nispeten bir azalma gözlenmiştir (Guo vd., 2015).

## **2.9.Verapamil**

Verapamil, kalsiyum kanal blokeri grubunda olan bir ilaçtır ve genellikle hipertansiyon, angina, ve bazı aritmi türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılır (Fahie ve Cassagnol, 2023; Yazan ve Özer, 1993). Bununla birlikte, Verapamil'in erkek üreme sağlığı üzerindeki etkileri, özellikle sperm parametreleri ve erkek infertilitesi ile ilgili olarak araştırmalara konu olmuştur.

Verapamil dihidropiridin olmayan bir kalsiyum kanal blokeridir. Bu türdeki KKB'ler, depolarizasyon sırasında miyokard ve vasküler düz kaslardaki yavaş L tipi kalsiyum kanallarına kalsiyum iyonlarının girmesini engeller. Bu inhibasyon, koroner damar düz kaslarının gevşemesine ve koroner vazodilatasyona yol açarak hipertansiyonlu hastalarda faydalı etkiler sağlar. Aynı zamanda, verapamil miyokardiyal oksijen dağılımını artırarak vazospastik anjina hastalarına yardımcı olur. Verapamil, negatif kronotropik etkiler ve sempatik sinir sistemi aktivitesinin azalması ile ilişkilidir (Fahie ve Cassagnol, 2023). Kalsiyum kanalları sperm hücrelerinde de bulunur ve bu kanalların blokajı semen parametreleri ve sperm fonksiyonlarını etkileyebilir.

2017 yılında gerçekleştirilen ve KKB'lerin erkek infertilitesi üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmaya göre, hipertansiyon düşük semen hacmi, sperm hareketliliği, toplam sperm sayısı ve toplam hareketli sperm sayısı ile ilişkilidir. Ancak tedavide verapamil gibi kalsiyum kanal blokerleri, semen hacmini artırıyor gibi görünse de sperm konsantrasyonu üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Verapamilin doza bağlı olarak prolaktin seviyesini yükseltebileceği ve testosteron seviyesini düşürebileceği belirtilmektedir, bu da az sayıda hastada fertilité üzerinde olumsuz bir etki yaratabilir (Guo vd., 2017).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışmanın Tasarımı**

Farklı yaş gruplarında semen üzerinde in vitro Verapamil uygulamasının sperm parametreleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla, öncelikle çalışmaya dâhil edilen tüm hastalara Dünya Sağlık Örgütü 2021 kriterlerine göre standart semen analizi yapılmış sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi değerlendirilmiştir.

#### **3.2. Çalışmaya Dahil Etme ve Dışlama Kriterleri**

Araştırmaya dahil edilme kriteri olarak örneklerde yıkama öncesi sperm sayısının 16 milyon/ml fazla olması, normal morfolojinin en az %4 olması, ileri hareketli (+3 motil ve +4 motil) sperm yüzdesinin %30 dan fazla olması ve kişilerin 18-60 yaş aralığında bulunması belirlenmiştir. Araştırmanın dışlama kriterleri ise; düzenli ilaç kullanımı, testis ile ilgili ameliyat öyküsü (varikosel vb.), yüksek dozda alkol ve sigara kullanımı ve hastanın kimyasal madde maruziyeti (kemoterapi, radyoterapi vb.) ve 18 yaş altı ile 60 yaş üstü olunmasıdır.

#### **3.3. Çalışmada Kullanılacak Yöntemler**

##### **3.3.1. Örnek toplanması**

Eylül 2023 - Mayıs 2024 yılları arasında Medical Park Bahçelievler Tüp Bebek Merkezine Spermiyogram testi için başvuran, yaşları 18-60 arasında olan normozoospermi özelliği gösteren 26 erkek olgunun atık semen örnekleri kullanıldı.

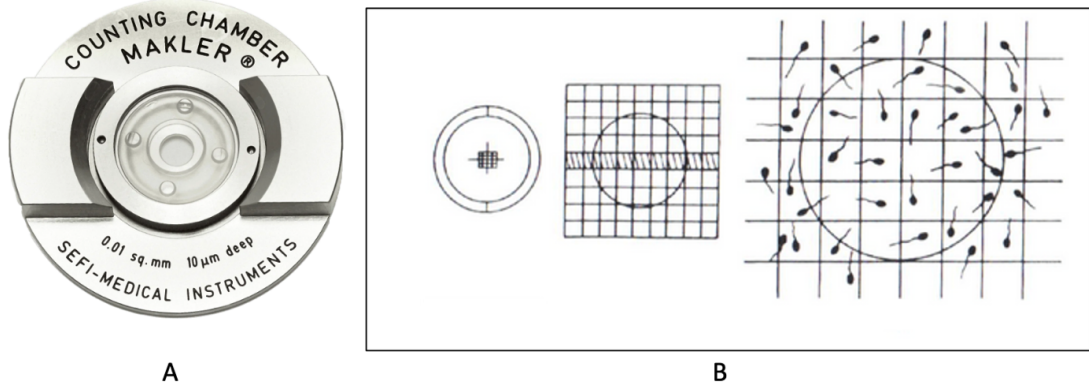
Semen örnekleri abstinans süresi 2-6 gün arasında olan hastalardan mastürbasyon yoluyla elde edilmesi istendi. Ejakülat steril, geniş ağızlı, sperm için toksik olmayan plastik bir kap içinde toplanırken; kişinin adı soyadı, doğum tarihi, cinsel perhiz süresi ve örneğinalındığı tarih kabın üzerine not edildi.

Örnek verilmeden önce kişilere konuyla ilgili olarak ayrıntılı sözlü bilgi verildi, semenin tamamının toplanması gerektiği ve herhangi bir kayıp, idrar ya da başka yabancı bir madde ile kontaminasyon problemi varsa bildirmesi gerektiği anlatıldı.

### 3.3.2. Semen analizi

Toplanan örnekler likefiye olması için 20-30 dakika 37°C’de hot plate üzerinde bekletildi. Likefaksiyon sonrası Dünya Sağlık Örgütü'nün 2021 semen parametrelerine göre spermiyogram testi için incelendi. Çalışmaya uygun hale gelen, iyi karıştırılmış semen numunesinden 10 µl alınarak, 0,01 mm derinliği olan Makler sayım kamarasının (Sefi - Medical Instruments) orta kısmına damlatılarak üzeri kamaranın grid camı ile kapatıldı (Şekil 3.1.A). Işık mikroskobu ile 20x objektif büyütme altında değerlendirildi.

Gridin üzerinden spermatozoalar 1 satır veya 1 sütun 10’arlı kare şeklinde sayılarak konsantrasyonu milyon/ml olarak tespit edildi (Şekil 3.1.B).



**Şekil 3.1: (A)Makler sayma kamarası (B)Makler kamarası mikroskop görünümü (URL-2)**

Eş zamanda motilite değerlendirilmesi için hücreler sayıldı; ileri hareketli +4, yavaş ileri hareketli +3, olduğu yerde baş veya kuyruk hareketi gösteren spermiler yerinde hareketli +2, hiç hareket göstermeyenler ise immotil olarak değerlendirilerek skorlandı. Sayma işleminin doğruluğunu artırmak için aynı işlem 3 defa tekrarlandı ve ortalama değer alındı.

Morfolojik değerlendirme için bir lama damlatılan semen örneği ikinci bir lam aracılığıyla bu slayt üzerinde yayılıp hava ile kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar Diff-Quick boyama yöntemi ile boyandı ve tekrar kuruması için beklendi. Morfoloji incelemesi için immersiyon yağı yardımıyla 100x büyütmede bakıldı. Morfoloji değerlendirmesi yapılırken 200 spermatozoon dikkate alındı. Her bir anomali ayrı ayrı not edildi ve normal morfolojideki sperm sayısı belirlendi.

Taze semen örneklerinin sayımını takiben semen örneği, gradient santrifügasyon yöntemi ile çalışıldı. Sperm yıkama işleminden sonra örneklere Verapamil uygulaması gerçekleştirildi. Gerekli konsantrasyon hesaplamaları yapıldıktan sonra hazırlanan Verapamil çözeltisi ile 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.

### **3.3.3. Gradient yöntemi**

Gradient solüsyonu olarak Sperm Grad (Vitrolife, İsveç) kullanıldı. Solüsyon öncelikle G-IVF Plus (Vitrolife, İsveç) kullanılarak % 45 ve % 90'lık iki farklı konsantrasyonda hazırlandı ve 37°C'de muhafaza edildi.

Yıkama işlemi için, üzerine örnek sahibinin bilgileri yazılmış falkon konik tüpün içerisine önceden hazırlanmış %90'lık gradient, üzerine solüsyonlar birbirlerine karışmayacak şekilde yavaşça %45'lik gradient solüsyonu ve sonrasında pipet yardımıyla yavaş yavaş semen örneği ilave edildi. 1500 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Üst kısım pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde alınıp atıldı. Altta kalan pelletin üzerine sperm yıkama solüsyonu G-IVF eklendi ve pipetleme yapıldı. Tekrar 1500 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant alınıp dipte kalan 0,5 ml sperm solüsyonun üzerine G-IVF eklenerek 1 ml'ye tamamlandı.

### 3.3.4. Verapamil uygulaması

Türkiye’de Verapamil etken maddesini içeren Türkiye Tıbbi Cihaz ve İlaç Kurumu tarafından onaylı ruhsatı bulunan toplam 16 ilaç bulunmaktadır. Verapamil uygulaması için ISOPTIN 5 mg/2ml IV infüzyonluk çözelti içeren ampul kullanıldı. Uygulamadan önce ve sonrası sperm motilite oranlarının karşılaştırılması için tekrar sperm sayımı yapıldı ve not edildi.

İki farklı tüpe bölünerek yıkaması yapılan örneklerden birine 0,4 µl dozda Verapamil, diğerine ise 0,8 µl dozda Verapamil eklendi ve 37°C’de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası motilite yüzdesi karşılaştırmaları için aynı adımlar izlendi.

Çalışmada oluşturulan gruplar Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1: Çalışma grupları**

<b>1.grup (18-60 yaş)</b>	<b>2.grup (18-60 yaş)</b>
0,4 µl Verapamil	0,8 µl Verapamil

## 4. BULGULAR

Yapılan tez araştırmasında 18-60 yaşları arasında seçilen 26 hastada, iki farklı dozda (0,4 µl ve 0,8 µl) Verapamil uygulamasından sonra sperm değerleri üzerinde etkisini araştırmak amacıyla parametreleri çalışmaya uygun örnekler seçilmiş, çift fazlı gradient yıkama işlemi ardından Verapamil uygulanmış ve semen analizleri yapılmıştır.



Çift fazlı (%45 ve %90) gradient yöntemi ile yıkaması yapılan örneklerin öncesi ve sonrası sperm değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1: Gradient yıkama öncesi ve sonrası semen parametreleri**

Örnek No	Gradient Öncesi						Gradient Sonrası				
	SS	M(%)	a (%)	b (%)	c (%)	d (%)	M(%)	a (%)	b (%)	c (%)	d (%)
1	91	64	5	45	14	36	95	31	55	9	5
2	29	48	4	33	11	52	89	23	59	7	11
3	24	40	4	31	5	60	90	22	61	7	10
4	26	56	3	45	8	44	88	28	52	8	12
5	16	46	4	30	12	54	96	19	71	6	4
6	67	64	7	51	6	36	93	25	63	5	7
7	18	62	6	47	9	38	86	18	58	10	14
8	51	57	5	41	11	43	93	36	50	7	7
9	45	65	8	46	11	55	94	24	59	11	6
10	52	63	6	44	13	37	95	37	45	13	5
11	65	60	3	43	14	40	97	23	65	9	3
12	42	42	2	30	10	58	89	16	74	10	11
13	16	55	3	42	10	45	90	17	61	12	10
14	92	59	10	37	12	41	96	22	70	4	4
15	36	43	2	28	8	62	95	20	66	9	5
16	117	47	4	33	10	53	95	39	48	8	5
17	17	41	3	29	9	59	94	33	47	14	6
18	19	56	5	39	12	44	96	34	54	8	4
19	118	59	7	42	10	41	85	14	61	10	15
20	83	58	4	43	11	42	91	14	61	16	9
21	82	54	14	32	8	46	96	34	56	6	4
22	61	63	10	46	7	37	97	29	62	6	3
23	43	52	6	36	10	48	96	23	67	6	4
24	104	49	5	33	11	51	95	25	63	7	5
25	20	45	9	28	8	55	94	27	63	4	6
26	37	58	12	41	5	42	95	31	59	5	5

**Not:** SS: Sperm Sayısı(milyon/ml), M: Total Motilite, a: İleri hareketli sperm, b: Yavaş ileri hareketli sperm, c: Yerinde hareketli sperm, d: Hareketsiz sperm

Yıkama sonrası iki farklı konsantrasyonda Verapamil uygulaması yapılan semen örneklerinin 90 dakika inkübasyonu sonrası sperm değerleri Tablo 4.2’te verilmiştir.

**Tablo 4.2: Verapamil uygulaması sonrası sperm değerleri**

Örnek No	0,4 µl Verapamil Sonrası					0,8 µl Verapamil Sonrası				
	M (%)	a (%)	b (%)	c (%)	d (%)	M (%)	a (%)	b (%)	c (%)	d (%)
1	87	15	42	30	13	84	13	38	33	16
2	80	2	66	12	20	81	0	67	14	19
3	78	8	56	14	22	75	8	55	12	25
4	80	9	38	33	20	78	5	44	29	22
5	94	2	63	29	6	95	0	64	31	5
6	88	0	48	40	12	90	0	47	43	10
7	87	3	50	37	13	86	0	42	44	14
8	85	20	40	25	15	92	24	47	21	8
9	90	7	44	39	10	89	2	42	45	11
10	81	11	43	27	19	80	12	48	20	20
11	87	2	40	45	13	87	2	38	47	13
12	71	0	29	42	50	75	1	25	49	25
13	79	0	27	52	21	80	0	30	50	20
14	87	9	58	20	13	93	6	68	19	7
15	85	0	35	50	15	84	0	30	54	16
16	82	7	55	20	18	80	5	51	24	20
17	90	10	57	23	10	92	11	56	25	8
18	93	7	70	16	7	94	6	75	13	6
19	81	4	62	15	19	87	5	58	24	13
20	88	3	60	25	12	82	5	50	27	18
21	87	4	50	33	13	86	3	53	30	14
22	89	0	48	41	11	89	0	46	43	11
23	90	0	41	49	10	93	0	42	51	7
24	85	0	50	35	15	87	2	47	38	13
25	91	7	57	27	9	89	7	53	29	11
26	82	5	41	36	18	80	4	43	33	20

**Not:** M: Total Motilite, a: İleri hareketli sperm, b: Yavaş ileri hareketli sperm, c: Yerinde hareketli sperm, d: Hareketsiz sperm

#### 4.1. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler SPSS-27 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Değişkenlerin ön test ve son test ortalamalarındaki farklılıkları görebilmek parametrik testler için yeterli gözlem sayısı olmadığından bağımlı örneklem non-parametrik Wilcoxon analizi uygulanmıştır.

Tablo 4.3'te Gradient Çalışma Öncesi / Gradient Çalışma Sonrası için Bağımlı Örneklem Wilcoxon Analizi sonuçları verilmiştir.

**Tablo 4.3: (Gradient Çalışma Öncesi / Gradient Çalışma Sonrası) Değişkeni Wilcoxon Tablosu**

Ölçüm	Grup	n	Ort.	SS	Fark	z	Sd	p
M (%)	Gradient Çalışma Öncesi	26	54,08	7,929	-	-	25	,000*
	Gradient Çalışma Sonrası	26	93,08	3,440	39,000	4,549		
a (%)	Gradient Çalışma Öncesi	26	5,81	3,086	-	-	25	,000*
	Gradient Çalışma Sonrası	26	25,54	7,235	19,731	4,461		
b (%)	Gradient Çalışma Öncesi	26	38,27	6,885	-	-	25	,000*
	Gradient Çalışma Sonrası	26	59,62	7,333	21,346	4,459		
c (%)	Gradient Çalışma Öncesi	26	9,81	2,450	1,462	-	25	,043*
	Gradient Çalışma Sonrası	26	8,35	3,046		2,027		
d (%)	Gradient Çalışma Öncesi	26	46,88	8,116	39,962	-	25	,000*
	Gradient Çalışma Sonrası	26	6,92	3,440		4,459		

\*p<0,05

**Not:** M: Total Motilite, a: İleri hareketli sperm, b: Yavaş ileri hareketli sperm, c: Yerinde hareketli sperm, d: Hareketsiz sperm

Total motilite (%) değeri, Gradient Çalışma Öncesi ve Gradient Çalışma Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=,000<0,05$ ). Gradient Çalışma Sonrası motilite ortalaması, Gradient Çalışma Öncesi motilite ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir. İleri hareketli sperm (+4 motil, a)(%); yavaş ileri hareketli sperm (+3 motil, b)(%); yerinde hareketli sperm (+2 motil, c)(%) ve immotil sperm (immotil, d)(%) değerleri, Gradient Çalışma Öncesi ve Gradient Çalışma Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=,000<0,05$ ). Gradient Çalışma Sonrası puan ortalaması, Gradient Çalışma Öncesi puan ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir.

Tablo 4.4'te Gradient Çalışma Sonrası / 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası için Bağımlı Örneklem Wilcoxon Analizi sonuçları verilmiştir.

**Tablo 4.4: (Gradient Çalışma Sonrası / 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası) Değişkeni Wilcoxon Tablosu**

Ölçüm	Grup	n	Ort.	SS	Fark	z	Sd	p
M (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	93,08	3,440	7,808	-	25	,000*
	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	85,27	5,250		4,437		
a (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	25,54	7,235	20,346	-	25	,000*
	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	5,19	5,115		4,460		
b (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	59,62	7,333	10,769	-	25	,001*
	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	48,85	11,163		3,239		
c (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	8,35	3,046	-	-	25	,000*
	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	31,35	11,517	23,000	4,458		
d (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	6,92	3,440	-8,615	-	25	,000*
	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	15,54	8,276		4,437		

\* $p<0,05$

**Not:** M: Total Motilite, a: İleri hareketli sperm, b: Yavaş ileri hareketli sperm, c: Yerinde hareketli sperm, d: Hareketsiz sperm

Toplam motilite (%) değeri, Gradient alışma Sonrası ve 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=,000<0,05$ ). Gradient alışma Sonrası puan ortalaması, 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası puan ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir.

a ve b (%) değerleri, Gradient alışma Sonrası ve 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. Gradient alışma Sonrası puan ortalaması, 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası puan ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir. c (%) değeri, Gradient alışma Sonrası ve 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=,000<0,05$ ). 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası puan ortalaması, Gradient alışma Sonrası puan ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir. d (%) değeri, Gradient alışma Sonrası ve 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=,000<0,05$ ). 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası puan ortalaması, Gradient alışma Sonrası puan ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir.

Tablo 4.5'te Gradient Çalışma Sonrası / 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası için Bağımlı Örneklem Wilcoxon Analizi sonuçları verilmiştir.

**Tablo 4.5: (Gradient Çalışma Sonrası / 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası) Değişkeni Wilcoxon Tablosu**

Ölçüm	Grup	n	Ort.	SS	Fark	z	Sd	p
M (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	93,08	3,440	7,385	-	25	,000*
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	85,69	5,857		4,272		
a (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	25,54	7,235	20,885	-	25	,000*
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	4,65	5,549		4,460		
b (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	59,62	7,333	11,192	-	25	,001*
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	48,42	11,917		3,206		
c (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	8,35	3,046	-	-	25	,000*
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	32,62	12,665	24,269	4,460		
d (%)	Gradient Çalışma Sonrası	26	6,92	3,440	-7,385	-	25	,000*
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	14,31	5,857		4,272		

\*p<0,05

**Not:** M: Total Motilite, a: İleri hareketli sperm, b: Yavaş ileri hareketli sperm, c: Yerinde hareketli sperm, d: Hareketsiz sperm

M (%) değeri, Gradient Çalışma Sonrası ve 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p=,000<0,05). Gradient Çalışma Sonrası puan ortalaması, 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası puan ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir. a ve b (%) değerleri, Gradient Çalışma Sonrası ve 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p=,000<0,05). Gradient Çalışma Sonrası puan ortalaması, 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası puan ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir.

c ve d (%) değerleri, Gradient alışma Sonrası ve 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=,000<0,05$ ). 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası puan ortalaması, Gradient alışma Sonrası puan ortalamasından anlamlı bir şekilde farklı ve yüksektir.

Tablo 4.6’da 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası / 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası için Bağımlı rneklem Wilcoxon Analizi sonuçları verilmiştir.

**Tablo 4.6: (0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası / 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası) Değişkeni Wilcoxon Tablosu**

lm	Grup	n	Ort.	SS	Fark	z	Sd	p
M (%)	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	85,27	5,250	-,423	-,433	25	,665
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	85,69	5,857				
a (%)	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	5,19	5,115	,538	-	25	,159
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	4,65	5,549		1,409		
b (%)	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	48,85	11,163	,423	-,560	25	,575
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	48,42	11,917				
c (%)	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	31,35	11,517	-1,269	-	25	,159
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	32,62	12,665		1,409		
d (%)	0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	15,54	8,276	1,231	-,461	25	,644
	0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası	26	14,31	5,857				

\* $p<0,05$

**Not:** M: Total Motilite, a: İleri hareketli sperm, b: Yavaş ileri hareketli sperm, c: Yerinde hareketli sperm, d: Hareketsiz sperm

Uygulanan iki farklı doz arasında karşılaştırma yapıldığında Total motilite, a, b, c ve d (%) değerleri, 0,4 µl Verapamil Uygulama Sonrası ve 0,8 µl Verapamil Uygulama Sonrası puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kalsiyum kanal blokeri olan Verapamil'in, in vitro koşullarda sperm parametreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. 26 farklı hastadan alınan sperm örnekleri, iki farklı konsantrasyonda (0,4 µl ve 0,8 µl) Verapamil ile 90 dakika inkübasyona tabi tutulmuş sperm parametreleri ve sonuçları değerlendirilmiştir.

Verapamil'in sperm hareketliliği üzerindeki etkisi, kalsiyum kanal blokerlerinin sperm fonksiyonları üzerindeki bilinen etkileri ile açıklanabilir. Sperm hareketliliği, hücresel kalsiyum homeostazı ile yakından ilişkilidir. Kalsiyum iyonları, spermatozoa'nın flagellar hareketini düzenleyerek, sperm motilitesi ve kapasitasyon sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (Publicover vd., 2007). Verapamil, kalsiyum iyonlarının hücre içine girişini inhibe ederek, hücresel kalsiyum seviyelerini düşürmekte ve bu yolla sperm hareketliliğini artırabilmektedir.

Önceki çalışmalar, Verapamil'in sperm motilitesi üzerindeki etkilerini çeşitli yöntemlerle incelemiştir. 2008 yılında yapılan Verapamil'in boğa spermatozoaları üzerindeki etkilerini in vitro koşullarda değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada, düşük konsantrasyonlarda Verapamil'in sperm motilitesini artırdığı rapor edilmiştir (Yeste vd., 2008). Benzer şekilde, Samli ve diğerleri (2006), insan spermatozoalarında Verapamil uygulamasının, özellikle ileri hareketlilikte önemli bir artışa yol açtığını göstermiştir. Bu çalışmalar, kalsiyum kanal blokerlerinin sperm hareketliliği üzerindeki potansiyel olumlu etkilerini desteklemektedir.

Çalışmamızda, Verapamil'in iki farklı konsantrasyonunun (0,4 ve 0,8 µl) sperm hareketliliği üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

İlaç uygulaması yapılmadan önce gradient yöntemi ile yıkama öncesi ve sonrası sperm örneklerinin motilite parametreleri incelenmiştir. Sonuçlar, gradient yıkama sonrası tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu ve bu farklılıkların sperm kalitesi üzerinde önemli etkiler yarattığını göstermektedir.

Total motilite (M) değeri, gradient yıkama sonrası belirgin bir artış göstermektedir. İleri hareketli sperm, fertilizasyon kapasitesi yüksek olan sperm olarak kabul edilir ve gradient yıkama sonrası bu parametredeki artış, daha yüksek kaliteli sperm seçilmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda yerinde hareketli sperm (+2 motil, c) ve hareketsiz sperm (d) yüzdeleri, yıkama sonrası önemli derecede azalma göstermektedir.

Sonuç olarak, gradient yıkama yöntemi, sperm hareketliliğini artırmada ve yüksek kaliteli sperm seçmede etkili bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Bu sonuçlar, gradient yıkamanın yardımcı üreme tekniklerinde kullanılmasının uygun olduğunu ve sperm kalitesini iyileştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde de belirtildiği üzere, gradient yıkama yöntemi sperm örneklerinden seminal plazma ve hücresel artıkları ayrıştırarak daha kaliteli ve hareketli sperm seçmektedir (Henkel ve Schill, 2003). Bu durum, yardımcı üreme tekniklerinde başarı oranlarını artırmada kritik bir rol oynar.

0,4 µl ve 0,8 µl Verapamil uygulaması sonrası sperm örneklerinin motilite parametreleri karşılaştırıldığında değerlendirilen tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu görülmektedir.

Her iki konsantrasyonda da belirgin bir motilite değişikliği vardır. Bu değişiklik yerinde hareketli (+2 motil,c ) sperm yüzdesinde yüksek bir artış, ileri hareketli (+4 motil,a ) sperm yüzdesinde ise azalma olarak gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak incelendiğinde de anlamlı bir şekilde fark görülmüştür. Bu durum Verapamil'in sperm fonksiyonları üzerinde etkisinin negatif yönde olduğunu ifade etmektedir.

Bununla birlikte, literatürde Verapamil'in sperm fonksiyonları üzerindeki etkilerini rapor eden bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Jones ve diğerleri (1997), yüksek konsantrasyonlardaki Verapamil'in sperm motilitesini inhibe edebileceğini ve spermatozoaların vitalitesini olumsuz yönde etkileyebileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışma, Verapamil'in doz bağımlı etkilerinin olabileceğini ve yüksek dozlarda potansiyel zararlı etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Ancak çalışmamızda kullanılan Verapamil dozlarının sperm motilitesi üzerindeki gözlemlendiğimiz etkileri, daha düşük konsantrasyonların kullanılmasıyla açıklanabilir.

Çalışmaya ek olarak doz aşımı durumundaki etkileri gözlemlemek amacıyla 6 farklı semen örneğine iki farklı konsantrasyonda (4 µl ve 8 µl) Verapamil uygulandı ve normal dozdaki uygulamalarda (0,4 µl ve 0,8 µl) olduğu gibi iki grupta da yerinde hareketli (+2 motil, c) sperm oranında artış gözlenirken, ileri hareketli (+4 motil, a) sperm oranının belirgin bir şekilde düştüğü gözlemlendi. Ancak örnek sayısının azlığı sebebiyle yüksek konsantrasyonun daha etkili olup olmadığına dair kesin bir sonuca varılamamıştır. Bu durum, Verapamil'in doz bağımlı etkilerinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma, Verapamil'in in vitro koşullarda sperm hareketliliği üzerindeki olumlu ve olumsuz etkilerini göstermekte ve kalsiyum kanal blokerlerinin üreme sağlığı üzerindeki potansiyelini ortaya koymaktadır. Ancak, Verapamil'in klinik kullanımı ve uzun vadeli etkileri hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca Verapamil maruziyetinin sperm DNA'sı üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla sperm DNA Fragmentasyon testi ile daha detaylı bir çalışma yapılabilir. Gelecekteki çalışmalar, farklı dozlarda ve sürelerde Verapamil uygulamalarının sperm parametreleri üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı olarak inceleyerek, bu ilacın erkek üreme sağlığı üzerindeki potansiyel faydalarını ve risklerini daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

Verapamil, bir kalsiyum kanal blokörü olarak, spermin kalsiyum metabolizmasını etkileyerek spermin hareketliliğini ve dolayısıyla döllenme kapasitesini azaltma potansiyeline sahiptir. Literatürdeki bu bilgilerle beraber, Verapamil'in erkek üreme sistemi üzerindeki potansiyel negatif etkilerini araştırmak ve yan etkilerini gözlemlemek amacıyla yapılan bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, özellikle ileri hareketli sperm yüzdesinin sonuçlarıyla birlikte Verapamil'in erkekler için bir doğum kontrol yöntemi olarak kullanılabilirliği sorusu ortaya çıkıyor.

Verapamil'in erkekler için doğum kontrol ilacı olarak kullanımı potansiyel olarak mümkündür, ancak bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Mevcut veriler, Verapamil'in kalsiyum kanallarının blokajı ile spermin döllenme kapasitesini etkilediğini göstermektedir. Ancak Verapamil'in doğum kontrol ilacı olarak uzun süreli kullanımı ve sistemik etkileri hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. İlacın kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, uzun süreli kullanımının güvenliği konusunda endişeler bulunmaktadır. Ayrıca, diğer olası yan etkileri ve ilaç etkileşimleri de dikkate alınmalıdır.

Dolayısıyla Verapamil'in bu amaçla kullanımı için daha geniş çaplı klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Mevcut bulgular umut verici olsa da Verapamil'in doğum kontrol yöntemi olarak güvenli ve etkili olup olmadığını belirlemek için daha fazla araştırma gerekmektedir. Bu araştırmalar, ilacın etkinliğini, güvenliğini ve uzun vadeli etkilerini kapsamlı bir Şekilde değerlendirmelidir.

Gelecekteki alışmalarda, Verapamil uygulamasının uzun vadeli etkilerinin incelenmesi ve farklı dozlarda Verapamil kullanımının sperm parametreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması, bu konuda daha kapsamlı bilgiler sağlayabilir. Ayrıca, bu yöntemlerin klinik gebelik ve doğum oranları üzerindeki etkilerinin araştırılması da önemli olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

Aalberts, M., Stout, T. A., & Stoorvogel, W. Prostatomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2013;147(1),R1–R14. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0358>

Abu-Musa, A. A., Kobeissi, L., Hannoun, A. B., & Inhorn, M. C. Effect of war on fertility: a review of the literature. *Reproductive biomedicine online*, 2008; 17 Suppl 1, 43–53. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60189-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60189-7)

Aitken, R. J., & Clarkson, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of andrology*, 1988; 9(6), 367–376. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1988.tb01067.x>

Aka Satar D, Bağcı R & Demirdelen U. The Effect of War Conditions and Social Stress on Semen Parameters in Syrian Refugees. *Phnx Med J*. 2024; 6(1):6-10.

de Oliveira, A. A., & Nunes, K. P. Hypertension and Erectile Dysfunction: Breaking Down the Challenges. *American journal of hypertension*, 2021; 34(2), 134–142. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa143>

Anthony L. Mescher. *Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas*. Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu H.S., Çev ed. Güneş Tıp Kitabevleri (2019).

Arıkan A, Aydın A, Ekerbiçer H, Karaayaç R, Zeytinoğlu Y, Muratdağı G, Sezer MN, Etçioğlu E, Karadeniz F & Kurban A. Hipertansiyon Tanısı Olan Hastaların Hastalıkları Hakkındaki Bilgi Düzeyleri ve İlişkili Faktörler. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2020; 10(Özel Sayı):33-40. doi:10.31832/smj.745870

Attaman, J. A., Toth, T. L., Furtado, J., Campos, H., Hauser, R., & Chavarro, J. E. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. *Human reproduction (Oxford, England)*, 2012;27(5),1466–1474. <https://doi.org/10.1093/humrep/des065>

Baldota, J., Lunkad, A., Latthe, A. & Malpani; R. *Treatment and Chemical compounds for hypertension*. International Journal of Research Publication and Reviews, 2022; Vol 3, no 6, pp 1563-1570,

Baskaran, S., Finelli, R., Agarwal, A., & Henkel, R. Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. *Andrologia*, 2021; 53(2),e13614. <https://doi.org/10.1111/and.13614>

Boitrelle, F., Shah, R., Saleh, R., Henkel, R., Kandil, H., Chung, E., Vogiatzi, P., Zini, A., Arafa, M., & Agarwal, A. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life (Basel, Switzerland)*, 2021; 11(12), 1368. <https://doi.org/10.3390/life11121368>

Carrasquel Martínez, G., Aldana, A., Carneiro, J., Treviño, C. L., & Darszon, A. Acrosomal alkalization occurs during human sperm capacitation. *Molecular human reproduction*, 2022; 28(3), gaac005. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaac005>

Cebesoy F.B. , Ünlü C. , Aydos K. & Baltacı V. The Relationship Between Sperm Morphology-Acridine Turuncu Staining Andfertilization Rate-Embryo Quality in Icsi. J Turkish-German Gynecol Assoc. 2006; 7(2):110-14.

Chavarro, J. E., Furtado, J., Toth, T. L., Ford, J., Keller, M., Campos, H., & Hauser, R. Trans-fatty acid levels in sperm are associated with sperm concentration among men from an infertility clinic. *Fertility and sterility*, 2011; 95(5), 1794–1797. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.10.039>

Chohan, K. R., Griffin, J. T., Lafromboise, M., De Jonge, C. J., & Carrell, D. T. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of andrology*, 2006;27(1),53–59. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05068>

Chojnacka, K., Zarzycka, M., & Mruk, D. D. Biology of the Sertoli Cell in the Fetal, Pubertal, and Adult Mammalian Testis. *Results and problems in cell differentiation*, 2016; 58, 225–251. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_9)

Delilbaşı L, Klinik Embriyoloji Uygulamaları Atlası. Büyükharf Tıp Yayınları, 2010; p.37–171.

Doumas, M., Viigimaa, M., & Papademetriou, V. Combined antihypertensive therapy and sexual dysfunction: terra incognita. *Cardiology*, 2013; 125(4), 232–234. <https://doi.org/10.1159/000351696>

Gökçe A. Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. Turk Urol Sem, 2011; 2: 1-7

Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 2021; 53(2), e13874. <https://doi.org/10.1111/and.13874>

Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., & Claussen, O. P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction (Oxford, England)*, 1999; 14(4), 1039–1049. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.4.1039>

Fahie S, Cassagnol M. Verapamil. [Updated 2023 Feb 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-

Grimm, R. H., Jr, Grandits, G. A., Prineas, R. J., McDonald, R. H., Lewis, C. E., Flack, J. M., Yunis, C., Svendsen, K., Liebson, P. R., & Elmer, P. J. Long-term effects on sexual function of five antihypertensive drugs and nutritional hygienic treatment in hypertensive men and women. Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS). *Hypertension(Dallas, Tex.:1979)*, 1997; 29(1Pt1),8–14. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.29.1.8>

Guo D, Li S, Behr B & Eisenberg M. PD52-12 The impact of hypertension and antihypertensives on semen quality. *J Urol*. 2015; 193:e1117.

Guo D, Li S, Behr B & Eisenberg ML. Hypertension and male fertility. *World J Mens Health*. 2017; 35(2):59-64.

Hamilton, T. R. D. S., & Assumpção, M. E. O. D. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote (Cambridge, England)*, 2020; 28(1), 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000595>

Harris, I. D., Fronczak, C., Roth, L., & Meacham, R. B. Fertility and the aging male. *Reviews in urology*, 2011; 13(4), e184–e190.

Henkel, R., & Schill, W. B. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003; 1(1), 108.

Hermo, L., Oliveira, R. L., Smith, C. E., Au, C. E., & Bergeron, J. J. M. Dark side of the epididymis: tails of sperm maturation. *Andrology*, 2019; 7(5), 566–580. <https://doi.org/10.1111/andr.12641>

Hernández-Cerda, J., Bertomeu-González, V., Zuazola, P., & Cordero, A. Understanding Erectile Dysfunction in Hypertensive Patients: The Need for Good Patient Management. *Vascular health and risk management*, 2020; 16, 231–239. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S223331>

Hirose, M., Honda, A., Fulka, H., Tamura-Nakano, M., Matoba, S., Tomishima, T., Mochida, K., Hasegawa, A., Nagashima, K., Inoue, K., Ohtsuka, M., Baba, T., Yanagimachi, R., & Ogura, A. Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020; 117(5), 2513–2518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917595117>

John E. Hall, Arthur C. Guyton. *Medical Physiology*, 2021 (14.th Edition)

Jones, R. C., Mann, T., & Sherins, R. J. Inhibition of sperm motility by calcium antagonists in vitro. *International Journal of Andrology*, 1997; 20(5), 249-255.

Jurewicz, J., Radwan, M., Sobala, W., Radwan, P., Bochenek, M., & Hanke, W. Dietary Patterns and Their Relationship With Semen Quality. *American journal of men's health*, 2018; 12(3), 575–583. <https://doi.org/10.1177/1557988315627139>

Kadıoğlu, A., Kendirci, M., Aktan, G., Yaman, Ö., Çayan, S. WHO Laboratuvar El Kitabı. İçinde: İnsan Semeninin İncelenmesi Ve İşlemlerden Geçirilmesi. Türk Üroloji Derneği, 2011. ISBN:978-975-00112-4-5.

Khalili, M. A., Aghaie-Maybodi, F., Anvari, M., & Talebi, A. R. Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urology journal*, 2006; 3(3), 154–159.

Kılıç, T.; Üstü, Y. *An Evidence Based Guideline For Hypertension in Primary Care*. Ankara Medical Journal. 2012; 12(4):205-213

Koyuncu, H.(2011), Methods for the determination of sperm DNA damage. *Turk Urol Sem.*; s:18-23.

Kumar, N., & Singh, A. K. The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biology of reproduction*, 2021; 104(3), 508–520. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa213>

Leemans, B., Stout, T. A. E., De Schauwer, C., Heras, S., Nelis, H., Hoogewijs, M., Van Soom, A., & Gadella, B. M. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2019; 157(5), R181–R197. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0541>

Leslie SW, Sooriyamoorthy T. Erectile Dysfunction. [Updated 2024 Jan 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562253/>

Lewis, S. E., & Simon, L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Human fertility (Cambridge, England)*, 2010; 13(4), 201–207. <https://doi.org/10.3109/14647273.2010.528823>

Liffner, S., Pehrson, I., García-Calvo, L., Nedstrand, E., Zalavary, S., Hammar, M., Rodríguez-Martínez, H., & Álvarez-Rodríguez, M. Diagnostics of DNA fragmentation in human spermatozoa: Are sperm chromatin structure analysis and sperm chromatin dispersion tests (SCD-HaloSpermG2®) comparable?. *Andrologia*, 2019; 51(8), e13316. <https://doi.org/10.1111/and.13316>

Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Böhm, M., Christiaens, T., Cifkova, R., De Backer, G., Dominiczak, A., Galderisi, M., Grobbee, D. E., Jaarsma, T., Kirchhof, P., Kjeldsen, S. E., Laurent, S., Manolis, A. J., Nilsson, P. M., Ruilope, L. M., Schmieder, R. E., ... Wood, D. A. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*, 2013; 34(28), 2159–2219. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs151>

Mendiola, J., Torres-Cantero, A. M., Vioque, J., Moreno-Grau, J. M., Ten, J., Roca, M., Moreno-Grau, S., & Bernabeu, R. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertility and sterility*, 2010; 93(4), 1128–1133. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.075>

Mensah, G. A., & Bakris, G. Treatment and control of high blood pressure in adults. *Cardiology clinics*, 2010; 28(4), 609–622. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2010.08.002>

Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Dalçık H (Editörler). 2. Baskı; İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi (2009).

Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., & Baldi, E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Advances in experimental medicine and biology*, 2019; 1166, 75–85. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_5)

Nilsson, P. M., Viigimaa, M., Giwercman, A., & Cifkova, R. Hypertension and Reproduction. *Current hypertension reports*, 2020; 22(4), 29. <https://doi.org/10.1007/s11906-020-01036-2>

O'Donnell L, Stanton P, de Kretser DM. Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis. [Updated 2017 Jan 11]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com,Inc.;2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279031/>

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 2012; 98(2), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.05.033>

Publicover, S., Harper, C. V., & Barratt, C. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signalling in sperm making the most of what you've got. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007; 8(6), 469–477.

Rato, L., Alves, M. G., Socorro, S., Duarte, A. I., Cavaco, J. E., & Oliveira, P. F. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature reviews. Urology*, 2012; 9(6), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.77>

Robinson, L., Gallos, I. D., Conner, S. J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., Coomarasamy, A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 2012; 27(10), s: 2908-2917.

Ross H.M., Kaye G., Pawlina W. *Histology, a text and atlas*, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2003; 689-696.

Ross MH, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. Baykal B, Çev. ed. Ankara: Palme Yayıncılık, 2014; p.784–830.

Ross, M. H., ve Pawlina, W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. (B. Baykal,Ed.) (6.). Ankara: Palme Yayınevi, 2017.

Sadler, T. W. *Langman's Medikal Embriyoloji* (13th ed). Ankara: Palme Yayınevi, 2020

Sakkas, D., & Alvarez, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility*, 2010; 93(4), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.046>

Samli, H., Ozdemir, K., & Yucel, D. The effect of calcium channel blockers on human sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, 2006; 8(6), 606-609.

Segal, T. R., & Giudice, L. C. Before the beginning: environmental exposures and reproductive and obstetrical outcomes. *Fertility and sterility*, 2019; 112(4), 613–621. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.001>

Sharma, R., Masaki, J., & Agarwal, A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2013; 927, 121–136. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_12)

Sharma, S., Hanukoglu, A., & Hanukoglu, I. Localization of epithelial sodium channel (ENaC) and CFTR in the germinal epithelium of the testis, Sertoli cells, and spermatozoa. *Journal of molecular histology*, 2018; 49(2), 195–208. <https://doi.org/10.1007/s10735-018-9759-2>

Slivnick, J., & Lampert, B. C. Hypertension and Heart Failure. *Heart failure clinics*, 2019; 15(4), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2019.06.007>

**URL-1:** <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>

**URL-2:** <https://us.ivfstore.com/products/makler-sperm-counting-chamber>

Vujkovic, M., de Vries, J. H., Dohle, G. R., Bonsel, G. J., Lindemans, J., Macklon, N. S., van der Spek, P. J., Steegers, E. A., & Steegers-Theunissen, R. P. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Human reproduction (Oxford, England)*, 2009; 24(6), 1304–1312. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep024>

World Health Organization, WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 2021; 6th edition, WHO Press; Geneva, Switzerland.

World Health Organization, WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010; 5th edition WHO Press.

Yazan Y, Özer Y. Verapamil. *FABAD Farm. Bil. Der.*, 1993; 18, 51-56

Yeste, M., Lloyd, R. E., Badia, E., Briz, M., & Bonet, S. Effect of verapamil on boar sperm function and in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, 2008; 70(5), 922-932.

Zeqiraj A, Beadini S, Beadini N, Aliu H, Gashi Z, Elezaj S, Bexheti S & Shabani A. Male Infertility and Sperm DNA Fragmentation. *Open Access Maced J Med Sci.*, 2018; 14;6(8):1342-1345. doi: 10.3889/oamjms. PMID: 30159053; PMCID: PMC6108823

Zhao, C., Feng, J. L., Deng, S., Wang, X. P., Fu, Y. J., Wang, B., Li, H. S., Meng, F. C., Wang, J. S., & Wang, X. Genetically predicted hypertension, antihypertensive drugs, and risk of erectile dysfunction: a Mendelian randomization study. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 2023; 10, 1157467. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1157467>

Zini, A., & Sigman, M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of Andrology*, 2009; 30(3), 219-229.