



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**IN VİTRO *Ceratonia siliqua* UYGULAMASININ İNSAN SPERM
KRİYOPREZERVASYONUNA BAĞLI OLUŞAN DNA HASARI
ÜZERİNE TERAPOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dilara AKINCI

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat AKKUŞ

DİYARBAKIR 2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**IN VİTRO *Ceratonia siliqua* UYGULAMASININ İNSAN SPERM
KRİYOPREZERVASYONUNA BAĞLI OLUŞAN DNA HASARI
ÜZERİNE TERAPOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dilara AKINCI

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat AKKUŞ

DİYARBAKIR 2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Dilara AKINCI'nın hazırladığı “In vitro Ceratonia siliqua uygulamasının insan sperm kriyoprezervasyonuna bağlı oluşan DNA hasarı üzerine terapötik etkisinin incelenmesi” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Murat Akkuş _____

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı Prof. Dr. Murat Akkuş _____

Üye Prof. Dr. Selçuk Tunik _____

Üye Prof. Dr. M. Cudi Tuncer _____

Üye Prof. Dr. D. Özlem Dabak _____

Üye Prof. Dr. Tuncay Kuloğlu _____

Tarih: 23/01/2025

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr.
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

23/01/2025

Dilara Akıncı

TEŞEKKÜR

Doktoraya başlamamda bana güvenen tezimin her aşamasında ve her zaman yanımda olan, mesleki kariyerimde de her zaman fikrini önemseyen ve bana her daim zaman ayırıp beni destekleyen, bilgisini benden sakınmayan , başta danışmam hocam sayın Prof. Dr. Murat AKKUŞ’a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, eğitim sürecimde bana yol gösteren ve biran önce sağına kavuşmasını beklediğimiz sayın Prof. Dr. Engin DEVECİ’ye,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nın çok değerli ve kıymetli hocaları Prof. Dr. Sevda SÖKER’e, Prof. Dr. Ayfer AKTAŞ’a, Prof. Dr. Selçuk TUNİK’e, Doç. Dr. Cenap EKİNCİ’ye ve Dr. Öğr. Üyesi E Fırat AŞIR’a,

Tez izleme komisyonunda yer alarak katkılarını esirgemeyen Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi ve bölüm başkanı Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER’e,

Sadece eğitim hayatım değil tüm hayatımda yanımda olup beni destekleyen çok değerli eşim Mehmet Emin AKINCI’ya varlığı her daim mutluluğum olan canım oğlum Ervin AKINCI’ya

Her zaman yanımda olan eğitim hayatımın baş mimarları canım annem Hacer Konk babam Zakir Konk’a

Tüm bu süreçte tüm düzenini bozup destek olan çok değerli kayınpederim Adnan AKINCI ve kayınvalidem Fatma AKINCI’ya

Ve bu tezde emeği geçen ve ismini sayamadığım tüm özel ve tüzel kişiliklere teşekkür ederim.

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
1. ÖZETLER.....	1
1.1. Türkçe Özet	1
1.2. Abstract	3
2. GİRİŞ VE AMAÇ	4
3. GENEL BİLGİLER.....	5
3.1. Gametogenezis	5
3.1.1. Primordial Germ Hücreleri	6
3.2. Spermatogenez	7
3.2.1. Spermatositogenezis.....	9
3.2.2. Spermiyogenez.....	10
3.2.3. Spermatogeneizin Hormonal Düzenlenmesi.....	12
3.2.4. Epididimal Matürasyon.....	13
3.2.5. Kapasitasyon	14
3.3. Erkek Üreme Sistemi.....	14
3.3.1. Testisler	15
3.3.2. Seminifer tübüller.....	16
3.3.3. Sertoli Hücreleri	17
3.3.4. Olgun sperm	18
3.4. Testis İçin Kanallar	19
3.4.1. Genital boşaltım kanalları	19
3.4.2. Yardımcı Genital Bezler	20
3.5. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi.....	21
3.5.1. Obstrüktif infertilitenin nedenleri	22
3.5.2. Non-obstrüktif infertilite nedenleri	23
3.5.3. Erkek infertilitesinin diğer nedenleri	24

3.5.4.	Erkek İnfertilitesi Tanı Yöntemleri.....	24
3.5.5.	Anamnez	25
3.5.6.	Fiziksel Muayene	25
3.5.7.	Semen Analizi	25
3.1.	Sperm Toplama ve Hazırlama Teknikleri	33
3.1.1.	Ejekülasyon.....	33
3.1.2.	Cerrahi yöntemler.....	33
3.1.3.	Dansite-Gradient yöntemi	34
3.1.4.	Direkt Yüzdürme Tekniği (Swim-up).....	34
3.2.	Kriyoprezervasyon	35
3.2.1.	Sıvı azot.....	36
3.2.2.	Kriyobiolojinin temelleri.....	36
3.2.3.	Kriyoprezervasyonda başarıyı etkileyen etmenler	37
3.2.4.	Kriyoprezervasyon metotları.....	41
3.2.5.	Dondurma esnasında hücrede meydana gelecek değişiklikler.....	43
3.2.6.	Ozmotik stres ve ozmotik şişme	44
3.2.7.	Sperm kriyoprezervasyonu	45
3.3.	Medikal Bitkiler	46
3.3.1.	Medikal bitkilerin fertilitate etkileri.....	47
3.3.2.	Keçiboynuzu (Ceratonia siliqua L.)	48
4.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	51
4.1.	Hasta Grubu.....	51
4.2.	Sperm Konsantrasyonu.....	53
4.3.	Sperm Motilitesi	53
4.4.	Sperm Morfolojisi	53
8.1.	Sperm Vitalitesi	55
8.2.	Sperm Yıkama	56
8.3.	Sperm Kriyoprezervasyonu	56
7.1.	Sperm çözme	57
7.2.	Acridine Orange (Akridin Turuncusu) Boyama.....	57
7.3.	Keçiboynuzu Özütünün Hazırlanması.....	58
7.4.	İstatistiksel Analiz	59
8.	BULGULAR.....	60
8.1.	Yaş.....	60

8.2.	Semen Volümü	60
8.3.	Sperm Konsantrasyonu.....	60
8.4.	Morfoloji	60
8.5.	Motilite	61
8.6.	DNA Fragmantasyonu.....	63
8.7.	Vitalite (Plazma Memran Bütünlüğü)	65
9.	TARTIŞMA.....	69
10.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
11.	KAYNAKLAR	73
12.	ÖZGEÇMİŞ.....	88
13.	EKLER.....	89
13.1.	Ek 1 – Etik kurul	89
13.2.	Ek-2 – Gönüllü Hasta Onam Formu.....	90
13.3.	Ek 3 – Mezuniyet Yayını.....	91
14.	ORJİNALLİK RAPORU	92

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH	: Anti Müllerian Hormon
ATP	: Adenozin trifosfat
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
CatSper	: Sperm Katyon Kanalları
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CLA 1:	: Lipoprotein Reseptörü
Ca	: Kalsiyum
ICSI	: Metre kare
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salıverici Hormon
PGH	: Primordial Germ Hücreleri
ÜYTE	: Üremeye Yardımcı Tedavi
SRY	: Seks Belirleyici Bölge
dER	: Düz Endoplazmik Retikulum
ER	: Endoplazmik Retikulum
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri

HHG	: Hipotalamus- Hipofiz-Gonadal Üreme Aksını
ICSI	: İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IUI	: İntra Uterin İnsaminasyon
H2O2	: Hidrojen Peroksit
HOST	: Hipo Osmolar Şişme Testi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
LH	: Luteinizan Hormon
OA	: Obstrüktif Azoospermi
OAT	: Oligoastenoteratozoosper
NOA	: non-obstrüktif azoospermi
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyon
OH[•]	: Hidroksil Radikali
O₂⁻	: Süperoksit Radikali

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Gametogenez (8).....	7
Şekil 2. Spermatogenezin oluşum aşamaları (22).....	9
Şekil 3. Spermiyogenezisin şematik çizimi (13).....	12
Şekil 4. Hipotalamus-hipofizer-gonadal aksın şematik görüntüsü (23).....	13
Şekil 5. erkek genital sistemi (24)	15
Şekil 6. Seminifer Tübül (24)	17
Şekil 7. Seminifer Tübül Hücreleri (28).	18
Şekil 8. Olgun sperm (27).....	19
Şekil 9. Makler sayım kamerası ve faz kontras mikroskopundaki görüntüsü (134)..	27
Şekil 10. Eosin Y testi sonrası canlı ve ölü sperm hücreleri (81).....	28
Şekil 11. Farklı aşamalarda HOS testi sonrası sperm görüntüleri (135).....	29
Şekil 12. Normal ve anormal sperm (136).....	32
Şekil 13. Dansite-Gradient Yönteminin uygulanışı (137)	34
Şekil 14. Swim Up Yönteminin uygulanışı (137).....	35
Şekil 15. Keçiboynuzu ağacı (138).....	49
Şekil 16. Keçiboynuzu meyvesi ve tohumu (138).....	50
Şekil 17. Çalışmamızda morfoloji değerlendirme için kullandığımız SpermDif-Quik boyaları.	55
Şekil 18. Çalışmamızda vitalite değerlendirmede kullandığımız Eosin Y boyası.....	55
Şekil 19. Sperm dondurma protokolü	57
Şekil 20. a .)şekli normozospermi grubuna ait morfoloji b .)grubu astenozoospermik gruba ait morfoloji (x40). sarı renkli ok anormal, beyaz renkli ok normal sperm (136) göstermekte.....	61
Şekil 21. Sperm DNA Fragmentasyonu Akridin Oranj Boyama (x40). A şekli normozospermiye ait gruba B şekli astenozoospermi gruba aittir. kırmızı yıldız: normal DNA'lı sperm (136), sarı yıldız: hasarlı DNA'lı sperm (136) göstermekte.....	64
Şekil 22. Normospermi örneklerinde sperm vitalite eosin y boyama (x40)	66
Şekil 23. Astenospermi örneklerinde sperm vitalite eosin y boyama (x40)	66

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Spermiyogram terminolojiler (80).	32
Tablo 2. Çalışma için oluşturulan gruplar	52
Tablo 3. Sperm Motilite Sonuçları	63
Tablo 4. Sperm DNA fragmantasyon Sonuçları	65
Tablo 5. Sperm vitalite Sonuçları	68



1. ÖZETLER

1.1.Türkçe Özet

In vitro Ceratonia siliqua uygulamasının insan sperm kriyoprezervasyonuna bağlı oluşan DNA hasarı üzerine terapotik etkisinin incelenmesi

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Dilara AKINCI

Danışmanı: Prof. Dr. Murat AKKUŞ

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Amaç: Sperm ve testiküler doku kriyoprezervasyonu 1953 yılından itibaren erkek infertilitesinde fertilitenin korunması için tedavi yöntemi olarak kullanılmaya başlamıştır. Kriyoprotektanlarla dondurulan semen örneğinin çözme sonrasında fonksiyonel parametrelerinin (vitalite, motilite, konsantrasyon ve fertilizasyon potansiyeli,DNA fragmentasyonu) olumsuz yönde etkilendiği yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. Dondurularak saklanan sperm hücreleri yardımıla üreme tekniklerinde kullanıldığında, düşük fertilizasyon oranları ve embriyonun gelişim,5. güne ulaşamayan embriyolar ve implantasyon potansiyelinde azalma, abortus oranlarında ise artma görülmektedir. Bu çalışmada semen örneklerine in vitro Ceratonia siliqua uygulamasının vitalite, motilite,DNA fragmentasyonu üzerine terapotik etkilerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma insan sperm kriyopreservasyonu sırasında, spermde meydana gelen kriyohasara sonuc olarak, sperm parametrelerinde meydana gelen olumsuz etkiyi azaltmak için, dondurma ortamına eklenen Ceratonia siliqua L (keçi boynuzu) bitkisinin etkisini araştırmak üzere yapılmıştır.

Bu tez çalışmasına 25-40 yaş aralığında toplam 50 hasta dahil edilmiştir. Bu 50 hastadan 25'i astenozoospermik , 25 i normozoospermik olarak ayrılmış ve semen örnekleri 6 gruba ayrılmıştır. 1. grup sadece gradient yöntemi ile yıkanmış normospermik grup, 2. grup gradient yöntemi ile yıkanmış ve dondurup çözölmüş normozoospermik grup, 3. grup gradient yöntemi ile yıkanmış ve dondurup çözölmüş ve Ceratonia siliqua L.eklenmiş normozoospermik grup, 4. grup sadece gradient yöntemi ile yıkanmış astenozoospermik grup, 5. grup gradient yöntemi ile yıkanmış ve dondurup çözölmüş astenozoospermik grup ve son olarak 6. grup gradient

yöntemi ile yıkanmış ve dondurup çözülmüş ve *Ceratonia siliqua* L. eklenmiş astenozoospermik gruptur.

Semen örnekleri -196 Co'lık likit azot ile dondurulmuş ve azot tankında saklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler 37 Co'de çözündürülmüş ve tüm gruplarda: motilite, DNA fragmantasyonu ve vitalite parametrelerine bakılmıştır.

Bulgular: Dondurup çözme işleminin sperm parametreleri üzerindeki etkisine bakmak için sadece gradient yöntemi ile yıkanmış semen örnekleri *Ceratonia siliqua* L eklenmeden dondurulup çözülmüş grup karşılaştırılmış ve kriyopreservasyon işleminin sperm parametrelerinin tümünü anlamlı ($p<0,05$) düzeyde olumsuz etkilediği görülmüştür.

Kriyohasar üzerine *Ceratonia siliqua* L etkisinin araştırılması içinde sperm dondurma ortamına *Ceratonia siliqua* L eklenen gruplarda sperm parametreleri karşılaştırılmıştır. Motilite, DNA fragmantasyonu ve vitalite parametrelerinin değerlendirilmesi için *Ceratonia siliqua* L konsantrasyon %0.01 olarak ayarlanmıştır.

Ceratonia siliqua L. eklenmemiş gruplarla göre *Ceratonia siliqua* L eklenmiş gruplar arasında olumlu bir fark gözlenmiştir..

Sonuç: Sperm kriyopreservasyon ortamına *Ceratonia siliqua* L takviyesi dondurup çözme işlemi sonrası spermde meydana gelen hasarı önemli derecede azaltmıştır. Hücrede doğrudan serbest radikal temizleme ve mitokondri üzerinde koruyucu etki özelliği olan *Ceratonia siliqua* L, kriyohasara ana sebebi olarak görülen serbest oksijen radikalleri (ROS)'un oluşturduğu zararlı etkiyi baskılayabildiği gösterilmiş olup, insan sperm kriyopreservasyonunda kullanılabileceğini gösteren bir çalışma olmuştur.

Anahtar Sözcükler: Keçiboynuzu, Sperm, Kriyoprezervasyon, DNA hasarı, motilite, vitalite.

1.2. Abstract

Investigation of the therapeutic effect of in vitro Ceratonia siliqua application on DNA damage caused by human sperm cryopreservation.

Student's Surname and Name: Dilara AKINCI

Advisor: Prof. Dr. Murat AKKUŞ

Department: Histology and Embryology

Abstract

Aim: Smoking

Materials and Methods: A

Results: The

Conclusion: Smoking

Keywords: DNA

2. GİRİŞ VE AMAÇ

Fertilizasyon süreci için sperm hücrelerinin canlılığı büyük önem taşımaktadır. Ancak çeşitli faktörler, sperm hücrelerinin yapısal bütünlüğünü ve canlılığını olumsuz etkileyebilir, bu da üreme sağlığında sorunlara yol açabilir. Günümüzde sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonu, infertilite tedavisinde sıkça başvurulmuş bir yöntemdir. Bu teknik, özellikle kanser hastalarında kemoterapi ve radyoterapi öncesinde üreme yeteneğinin korunması amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, diyabet ve otoimmün hastalıklar gibi testiküler hasara neden olabilecek durumlarda, oligospermi ve ejakülatör disfonksiyonlarda, sperm donasyonu uygulamalarında ve testiküler sperm elde edilen azospermi vakalarında da yaygın şekilde uygulanmaktadır. Saklanan bu hücreler, ileri dönemlerde üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) süreçlerinde kullanılmaktadır (1).

Kriyoprezervasyon yöntemi, ilk olarak 1953 yılında erkek infertilitesinde fertilitenin korunması amacıyla uygulanmaya başlamıştır. Ancak yapılan araştırmalar, kriyoprotektan kullanılarak dondurulan semen örneklerinin çözme işlemi sonrasında fonksiyonel parametrelerde belirgin bozulmalar yaşandığını göstermektedir. Bu parametreler arasında vitalite, motilite, konsantrasyon, fertilizasyon potansiyeli ve DNA fragmentasyonu yer almaktadır (2). Ayrıca, kriyoprezervasyon sonrası sperm hücreleri ile yapılan üremeye yardımcı tekniklerde, düşük fertilizasyon oranları, embriyonun gelişiminde gerileme, 5. güne ulaşamayan embriyolar, azalan implantasyon potansiyeli ve artan düşük oranları gözlemlenmiştir (3).

Bu tez çalışmasında, kriyoprezervasyon öncesi ve sonrasında 50 hastaya ait sperm parametreleri ve DNA fragmentasyon seviyeleri incelenmiştir. Ayrıca, *in vitro* Ceratonia siliqua L. uygulanmasının sperm parametreleri ve DNA fragmentasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarımız, kriyoprezervasyon işleminin sperm parametrelerini olumsuz yönde etkilediğini ve DNA fragmentasyonunu artırdığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Ceratonia siliqua L. uygulamasının sperm fonksiyonları üzerindeki terapötik etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Gametogenezis

Gametogenezis, en genel tanımıyla diploid germ hücrelerinin mayoz bölünme ve farklılaşma süreçleri sonucunda haploid dişi ve erkek gamet hücrelerine dönüşmesidir. Gametogenez, erkek bireylerde spermatogenez, dişi bireylerde oogenez olarak ayrılır. Bu süreç esnasında erkek ve dişi germ hücrelerinde çeşitli değişimler meydana gelir. Bu değişimlerin altında yatan iki temel neden şunlardır:

1. Somatik hücrelerde bulunan diploid kromozom sayısının gamet hücrelerinde haploid düzeye düşmesi.
2. Fertilizasyona hazırlık amacıyla üreme hücrelerinin farklılaşması.

Erkek ve dişi bireylerde gametogenez süreci arasında bazı temel farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar şu şekilde sıralanabilir:

Erkeklerde Gametogenez (Spermatogenez)

- Spermatogenez puberte döneminde başlar.
- Puberteyle birlikte sperm üretimi başlar ve yaşam boyu devam eder, ancak yaşla birlikte azalır.
- Her bir primer spermatositte dört olgun spermatozoa oluşur.

Dişilerde Gametogenez (Oogenez)

- Oogenez fetal dönemde başlar.
- Dişi bireylerde oogenez, yaşam boyunca iki kez duraklar: Birinci duraklama doğum öncesinde profaz I evresinde gerçekleşir. İkinci duraklama metafaz II evresinde olup fertilizasyonla sona erer.
- Her primer oositte yalnızca bir olgun oosit meydana gelir.
- Oogenez menopoza ile sona erer (4).

3.1.1. Primordial Germ Hücreleri

Olgun bir erkek bireyin gameti olan sperm ile dişi bireyin olgun oositi birleşerek zigotu oluşturur ve bu yapı, yeni bir yaşamın başlangıcıdır. Gelişecek olan bu yeni canlının gamet hücreleri, primordial germ hücrelerinden (PGH) köken alır.

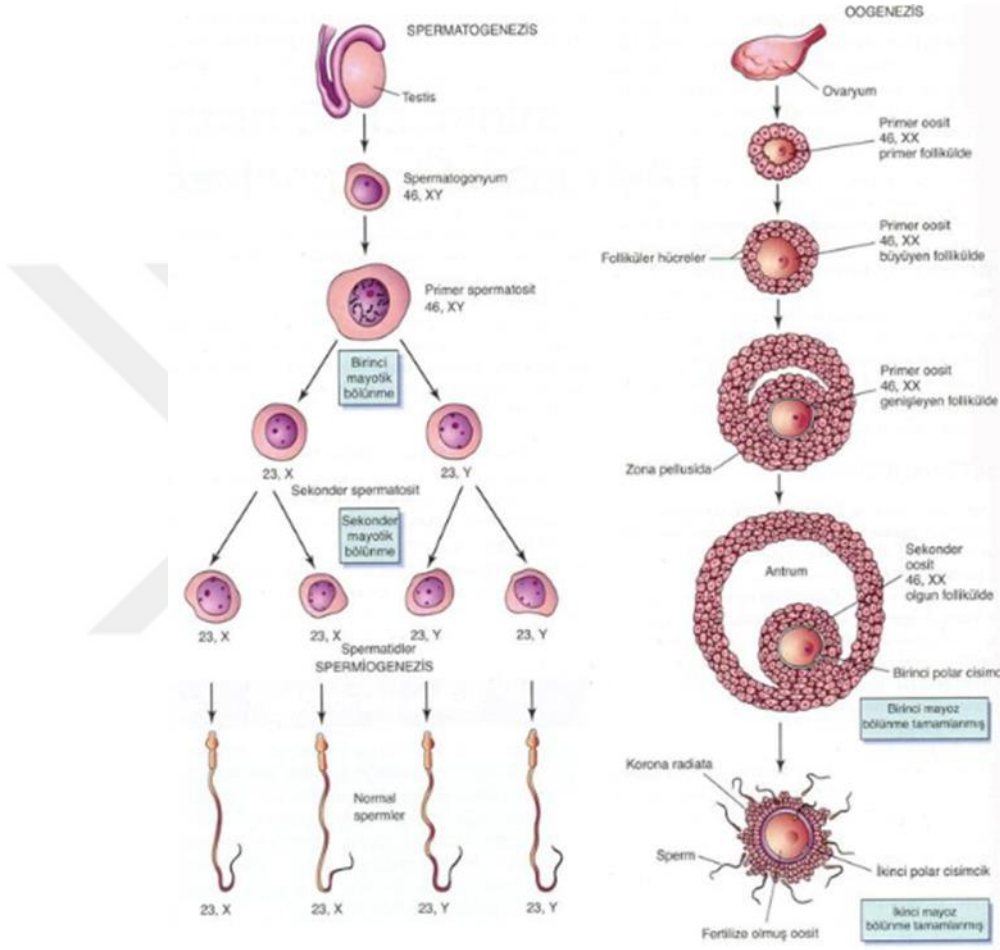
Blastokistin endometriuma implantasyonunun 5. gününden itibaren, embriyo 3 primer germ tabakasında farklılaşmaya başlar. Bu süreçte, özel bir hücre grubu PGH olarak tanımlanır. Canlının gelecekteki üreme kapasitesi, bu hücre grubunun doğru bir şekilde gelişmesine bağlıdır (5).

Embriyonik gelişimin ikinci haftasında, epiblast içinde oluşan PGH'ler, dördüncü haftanın başında yolk kesesinin dorsal duvarında, allantoisin başlangıç bölgesinde, endodermal hücreler arasında yaklaşık 100 hücre olarak ortaya çıkar. Bu hücreler, endodermal hücrelerden daha büyük, daha az organelli ve şeffaf yapılarıyla ayırt edilir.

Dördüncü ile altıncı haftalar arasında, PGH'ler ameboid hareketler ile yolk kesesinden önce bağırsak tüplerine, ardından mezenter boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol kısımlarına doğru hareket ederler (6). Altıncı hafta itibarıyla, mezenşim içine girerek primer seks kordonlarına dahil olurlar. Bu süreçte, mitotik bölünmeler ile hücre sayıları artar ve kolonize olduklarında gonadların oluşumunu tamamlarlar. Bu evre, erkek ve dişi germ hücrelerinin birbirinden ayrılmadığı bir dönem olduğu için “farklanmamış evre” olarak adlandırılır.

Genital kabartıyı çevreleyen germinal epitelden türeyen hücreler, gonadların gelişimini başlatmak üzere bu farklanmamış dokuya kolonlar halinde invaze olur. Bu yapı, primitif seks kordonları olarak adlandırılır. Epitelyal kordonlar, gonadın iç medulla ve dış korteks kısımlarını oluşturmak üzere gonadal mezenşim içine doğru büyür. Gelişimin 7. haftasına kadar her iki cinsiyet için ortak bir gonad yapısı vardır. Ancak 7. haftadan itibaren gonadlarda, seks kordonu hücrelerindeki Y kromozomunda bulunan SRY geninin varlığına bağlı olarak önemli morfolojik değişiklikler meydana gelir. Erkek bireylerde, bu genin etkisiyle korteks gerilerken, medulla testis yapısını oluşturur. Dişi bireylerde ise korteks ovaryumu meydana getirirken, medulla geriler (5,7,8,9,10).

Primordial gonadal kabartılar, alt torasik ve üst lomber bölgelerde gelişir ve farklanmamış mezenkimal dokudan köken alır. Bu kabartılar, gametogenez süreci boyunca erkek ve dişi gamet hücrelerinin gelişimini sağlayan yapıların temelini oluşturur. İlerleyen süreçte hücrel farklılaşma ile bu yapılar olgun gamet hücrelerine dönüşür (10).



Şekil 1. Gametogenez (8)

3.2.Spermatogenez

Spermatogonial kök hücrelerden olgun sperm hücrelerine kadar uzanan hücre farklılaşma sürecine spermatogenez denir. Spermatogenez, testisin tübüler kompartmanında gerçekleşen ve temel işlevi olan bir dizi hücrel farklılaşma sürecini kapsar. Süreç kişiden kişiye değişmekle birlikte, ortalama olarak 74 gün sürer ve günlük yaklaşık 100 milyon sperm üretilir (9). Skrotumun konumu nedeniyle, spermatogenez abdominal ısıdan 1-2°C daha düşük bir sıcaklıkta gerçekleşir (11).

Spermatogenez, erkek bireylerde genellikle 12-14 yaş arasında ergenliğe girişle başlar, yaşam boyunca devam eder ancak yaşla birlikte olumsuz etkilenebilir. Fetal dönemde testisin seminifer tübüllerinde bulunan spermatogonyal hücreler aktif değildir. Puberte öncesinde seks kordonları boşalarak seminifer tübüllere dönüşür ve bu sırada PGH’ler (primordial germ hücreleri) spermatogonyum hücrelerine farklılaşır.

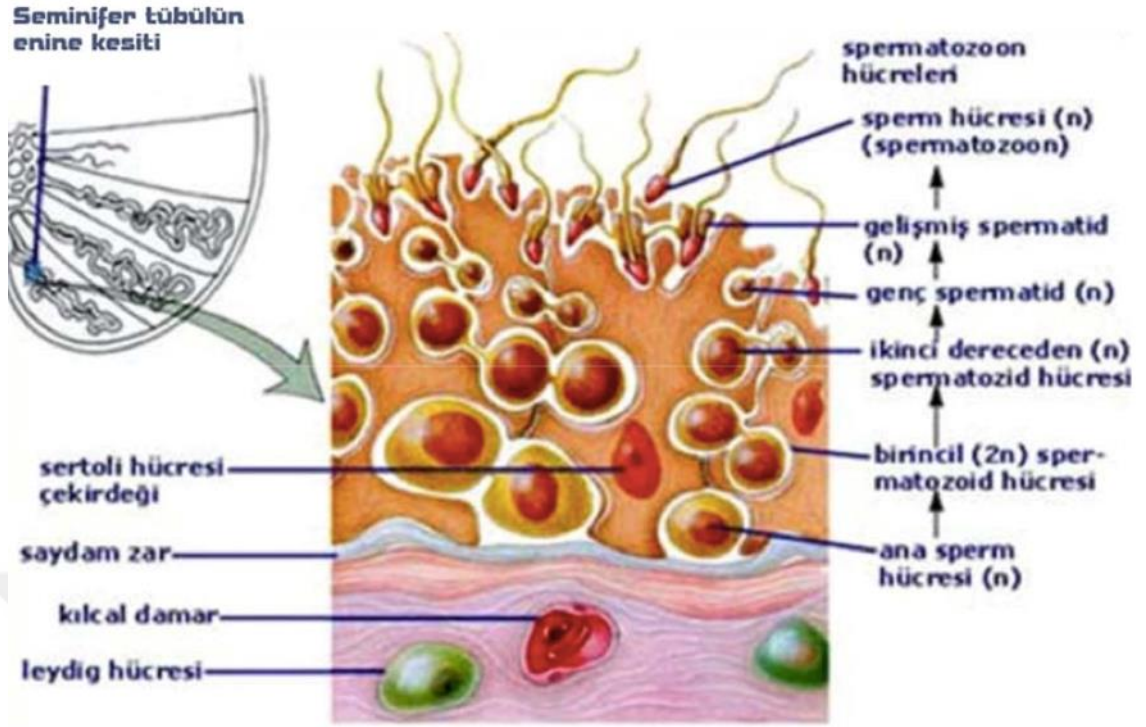
Spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazal membranına yerleşmiş, intersellüler bağlantılarla birbirine bağlı büyük, yuvarlak ve oval çekirdekli hücrelerdir. Bu hücreler, Sertoli hücreleriyle komşuluk yapar. Sertoli hücreleri, birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlı olup kan-testis bariyerini oluşturur. Bu bariyer, seminifer tübül lümenine kan kaynaklı antikör gibi zararlı yapıların geçişini engelleyerek sperm hücrelerini korur.

Bazal membran üzerinde üç tip spermatogonyum hücresi bulunmaktadır:

- Koyu Tip A Spermatogonyumlar: En az farklılaşmış hücre tipidir. Sürekli olarak mitoz geçirerek kendilerini yeniler. Bazıları, soluk tip A spermatogonyumlara, ardından B tipi spermatogonyumlara dönüşür.
- Soluk Tip A Spermatogonyumlar: Spermatositlerin oluşumu için ara basamaktır.
- B Tipi Spermatogonyumlar: Mayoz bölünmeye girerek spermatositleri meydana getirir (5,6,9).

Spermatogenez süreci, tanımlama kolaylığı açısından üç aşamada incelenir:

- Spermatositogenez (Proliferasyon): Spermatogonyal hücrelerin mitoz geçirerek çoğalması.
- Mayoz (Redüksiyon Bölünmesi): Diploid spermatositlerin haploid hücrelere dönüşümü.
- Spermiogenez (Farklılaşma): Haploid hücrelerin olgun sperm hücrelerine dönüşümü.



Şekil 2. Spermatogenezin oluşum aşamaları (22)

3.2.1. Spermatositogenezis

Spermatositogenezis, spermatogenezin ilk büyük aşamasıdır. Puberte öncesinde, seminifer tübül epitelinde az sayıda germ hücresi ve çok sayıda Sertoli hücresi bulunur. Puberte ile birlikte, hipotalamustan salgılanan GnRH'nin kontrolünde hipofiz ön lobundan FSH ve LH hormonları salgılanır. Bu hormonların etkisiyle, testislerde testosteron üretimi indüklenir. Testosteronun spermatositogenezis üzerindeki etkisi, testis kök hücre havuzundaki spermatogonyal hücrelerin DNA'larını mitoz bölünme yoluyla iki katına çıkarmaya başlamasını sağlar. Bu süreç sonucunda koyu tip A hücreleri ortaya çıkar.

Koyu tip A hücrelerinin bir kısmı spermatogenez için kullanılırken, diğer kısmı kök hücre olarak kalır. Kök hücreler de koyu tip A hücreleridir ve ihtiyaç duyulduğunda mitotik aktiviteyle çoğalabilirler. Spermatogenez sürecinde kullanılacak hücreler ise B tipine farklılaşmış olanlardır. Spermatogonyal kök hücreler radyasyon ve kanser kemoterapi ilaçlarına dirençliken, tip B spermatogonyum ve daha ileri spermatogenetik hücreler çevresel etkilere oldukça duyarlıdır.

Tip A spermatogonyum hücreleri, seri mitoz bölünmeler geçirerek bir hücre kümesi oluşturur. Son mitoz bölünme sonunda oluşan hücreler, B tipi spermatogonyum adını alır (6). A tipi spermatogonyumlar mitoz bölünmeye devam ederken, B tipi spermatogonyumlar özelleşir ve büyüyerek lümene daha yakın bir konuma geçer. Birkaç gelişim basamağının ardından, germinal epiteldeki en büyük germ hücresi olan primer spermatositlere dönüşürler. Primer spermatositler, 46 kromozom ve diploid (2n) DNA içerir.

Primer spermatositler, oluşumlarından kısa bir süre sonra birinci mayoz bölünmenin profazına girer. Mayozun başında, hücre DNA'sı replike edilir ve iki katına çıkar, böylece "4n" haline gelir. Birinci mayoz tamamlandığında, 23 kromozom ve 2n DNA içeren daha küçük iki hücre oluşur; bu hücrelere sekonder spermatosit denir. Sekonder spermatositler, hemen ardından mayoz II'ye girerek 23 kromozom ve n DNA içeren spermatidleri oluşturur.

Bir primer spermatosit hücresinin mayoz bölünmesi, dört spermatid oluşumuyla sonuçlanır. Bu süreç, kromozom içeriği ve DNA miktarını azaltarak spermatidlerin haploid hale gelmesini sağlar (12). Birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında DNA sentezi gerçekleşmez, bu nedenle ikinci bölünmeden sonra DNA miktarı yarıya iner ve haploid sayıdaki spermatid hücreleri oluşur. Fertilizasyon sırasında bu hücreler, diploid sayıda kromozom içeren ve yeni bir bireyin başlangıcı olan zigotun oluşumuna katkıda bulunur (9,13).

3.2.2. Spermiyogenez

Spermatid hücrelerinin farklılaşarak olgun bir sperm hücresine dönüşüm sürecine spermiyogenez denir. Spermiyogenez, spermatogenezin en son basamağıdır. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez, ancak sitozolün büyük bir kısmı ile spermin genetik bilgiyi oosite aktarmasında rolü olmayan organeller çıkarılır. İlk başta yuvarlak bir hücre olan spermatid, seminifer tübülün lümen kısmına bitişik bir yere yerleşmiştir. Spermiyogenez tamamlandığında, spermatid hücresi spermatozoon olarak seminifer tübül lümenine salınır. Bu aşamada spermatozoon hücresinde şu değişiklikler meydana gelir:

- Akrozom Oluşumu:

Akrozom, sperm başının ön kısmında, nukleusun hemen üzerinde bulunur. Embriyonel gelişim sırasında endoplazmik retikulum ve Golgi cisimciğinden köken alır. Fertilizasyon için gerekli olan hidrolitik enzimleri içerir. Bu enzimler arasında hyaluronidaz, nöraminidaz ve akrozin bulunur. Akrozom oluşumu, ardışık üç evreden geçer:

- ✓ Golgi Evresi
- ✓ Kep Evresi
- ✓ Akrozomal Evre

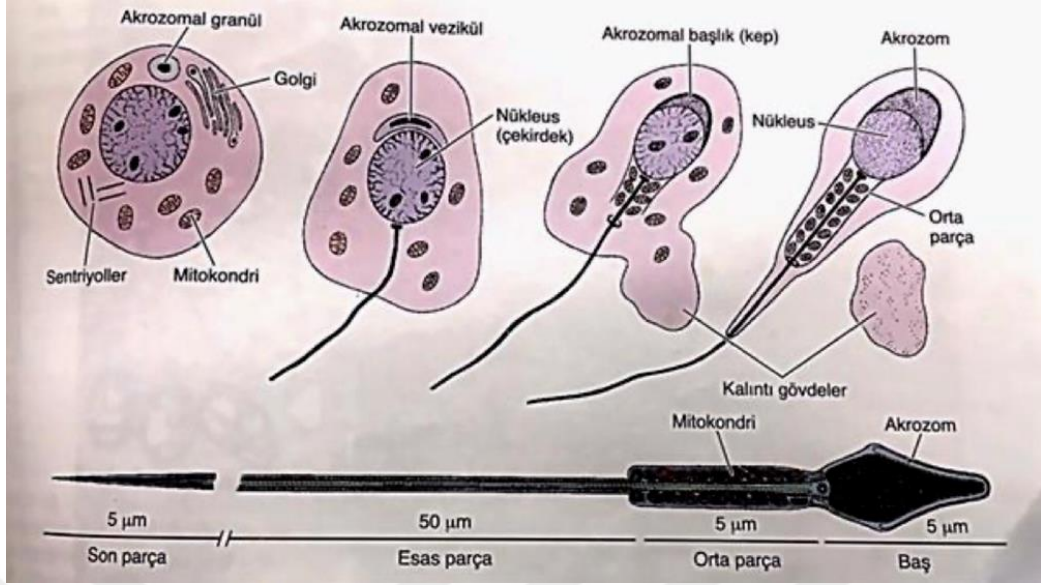
- Boyun, Orta Parça ve Kuyruğun Oluşumu:

Akrozomal kep gelişirken bir sentriyol, spermatid nukleusunun arkasına yerleşerek proksimal ve distal sentriyoller oluşur. Distal sentriyol, flagellumun merkezinde bulunan aksonemi meydana getirir. Aksonem, çift santral tübül ve 9+2'lik mikrotübüler yapıya sahiptir. Proksimal sentriyol ise spermin boyun kısmının yapısına katılır. Sitoplazmada bulunan mitokondriler, flagellumun boyun bölgesine yerleşir. Kuyruk hareketi, boyun kısmındaki mitokondrilerden sağlanan enerji ve mikrotübüllerin birbiri üzerine kayması ile gerçekleşir (4,9,14).

- Çekirdek Yoğunlaşması:

Sperm başında bulunan çekirdek, kromatin yoğunlaşmasının gerçekleştiği bölgedir. Somatik histonlar, arginin ve lizin zengin protaminlerle yer değiştirir. Bu değişim, sperm DNA'sını stabilize eder ve koruma sağlar (14).

Spermiyogenez tamamlandığında spermatozoon hücresi baş, boyun ve kuyruk kısımlarından oluşur ve toplam uzunluğu yaklaşık 60 mikrometredir (14). Spermatogonyumun bu aşamalardan geçerek olgun bir spermatozoon haline gelmesi yaklaşık 74 gün sürmektedir (9).



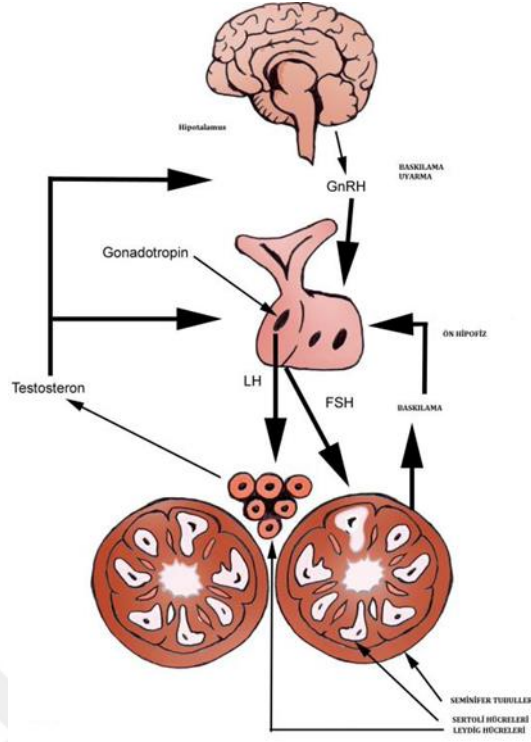
Şekil 3. Spermiyogenezin şematik çizimi (13)

3.2.3. Spermatogenezin Hormonal Düzenlenmesi

Hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın temel görevi, reproduktif performans için gerekli seks hormonlarının fizyolojik düzeylerde üretimini sağlamak ve testiküler fonksiyonların düzenli çalışmasını desteklemektir.

Hipotalamustan yaklaşık 90 dakikada bir salgılanan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH), hipofiz ön lobundan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salınımını kontrol eder.

Lipoprotein yapısında olan FSH ve LH, gonadların gelişimi, olgunlaşması ve işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Germ hücrelerinde LH ve FSH reseptörleri bulunmaz; ancak Sertoli hücrelerinden germ hücrelerine hormonal sinyalleri ileten yoğun bir iletişim sistemi mevcuttur. LH, Leydig hücrelerinden testosteron sentezini uyarırken, FSH pubertal gelişim süresince Sertoli hücrelerinin proliferasyonu için gereklidir (8,13,20,21).



Şekil 4. Hipotalamus-hipofizer-gonadal aksın şematik görüntüsü (23)

3.2.4. Epididimal Matürasyon

Spermatozoonların motilite kazanma süreci epididimde gerçekleşir. Kıvrımlı bir yapıya sahip olan epididim, yassı epitel hücreleri ile kaplıdır. Epididimal matürasyon sırasında, sperm kuyruğundaki yapısal değişiklikler esas olarak motiliteyi artırmaya yöneliktir.

Bu süreçte, sperm kuyruğundaki dış fibriller, disülfid bağlarının oluşumu ile daha kararlı bir yapıya kavuşur ve kuyruk hareketleri etkin hale gelir. Epididimal matürasyon sırasında yalnızca sperm hareket yeteneği geliştirilmekle kalmaz, aynı zamanda fertilizasyon için gerekli olan sperm başının zona pellucida'ya bağlanmasını sağlayan nukleus kromatin stabilizasyonu da tamamlanır.

Sperm membranındaki lipit ve glikoproteinlerde meydana gelen değişiklikler, spermin oositi tanınmasını ve onunla bağlanmasını mümkün kılarak fertilizasyon için uygun ortam hazırlar (5,14).

3.2.5. Kapasitasyon

Kapasitasyon, sperm hücresinin dişi üreme kanallarında fertilizasyon için uygun hale gelmesi ve aktifleşmesi sürecidir. Bu sürecin gerçekleşebilmesi için sperm ile dişi üreme sistemi arasında yakın bir etkileşim gereklidir (15). Dişi üreme kanalında yaklaşık yedi saat süren kapasitasyon, genellikle uterus veya tuba uterina boyunca ilerlerken, buralardan salgılanan maddelerin etkisiyle gerçekleşir. Kapasitasyon sırasında oluşan yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, spermin zona pellucida reseptörlerine bağlanma yeteneğini ve afinitesini artırır (16).

Kapasitasyon sürecinde sperm hücreleri, hiperaktivasyon adı verilen bir dizi hareket değişikliğine uğrar (17) ve akrozom reaksiyonu (akrozomal ekzositoz) gerçekleştirmeye hazır hale gelir. Hiperaktivasyon, kuyruğun daha geniş bir salınım açısıyla kırbaç benzeri hareketler yapması ve bu sayede güçlü yüzme kuvveti oluşturması olarak tanımlanır (18). Bu süreç, sperm kuyruğunun plazma membranındaki CatSper (sperm katyon kanalları) adı verilen transmembran Ca^{+2} kanallarından ani Ca^{+2} girişi ile tetiklenir. Böylece sperm, tuba uterinanın viskoz ortamında daha hızlı hareket edebilir ve oositi çevreleyen kümülüs ooforus ile zona pellucida bariyerlerini geçmeleri kolaylaşır (15). Yalnızca kapasitasyon sürecini tamamlamış sperm, oosite ulaşabilir.

Kapasitasyon sırasında sperm hücresinde dört önemli biyokimyasal değişiklik meydana gelir:

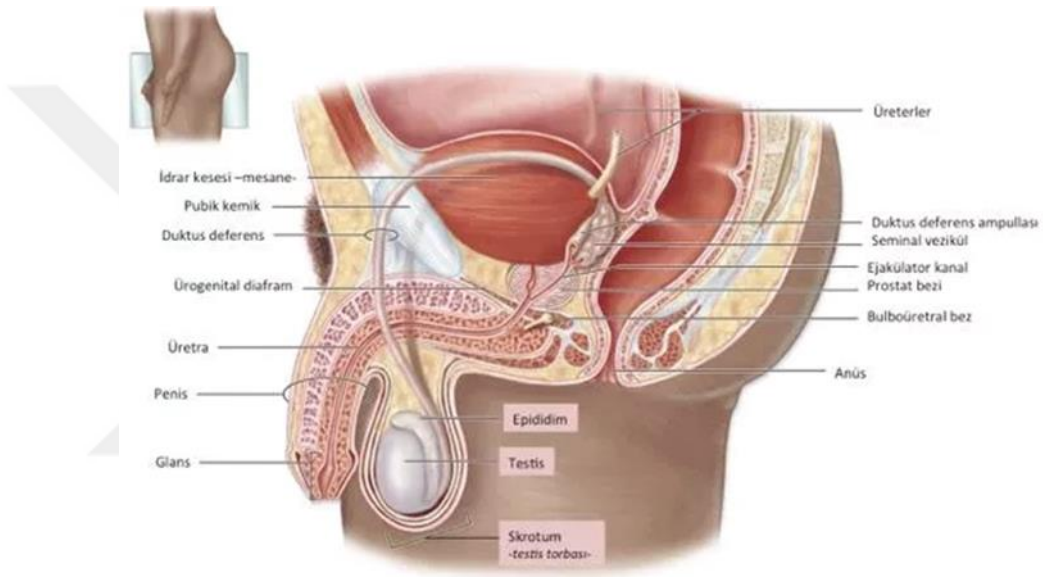
- cAMP'ye bağlı fosforilasyon reseptörlerinin aktive edilmesi,
- Plazma membranının kimyasal yapısının yenilenmesi,
- Plazma membranının hiperpolarizasyonu,
- Plazma membranının iyon geçirgenliğinin düzenlenmesi (19).

3.3. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penis olmak üzere dört temel yapıdan oluşur. Erkek üreme sistemindeki her bir yapının kendine özgü işlevleri bulunmaktadır. Testislerin temel görevi, spermatozoon üretimi ve erkeklik hormonlarının sentezlenmesidir.

Genital kanallar ve yardımcı bezler, olgunlaşan sperm hücrelerinin düz kasların yardımıyla dışarıya iletilmesini sağlar. Aynı zamanda, yardımcı bezlerden salgılanan sıvılar, spermatozoonların beslenme ihtiyacını karşılar. Spermatozoonlar, yardımcı bezlerin salgılarıyla birlikte, penis aracılığıyla dışı üreme sistemine iletilen semeni oluşturur.

Testislerde üretilen başlıca hormon testosterondur. Testosteronun yanı sıra dihidroksitestosteron, erkek fizyolojisinin devamlılığı için gerekli olan diğer önemli bir hormondur (24).



Şekil 5. erkek genital sistemi (24)

3.3.1. Testisler

Testisler, yoğun bağ dokusu içeren kalın bir tabaka olan tunica albuginea ile kaplanmıştır. Tunica albuginea, testisin arka bölümünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Bu bölgeden testis içine doğru uzanan fibröz yapılar, septum olarak adlandırılır ve bu septumlar testisi yaklaşık 250 piramidal bölmeye ayırır. Ancak bu bölmeler birbirinden tamamen izole değildir ve birbiriyle bağlantılıdır.

Her lobülde, gevşek bağ dokusuyla çevrili 1 ila 4 adet seminifer tübül bulunur. Bu bağ dokusu, bol miktarda kan damarları, lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreler olarak bilinen Leydig hücrelerini içerir. Seminifer tübüller, erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken; interstisyel hücreler testis androjenlerini salgılar.

Embriyolojik gelişim sırasında testisler, skrotuma doğru göç eder ve bu süreçte tunica vaginalis adı verilen seröz bir yapı, peritondan türetilerek skrotum içine taşınır (25,26).

3.3.2. Seminifer tübüller

Spermatozoonlar, seminifer tübüllerde üretilmektedir. Klinik çalışmalar, erişkin erkeklerde spermatozoon üretim hızının günlük yaklaşık 2×10^6 olduğunu göstermektedir. Her testis, 250 ila 1000 arasında seminifer tübül içermektedir. Seminifer tübüller, karmaşık bir yapıya sahip olup çok katlı epitel ile döşenmiş, 150-200 μm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Erişkin sağlıklı bir erkek testisindeki toplam seminifer tübül uzunluğu yaklaşık 250 metredir.

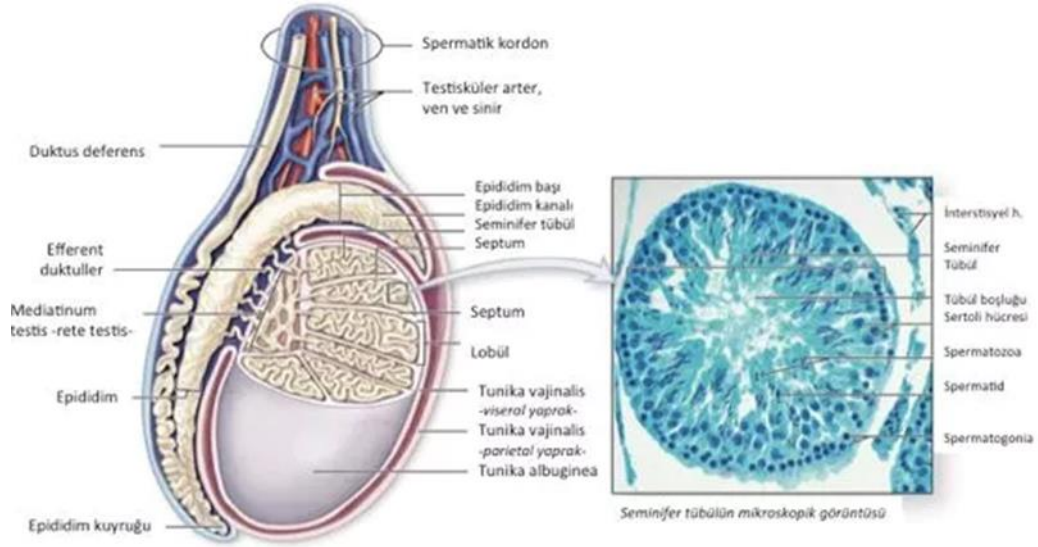
Seminifer tübüller, kıvrımlı bir yapı sergileyip uçlara doğru lümeni daralarak düz tübüller veya tubuli recti olarak adlandırılan kısa segmentlere dönüşür. Tubuli recti, seminifer tübülleri rete testis adı verilen, epitel ile kaplı bir labirente bağlar. Rete testis kanalları, epididimin baş kısmına 10-20 adet ductuli efferentes aracılığıyla ulaşır. Seminifer tübüller, fibröz bağ dokusu bir kılıf, bazal lamina ve çok katmanlı seminifer epitelden oluşur.

Seminifer tübülleri çevreleyen fibröz tunica propria, 3 ila 5 fibroblast katmanından oluşur. En içte, bazal laminaya yapışık olan tabaka, miyoid hücreler içerir. Seminifer tübüller arasındaki boşlukların büyük bir kısmı ise Leydig hücreleri ile doludur (24,25,26).

Seminifer epitel iki tip hücre içerir:

- Sertoli Hücreleri (Destek Hücreleri): Testiste destek görevini üstlenir.
- Spermatogenez Hücreleri: 4 ila 8 tabakadan oluşan bu hücreler, spermatozoon üretiminden sorumludur. Spermatozoon üretim sürecine spermatogenez denir.

Spermatogenez, karmaşık mitoz ve mayoz bölünmeleri içeren bir süreçtir ve hücrelerin olgun spermatozoonlara dönüşmesini sağlar. Bu dönüşüm sürecinin son aşamasına ise spermiogenez adı verilir (24,25).



Şekil 6. Seminifer Tübül (24)

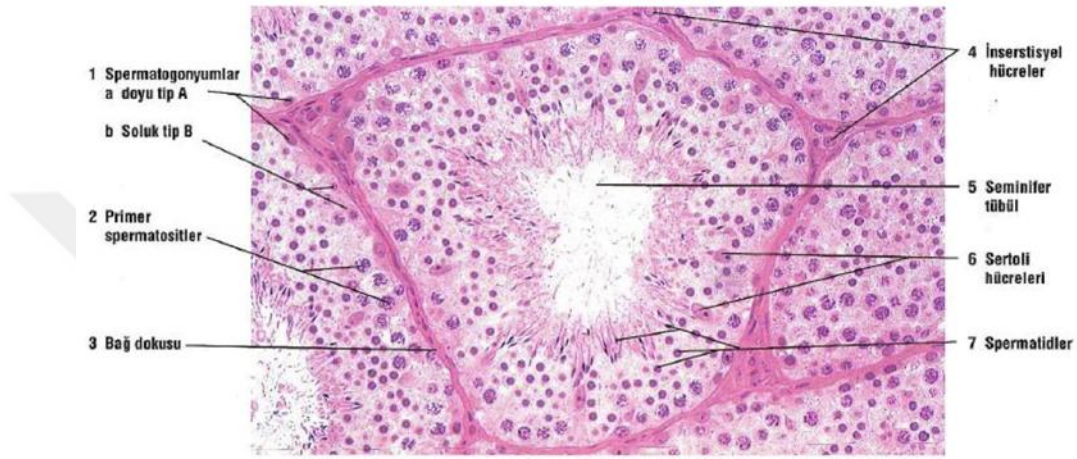
3.3.3. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, testisin işlevselliği açısından kritik öneme sahip olup spermatogenez sürecinde hücreleri çevreleyen uzun, piramidal yapıya sahip hücrelerdir. Bu hücreler, bazal kısımlarından sıkıca bazal laminaya tutunmuş olup üst kısımları seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde Sertoli hücrelerinin sınırları tam olarak belirgin değildir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, Sertoli hücreleri hakkında daha fazla bilgi sağlamış ve bu hücrelerde çok sayıda düz endoplazmik retikulum (dER), az miktarda granüllü endoplazmik retikulum (ER), yoğun mitokondri, lizozom ve iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi bulunduğunu göstermiştir. Nadir olarak, sitoplazmanın alt kısmında Charcot-Böttcher kristali adı verilen kristalloid yapılar gözlenmiştir. Bu yapıların, lipoprotein reseptör (CLA-1) protein kümesinden oluştuğu ve Sertoli hücrelerindeki lipid transportu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Sertoli hücreleri, bazolateral yüzeylerinden birbirine sıkıca bağlanarak kan-testis bariyerini oluşturur. Ayrıca, bu hücreler arasında bulunan gap junction bağlantıları sayesinde iyon ve kimyasal maddelerin hücreler arası alışverişi sağlanır.

Sertoli hücrelerinin başlıca görevleri şunlardır:

- Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesi.
- Fagositoz ile spermatogenez sırasında atılan artık cisimlerin ve spermatidlerin Sertoli hücrelerinin lizozomları tarafından uzaklaştırılması.
- Anti-Müllerian Hormon (AMH) salgılanması.
- Kan-testis bariyerinin oluşturulması.
- Hipofizde FSH üretimini İnhibin B salgılayarak baskılaması (26,27).

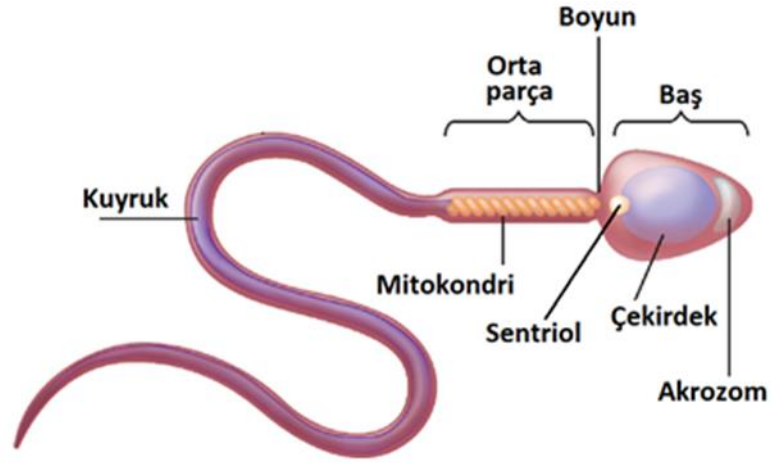


Şekil 7. Seminifer Tübül Hücreleri (28).

3.3.4. Olgun sperm

Yaklaşık 60 µm uzunluğundaki olgun sperm, baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç ana bölümden oluşur. Baş kısmı, yoğunlaşmış bir çekirdek ve ön kenarlarında akrozom içeren bir yapıdan oluşur. Akrozom, hyaluronidaz enzimi içerir. Spermin oosit membranı ile temas etmesi sonucu akrozom reaksiyonları gerçekleşir ve bu reaksiyonlarla salgılanan akrozomal enzimler, özellikle hyaluronidaz, fertilizasyonun gerçekleşmesi için hayati öneme sahiptir.

Boyun bölgesinde bulunan mitokondriyal kılıf, spermin kuyruk hareketlerinin enerji ihtiyacını karşılar. Kuyruk, merkezinde bir çift ve çevresinde dokuz çift flaman içeren bir yapı sergiler (24,29,30).



Şekil 8. Olgun sperm (27)

3.4. Testis İçin Kanallar

Testis için genital kanallar

- Tubuli resti
- Rete Testis
- Duktuli efferentstir.

Bu kanalların ana görevi seminifer tübüllerden gelen spermatozoonları da içeren semeni duktus epididimise taşımaktır.

3.4.1. Genital boşaltım kanalları

Testislerde üretilen spermatozoonları penise taşıyan kanallar şunlardır:

- Duktus epididimis
- Vas deferens (Duktus deferens)
- Üretra

Duktus Epididimis; Duktus epididimis, yaklaşık 4-6 metre uzunluğunda, kıvrımlı bir yapıya sahiptir. Bu uzun kanal, çevresindeki bağ dokusu ve kan damarlarıyla birlikte epididimin gövdesini ve kuyruğunu oluşturur. Duktus epididimis, yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşenmiştir. Epitelyal hücrelerin yüzeyinde, stereosilya adı verilen uzun mikrovilluslar bulunur.

Vas Deferens (Duktus Deferens); Vas deferens, kalın bir kas tabakasıyla çevrili düz bir kanaldır ve prostat yoluyla üretraya açılır. Kanal, stereosilyalara sahip yalancı çok katlı prizmatik epitel ile kaplıdır. Kalın düz kas katmanları, ejakülasyon sırasında peristaltik kasılmalar oluşturarak spermatozoonların kuvvetli bir şekilde dışarıya atılmasını sağlar (24,31,25,27).

Üretra; Yaklaşık 16 cm uzunluğundaki üretra, penisin ucuna kadar uzanır. İçinde bulunan spiral yapılar, idrar akışının geniş bir çapta gerçekleşmesini sağlar. Üretra epiteli, mesaneden çıkışta geçiş epitel hücreleri ile başlar; daha ileride çok katlı silindirik epitel hücrelerine dönüşür ve dış meatusta çok katlı yassı epitel hücrelerine yerini bırakır.

Üretral bezler;mukus salgılayarak epiteli idrarın tahriş edici etkisinden korur. Üretra, konumuna göre dört bölgeye ayrılır:

3.4.2. Yardımcı Genital Bezler

Erkeklerde üreme işlevinin gerçekleşebilmesin sağlayan salgılar yardımcı genital beler tarafından üretilir.

Bu bezler;

- seminal veziküller
- prostat bezi
- bulboüretral bezlerdir.

Seminal veziküller ; uzunlukları yaklaşık 15cm olan 2 adet kıvrımlı kanaldır. Salgılayıcı granüllerden zengin, yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşeli bir mukozası vardır. Ana görevi viskoz, sarımsı renge, spermatozoonları aktive eden sitrat, inozitol,prostaglandin ve bir dizi protein içeren bir salgı üretmesidir. Seminal veziküllerdeki salgının salgılanma süreçlerindeki işlevselliği testosteron düzeyine bağlıdır.

Prostat; yaklaşık olarak 30-50 adet dallanmış tübüloalveoler bezlerden oluşur. Bu tübüloalveoler bezlerin kanalları prostatı üretraya boşalır. Prostat bezi prostat sıvısını

üretir ve ejakülasyon sırasında kuvvetlice salgılama gücü oluşturmak üzere bunu biriktirir. Prostat yapısı ve işlevi testosteron düzeyine bağlıdır.

Bülboüretal Bezler (Cowper Bezleri); Çapı yaklaşık 3-5 mm olan ve üretranın mebranöz kısmının proksimaline yerleşerek buraya sağı yapan bezlerdir. Mukoz salgılayan tek katlı silindirik epitel ile döşeli tübüloalveoler bezlerdir. yapısında düz kas bulunan salgısı kayganlaştırıcı işlev gören berrak mukustur.(24,31, 25,32)

3.4.2.1. Seminal sıvı (Semen)

Semen, diğer adıyla seminal sıvı, sperm hücreleri ve bu hücrelerin içinde bulunduğu sıvıdan oluşur. Seminal sıvı, yardımcı genital bezlerden salgılanır. Opak beyazımsı bir görünüme sahip olan semen, sağlıklı ve fertil erkeklerde 1 ml'sinde yaklaşık 100 milyon sperm içermektedir. Bu spermilerin yaklaşık %20'si morfolojik olarak anormal, %25'i ise immotil özellik göstermektedir.

Sağlıklı bir erkekte ejakulat miktarı ortalama 3 ml civarındadır. Semen atılımı belirli bir sıralamayla gerçekleşir. Ereksiyon sırasında bülboüretal bezler mukozal salgılar salgılayarak kavernoöz üretrayı kayganlaştırır. Gerçek ejakülasyon esnasında önce prostat salgıları salınır. Bu aşamayı, duktus epididimis ve duktus deferens duvarlarındaki kasların kasılmasıyla spermilerin dışarıya itilmesi izler. Son olarak, besleyici maddeler içeren seminal sıvı salgısı da ejakulat bileşimine eklenir (33).

3.5. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebelik oluşmaması durumunda çiftlere infertilite tanısı konur. İnfertilite, günümüzde toplum genelinde giderek artan bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Yapılan araştırmalar, infertil çiftlerin %8-12'sinde bu durumun mevcut olduğunu göstermektedir (34).

1990-2017 yılları arasında gerçekleştirilen araştırmalar, infertilite prevalansının kadınlarda yıllık %0.370, erkeklerde ise %0.291 oranında arttığını ortaya koymuştur (35). Erkek infertilitesi, dünya genelinde erkeklerin %7-12'sini etkileyen ve üreme sistemi üzerindeki karmaşıklığı nedeniyle geniş çapta incelenen bir konudur. Erkek infertilitesine neden olan faktörler çeşitlidir. Bununla birlikte, infertil çiftlerin %40'ında açıklanamayan infertilite tanısı konulmuştur. Erkek infertilitesinin nedenleri arasında doğumsal veya sonradan edinilmiş ürogenital anomaliler, hormonal

bozukluklar, enfeksiyonlar, varikosel, endokrin sorunlar, genetik anomaliler, immünolojik faktörler, fiziksel travmalar, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, çevresel etkiler ve yaşam tarzı yer almaktadır. Erkek infertilitesi, genellikle obstrüktif (tıkanıklığa bağlı) ve non-obstrüktif (tıkanıklık dışı) nedenler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (36).

İnfertilite vakalarının %55'inin sperm anormalliklerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Semen analizleri, sperm sayısındaki azalma (oligozoospermi), hareket kabiliyetindeki düşüklük (astenozoospermi), şekil bozuklukları (teratozoospermi) ve sperm eksikliği (azoospermi) gibi sorunların yaygın olduğunu göstermektedir (37). Azoospermi vakalarının %65'i, non-obstrüktif azoospermi (NOA) olarak adlandırılan durumu içermektedir. Geriye kalan %35 ise obstrüktif azoospermi (OA) grubuna girmektedir.

OA vakalarında, spermatogenez normal şekilde devam eder ancak tıkanıklık veya anatomik sorunlar nedeniyle sperm ejak lata ulaşamaz. Bu durumun nedenleri arasında bilateral vas deferensin yokluğu, ejakülatuar ve epididimal kanal tıkanıklıkları, seminal vezikül anomalileri, enfeksiyonlar ya da vazektomi gibi cerrahi müdahaleler yer alır. OA tedavisinde, tıkanıklığın kaynağına yönelik cerrahi müdahaleler önerilir. Cerrahi başarısız olduğunda yardımcı üreme teknikleri (YÜT) kullanılabilir.

Non-obstrüktif azoospermi (NOA) ise genellikle spermatogenezdeki ciddi sorunlarla ilişkilidir ve sıklıkla testiküler fonksiyon bozukluğundan kaynaklanır. NOA, çoğunlukla idiopatik bir patoloji olarak görülmektedir. Bu vakalarda yardımcı üreme teknikleri, temel tedavi yöntemidir (38).

3.5.1. Obstrüktif infertilitenin nedenleri

Vazektomi; Erkek bireylerde kalıcı doğum kontrol yöntemi olarak uygulanan düşük riskli bir cerrahi işlem olan vazektomi, azoospermiye neden olabilir. Vazektomiden sonra yaklaşık 20 yıl içinde sperm üretiminde belirgin bir azalma görülmektedir. Tıkanıklığı gidermek için cerrahi geri dönüşüm uygulanan bireylerin yalnızca %6'sında doğurganlık fonksiyonları eski seviyelerine yaklaşmaktadır. Bununla birlikte, vazektomi sonrası epididimal tıkanıklık gibi yan etkiler gelişebilir (39).

Ejakülatuar Kanal Tıkanıklığı; İnfertilite tanısı konmuş erkeklerin yaklaşık %5’inde ejakülatuar kanal tıkanıklığı bulunmaktadır. Bu duruma neden olan başlıca faktörler arasında prostat kistleri, prostatit, seminal vezikülit kaynaklı fibrozis veya seminal vezikül taşları yer alır (39,41). Tam tıkanıklık durumunda semen örneklerinde sperm bulunmazken, kısmi tıkanıklıklarda az sayıda sperm tespit edilebilir (40, 41).

Epididimal Tıkanıklık; Epididimis, spermin olgunlaşması ve depolanmasında önemli bir rol oynar. Epididimiste meydana gelen enfeksiyonlar, tıkanıklığa neden olarak sperm fonksiyonlarını olumsuz etkileyebilir ve ciddi üreme problemlerine yol açabilir (42, 43).

3.5.2. Non-obstrüktif infertilite nedenleri

Kriptorşidizm; Yenidoğanların %2-6’sında görülen ve halk arasında inmemiş testis olarak bilinen kriptorşidizm, infertil erkeklerin %10’unu etkiler (40,41,43). Tek taraflı kriptorşidizmde spermatogenez devam etmesine rağmen fertilite düşüktür. Çift taraflı kriptorşidizm ise azoospermiye neden olabilir (44).

Testis Torsiyonu; Spermatik kordonun dönmesi sonucu kan akışının azalmasıyla ortaya çıkan bu durum, şiddetli ağrı ve testis iskemisi ile sonuçlanır. Çocukluk ve ergenlik dönemlerinde daha sık görülür ve sperm parametreleri üzerinde olumsuz etkiler yaratır (45,46).

Testis Travması; Kazalar veya yaralanmalar testiste hasara yol açarak infertiliteye neden olabilir. Bu durum, kan-testis bariyerini bozarak anti-sperm antikorlarının oluşumuna neden olur (47,48).

Testis Kanseri; Genetik ve epigenetik faktörlere bağlı olarak gelişen testis kanseri, özellikle 30-35 yaş arası erkeklerde sık görülür. Tedavi sırasında uygulanan kemoterapi ve radyoterapi, üreme sağlığını ciddi şekilde olumsuz etkileyebilir (49,50).

Genetik Faktörler; Klinefelter sendromu, kromozomal anomaliler ve Y kromozomu delesyonları gibi genetik bozukluklar, erkek infertilitesinde önemli bir yere sahiptir (51).

Hormonal Dengesizlik; Hipotalamus-hipofiz-gonadal aksındaki sorunlar, erkek üreme sistemini olumsuz etkileyebilir. LH, FSH ve testosteron düzeylerindeki dengesizlikler infertiliteye yol açabilir (52,53).

Varikosel; Skrotal damarların genişlemesi ile karakterize edilen bu durum, erkeklerin %15'inde görülmekte olup erkek infertilitesinde önde gelen nedenler arasında yer alır (55,56).

İmmünolojik İnfertilite; Anti-sperm antikorları, spermilerin hareket kabiliyetini ve fertilizasyon yeteneklerini olumsuz yönde etkileyebilir (59).

3.5.3. Erkek infertilitesinin diğer nedenleri

Yaş; İlerleyen yaşla birlikte sperm parametrelerinde bozulmalar meydana gelir ve erektil disfonksiyon daha sık görülür (60).

Tütün Kullanımı; Sigara tüketimi, sperm sayısını ve kalitesini olumsuz etkileyen reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olur (62).

Obezite; Hormon dengelerinde bozulmalara ve testiküler sıcaklıkta artışa yol açarak infertilite riskini artırır (63,64).

Kimyasal Ajanlar; Kurşun ve kadmiyum gibi ağır metaller, sperm fonksiyonlarını olumsuz etkiler (66,67).

Aşırı Sıcak; Yüksek sıcaklıklar spermatogenezi bozarak sperm DNA'sında hasara neden olabilir (68,69).

Oksidatif Stres; Reaktif oksijen türleri, sperm membranlarına zarar vererek infertiliteye yol açabilir (70,71).

3.5.4. Erkek İnfertilitesi Tanı Yöntemleri

Erkek infertilitesinin tanısında, ayrıntılı bir tıbbi öykü, fiziksel muayene, semen analizi ve hormonal değerlendirme gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, kromozomal analizler ve sperm fonksiyon testleri gibi ileri tanı yöntemleri de önemli bir yer tutar (73).

3.5.5. Anamnez

Tanı sürecinde hastanın geçmişteki sağlık durumları, geçirdiği cerrahi müdahaleler ve cinsel yolla bulaşan hastalıklar gibi bilgiler dikkatle incelenmelidir. Ayrıca hastanın yaşam tarzı, çevresel maruziyetleri, mesleki risk faktörleri ve kullanılan ilaçlar da sorgulanmalıdır (74,75).

3.5.6. Fiziksel Muayene

Fiziksel muayene, varikosel gibi yaygın sorunların teşhisinde kritik bir rol oynar. Bunun yanında, hormonal dengesizlikler veya malignite belirtileri de fiziksel incelemeler sırasında tespit edilebilir. Testislerin büyüklüğü, kıvamı, yerleşimi ve epididim yapısı gibi özelliklerin değerlendirilmesi fiziksel muayenenin temel unsurları arasındadır (76-79).

3.5.7. Semen Analizi

Semen analizi, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde en sık kullanılan testlerden biridir. Bu test, sperm üretim kapasitesini ve fonksiyonlarını ölçmeyi amaçlar ve hem ürologlar hem de kadın doğum uzmanları tarafından yaygın şekilde uygulanır.

Semen analizi yapılacak hastalara genellikle 3-5 günlük bir cinsel perhiz önerilir. Mastürbasyon yoluyla elde edilen semen örneği, kontaminasyondan korunarak laboratuvara ulaştırılır. Laboratuvarda örnek, 37°C’de yaklaşık 15 dakika bekletilerek sıvılaşması (likefaksiyon) sağlanır. Sıvılaşmış semen örneği makroskopik ve mikroskopik olarak analiz edilir.

Analiz sırasında değerlendirilen başlıca parametreler şunlardır:

- Sperm Sayısı: Sperm yoğunluğunun değerlendirilmesi.
- Hareketlilik (Motilite): Sperm hücrelerinin hareket etme yeteneği.
- Canlılık (Vitalite): Sperm hücrelerinin yaşam oranı.
- Morfoloji: Sperm hücrelerinin yapısal özellikleri ve normal görünümlü spermilerin oranı (80).

3.5.7.1. Makroskobik Değerlendirme

İnfertil bireylerden alınan semen örnekleri, ilk aşamada rengi, kokusu, miktarı, likefaksiyon durumu, viskozitesi ve pH değeri açısından analiz edilir.

3.5.7.1.1. Likefaksiyon

Semen örneği genellikle pıhtılaşmış (yarı katı) halde alınır. Örnek, inkübatörde bekletildiğinde, birkaç dakika içinde pıhtı çözülmeye başlar. Semen, 15-60 dakika içinde homojen ve akışkan hale gelir. Likefaksiyon bu süre içinde gerçekleşmezse, analiz raporuna not düşülmelidir. Gecikmiş durumlarda mekanik veya enzimatik yöntemlerle müdahale edilebilir. Mekanik yöntemde pipet kullanılarak karıştırma yapılırken, enzimatik yöntemde proteaz enzimi uygulanır (80).

3.5.7.1.2. Viskozite

Likefaksiyon tamamlandıktan sonra semen viskozitesi ölçülür. Pipet yardımıyla alınan örnek bir damla olarak bırakılır ve pipet ile damla arasındaki ipliksi yapının uzunluğu değerlendirilir. Normal viskozitede, damlalar seri şekilde düşerken; anormal viskozitede ipliksi yapılar oluşur. Bu iplikçikler yaklaşık 2 cm uzunluğa ulaşabilir (80). Toplam sperm sayısını belirlemek için semen hacminin doğru ölçülmesi gereklidir. Bu işlem, geniş ağızlı ölçüm silindiri veya serolojik pipet yardımıyla yapılır (80).

3.5.7.1.3. Semen pH Değeri

Semen pH'sı, sıvı içeriğinin pH değerini yansıtır. Örnek alındıktan sonra, 30 dakika içinde pH ölçümü yapılmalıdır. Bu işlem, 6.0-10.0 aralığında ölçüm yapan pH kağıtları ile gerçekleştirilir. Normal semen pH değeri 7.2'nin üzerinde olmalıdır (80).

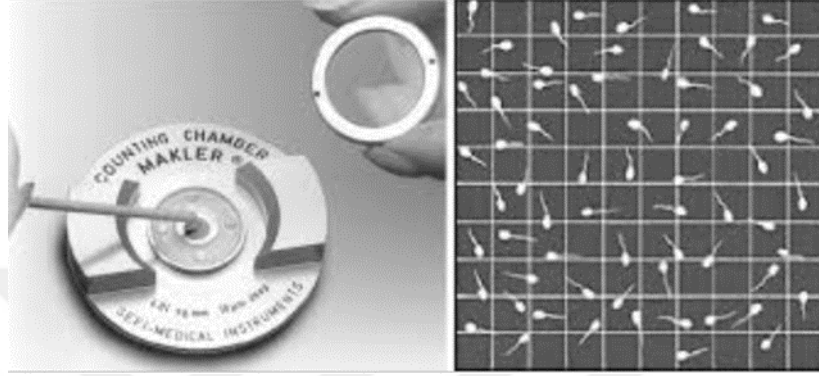
3.5.7.2. Mikroskobik İnceleme

Spermin mikroskobik analizi, faz kontrast mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilir. Bu analiz sırasında sperm sayısı, hareketliliği, canlılığı ve morfolojisi değerlendirilir.

3.5.7.2.1. Sperm Sayısı

Likefiye edilmiş semen örneği pipet yardımıyla alınarak Makler sayım kamerasına damlatılır ve faz kontrast mikroskobunda x20 büyütme ile incelenir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre, sperm sayısının alt sınırı mililitre başına 15×10^6 olarak belirlenmiştir. Toplam sperm sayısı ise semen hacmi ile çarpılarak hesaplanır ve WHO kriterlerine göre en az 39×10^6 olmalıdır.

Makler kamerasında spermier eřit řekilde dađıtılarak kare bařına dűřen sperm sayısı belirlenir. Kare bařına birden fazla sperm dűřmesi durumunda 10 kare analiz edilir; tek sperm dűřüyorsa 100 kare incelenir. Eđer semen ۆrneđinde sperm bulunmuyorsa, ۆrnek bir yıkama medyumunu ile karıřtırılarak santrifűj edilir ve mikroskop altında tekrar deđerlendirilir (80).



řekil 9. Makler sayım kamerası ve faz kontrast mikroskobundaki gۆrűntűsű (134).

3.5.7.2.2. Sperm Motilitesi

Makler kamerasına yerleřtirilen semen ۆrneđi, faz kontrast mikroskobu kullanılarak x20 bűyűtmede incelenir. İnceleme sırasında 200 sperm hűcresi, hareketlilik durumlarına gۆre űç kategoriye ayrılarak deđerlendirilir:

1. İleri Hareketli Spermier
2. Yerinde Hareketli Spermier
3. Hareketsiz (İmmotil) Spermier

Bu kategorilere gۆre yapılan sınıflandırma, sperm hareketliliđinin belirlenmesinde ۆnemli bir ۆlűűttűr (80).

3.5.7.2.3. Sperm Vitalitesi

Sperm vitalitesi, membran bűtűnlűđűnű deđerlendirmek için kullanılan bir testtir ve ۆzellikle ileri hareketli sperm oranının %40'ın altında olduđu durumlarda uygulanır. Bu test, Hipoozmotik řiřme (HOS) ve Eosin Y Boyamayۆntemleriyle gerçekleřtirilir.

- Eosin Y Boyama:

Bu yöntemde, membranı sağlam olan vital spermler boya almaz ve şeffaf şekilde görünür. Buna karşılık, membran bütünlüğü bozulmuş spermler boyayı sitoplazmaya alarak koyu pembe renkte görülür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre sperm vitalitesi için alt referans değeri %54'tür.

- HOS Testi: H

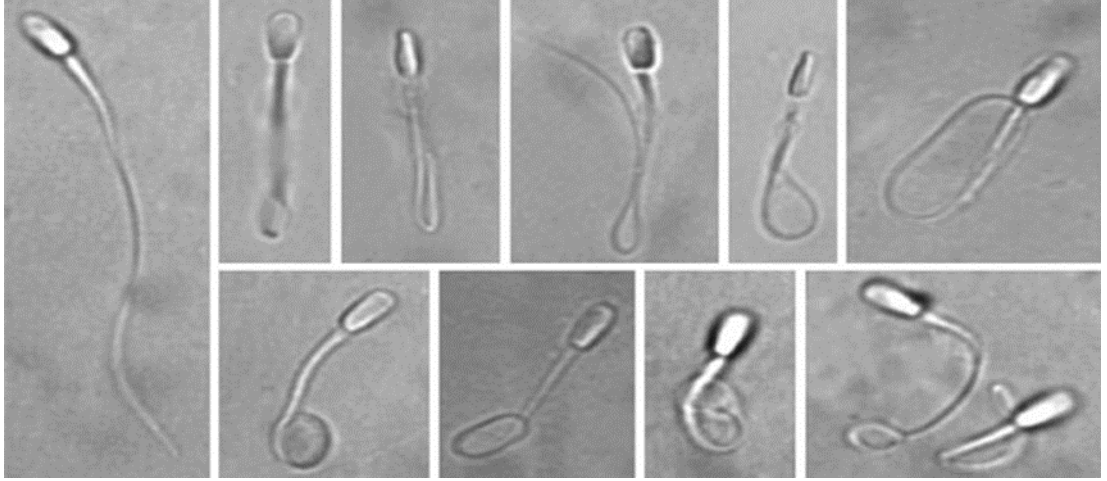
OS testi, hipotonik bir ortamda hareketsiz sperm üzerinde uygulanır ve membranı sağlam olan spermelerin şişme durumunu gözlemlemeye dayanır. Bu test, 1984 yılında Jeyendran ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmış ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından boyama yöntemlerine bir alternatif olarak önerilmiştir. HOS testi, özellikle in vitro fertilizasyon (IVF) süreçlerinde sperm seçimi için kullanılabilir.

Casper ve çalışma arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, immotil spermle gerçekleştirilen intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda (ICSI), hipoozmotik şişme testi uygulandığında fertilizasyon oranı %43, klivaj oranı ise %39 olarak bulunmuştur. Buna karşın, rastgele seçilen spermle yapılan ICSI'de bu oranlar fertilizasyon için %26 ve klivaj için %23 olarak rapor edilmiştir.

HOS testinin, taze ejakülat örneklerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak dondurulmuş ve çözölmüş semen örneklerinde sperm vitalitesini değerlendirmede yeterli olmadığı belirtilmiştir (81).



Şekil 10. Eosin Y testi sonrası canlı ve ölü sperm hücreleri (81)



Şekil 11. Farklı aşamalarda HOS testi sonrası sperm görüntüleri (135)

3.5.7.2.4. Spermatozoa Agregasyonu

Hareketsiz sperm hücrelerinin mukus iplikçikleri gibi kalıntılarla veya sperm dışı hücrelerle birleşerek bir araya gelmesi durumudur (80).

3.5.7.2.5. Sperm Aglutinasyonu

Hareketli spermatozoonların birbirlerine baş başa, kuyruk kuyruğa ya da baş ve kuyruk kısımları karışık olacak şekilde yapışması sonucu bir arada bulunmasıdır (80).

3.5.7.2.6. Morfolojik Değerlendirme

Likefaksiyonu tamamlanmış ejakülat örneği, bir lam üzerine yayılır ve hava ile temas ederek kurutulur. Daha sonra fiksasyon işlemi uygulanarak sperm hücreleri lamlara sabitlenir. Bu işlemin ardından, güncel IVF laboratuvarlarında iki farklı boyama yöntemi kullanılarak sperm hücreleri boyanır. Kullanılan boyalar şunlardır:

- Diff-Quik Boyama Yöntemi
- Spermac Stain Boyama Yöntemi

Diff-Quik Boyası

Diff-Quik boyası, üç farklı solüsyondan oluşur:

1. Fiksatif Solüsyon
2. Xanten Solüsyonu (Stain 1)
3. Tiyazin Solüsyonu (Stain 2)

Diff-Quik Boyasının Uygulama Yöntemi

1. Oda sıcaklığında kurutulmuş yayma preparat, fiksatif solüsyonda 15 dakika bekletilir.
2. Preparat, Stain 1 solüsyonunda 2 dakika bekletilir ve ardından steril distile su ile yıkanır.
3. Daha sonra preparat, Stain 2 solüsyonunda yine 2 dakika bekletilir ve tekrar steril distile suyla yıkanır.
4. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra preparat oda sıcaklığında kurutulur ve faz kontrast mikroskopunda immersiyon yağı kullanılarak x100 büyütmede incelenir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre, normal morfolojideki spermatozoon oranının alt sınırı %4'tür (80).

Spermac Boyama Yöntemi

Spermac boyama yöntemi, fiksatif ve A, B, C olmak üzere üç farklı boyadan oluşur. Bu boyalar, spermatozoonun farklı bölgelerini renklendirir.

Spermac Boyama Yönteminin Uygulama Adımları

1. Lam üzerine yayılmış ve kurutulmuş preparatlar, fiksatif solüsyonda 10 dakika bekletilir.
2. Fiksasyon sonrası preparat steril distile suyla temizlenir ve suyu süzildükten sonra sırasıyla:
 - A solüsyonunda 1,5 dakika,
 - B solüsyonunda 1,5 dakika,
 - C solüsyonunda 30 saniye bekletilerek boyanır.
3. Kuruyan preparatlar, faz kontrast mikroskopunda immersiyon yağı ile x100 büyütmede incelenir.

Morfoloji analizi sırasında 100 spermatozoon incelenir ve her bir anomalinin kaydı tutulur (80).

Sperm Morfolojik Anomalileri

Normal bir spermatozoonun baş kısmı, %40 oranında sitoplazma ve %60 oranında akrozom içerir. Akrozom bölgesinde vakuol veya kist gibi yapılar bulunmamalıdır. Boyun bölgesi ince bir yapıya sahip olup kuyruk, boynun tam ortasından çıkar ve incelerek sonlanır. Ancak, tüm spermatozoonlar normal bir morfolojiye sahip değildir. Baş, boyun veya kuyruk bölgelerinde çeşitli anomaliler görülebilir.

- **Baş Anomalileri**

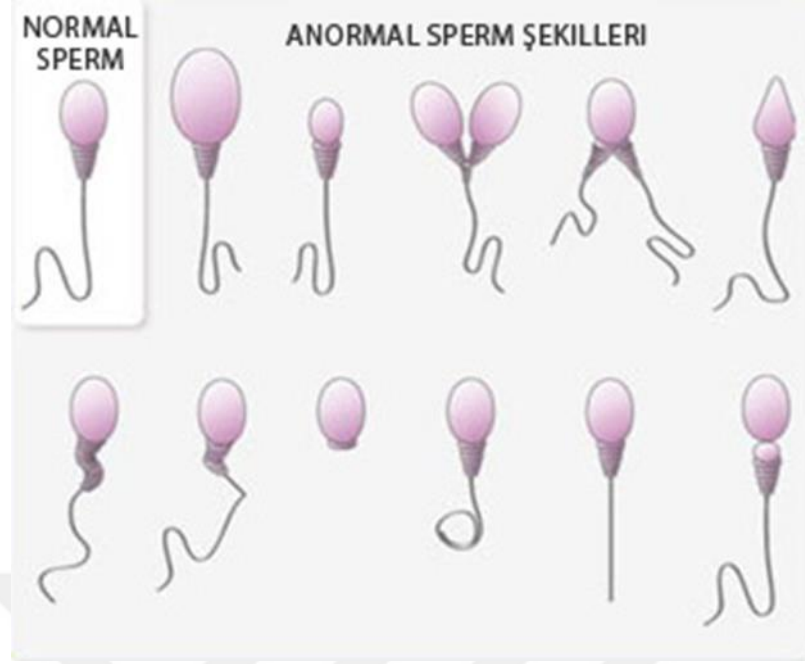
Baş kısmı büyük, küçük, konik, yuvarlak, piriform, vakuollü, amorf ya da çift başlı olabilir. Akrozom, eksik olabilir veya kist gibi yapılar içerebilir. Bu tür anomaliler, fertilizasyon süreci ve embriyo gelişimi üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir.

- **Boyun ve Orta Kısım Anomalileri**

Boyun bölgesi ince veya kalın olabilir. Sitoplazma artığı bulunması ya da başın asimetrik şekilde boyuna bağlanması bu grupta yer alan anomaliler arasındadır.

- **Kuyruk Anomalileri**

Kuyruk bölgesinde birden fazla kuyruk, kısa veya aşırı uzun yapı, kırık, kesik uçlu (tail stump), kıvrık ya da spiral şekilli anormallikler gözlemlenebilir (80).



Şekil 12. Normal ve anormal sperm (136)

Tablo 1. Spermiyogram terminolojiler (80).

Sperm Analizi Terminolojilerinin Tanımları	
Astenoteratozoospermi	İlerleyici harekete sahip spermelerin ve normal morfolojiye sahip spermelerin alt referans değerinden az olması durumudur.
Astenozoospermi	İleri hareketli sperm hücrelerinin alt referans değeri olan %40'dan az olmasıdır.
Azospermi	Tüm ejakülatta hiç sperm bulunmadığı durumdur.
Globozoospermi	Spermelerde akrozom anomalisinin yoğunlukta olup, hatta hiç olmaması ve sperm başının morfolojik olarak yuvarlak olmasıdır. Böyle spermelerin ne yazık ki bir oositi fertilite etme yeteneği yoktur.
Hipospermi	Semen hacminin 2.0 ml alt sınırdan daha az olmasıdır
Kriptozoospermi	Semende ilk gözlemde sperm gözlenmeyin sperm wash mediumu ile konsantre edilen örnekte santrifüj sonrası sperm görülmesidir.

Lökositospermi	Semendeki lökositlerin sayısının üst sınırdan (1 milyon/ml) fazla olmasıdır.
Nekrospermi	Değerlendirilen sperm örneğinde % 25'ten fazla cansız sperm hücresi gözlenme durumudur.
Normozospermi	Hareketliliğin %40, morfolojinin %4 ve Mililitredeki sperm sayısı 15 milyon/ml veya daha fazla olmasıdır.
Oligozoospermi	Hareketliliği ve morfolojisinin normal mililitredeki sperm sayısının 15 milyon/ml'den daha az olmasıdır.

3.1. Sperm Toplama ve Hazırlama Teknikleri

3.1.1. Ejekülasyon

Semen örneği mastürbasyon yöntemiyle alınmalı ve steril, tek kullanımlık bir plastik kaba yerleştirilmelidir. Örnek, semen sıvılaştıktan sonra Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre analiz edilerek IVF laboratuvarlarında kullanılmak üzere hazırlanır. Yumurta toplama günü alınan semen örneğinin kalitesi düşükse, ikinci bir örnek alınması mümkündür. Likefaksiyon süresi geçmesine rağmen sıvılaşmamış semen örneklerinde, pipetle karıştırma işlemi uygulanarak viskoz kümeler açılabilir (82).

Nörolojik veya psikolojik nedenlerle örnek veremeyen hastalardan prostat üzerine vibratörle yapılan uyarılar yoluyla sperm elde edilebilir. Retrograd ejakülasyonu bulunan bireylerde, mesaneden alınan idrar örneğinden sperm ayrıştırılır. Bu işlem öncesinde, idrarın sperm için zararsız bir pH seviyesine ulaşması için hastaya oral olarak sodyum bikarbonat verilebilir (33).

3.1.2. Cerrahi yöntemler

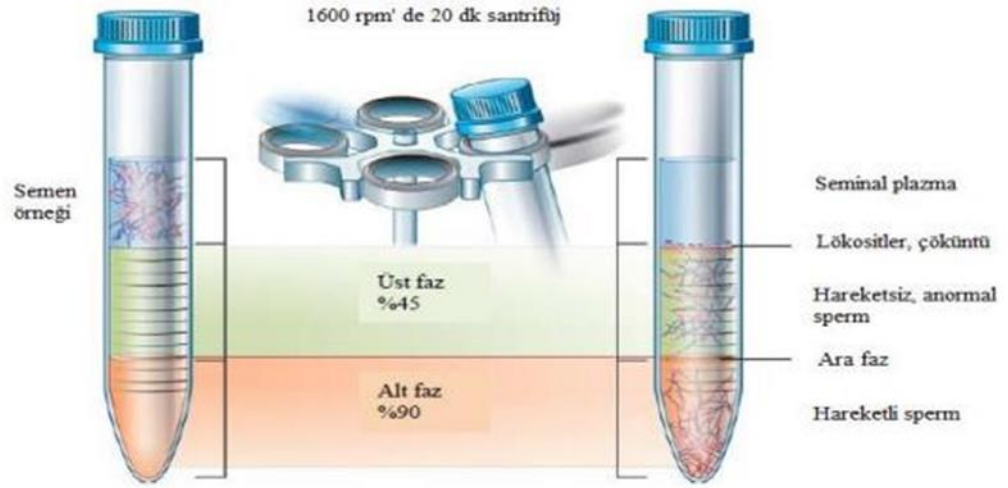
Epididimal veya testiküler sperm hücrelerini elde etmek için cerrahi müdahaleler gerekebilir. Epididimal sperm elde etmek amacıyla mikrocerrahi ya da perkütan iğne yöntemi kullanılabilir. Epididimal aspirasyon, testiküler fonksiyon bozukluğu olan ya da obstrüktif azospermi görülen bireylerde IVF işlemleri için tercih edilen bir tekniktir.

Testiküler sperm, açık cerrahi veya günümüzde yaygın olarak kullanılan micro TESE yöntemiyle elde edilebilir. Testiküler dokudan alınan örnekler, ileri kullanımlar için dondurularak saklanmalıdır (14).

3.1.3. Dansite-Gradient yöntemi

Bu yöntem, hareketli, canlı ve kaliteli sperm hücrelerini seçmek için kullanılan ve düşük sperm parametrelerine sahip bireylerde sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. IVF ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için koloidal silika kaplı partiküller kullanılarak sperm ayrıştırılır.

Prosedür sırasında, konik bir santrifüj tüpüne 1 ml %90'lık gradient solüsyonu eklenir. Bunun üzerine dikkatlice 1 ml %45'lik gradient solüsyonu ilave edilerek iki katmanlı bir yapı oluşturulur. Bu katmanların üstüne sıvılaşmış semen örneği dikkatlice eklenir ve tüp, 10 dakika boyunca 300–400 g kuvvetinde santrifüj edilir. Sperm pelleti, üstte kalan süpernatant sıvıdan ayrılarak pipet yardımıyla homojenize edilir ve 5 ml sperm wash medyumuna eklenir. Karışım, 200 g kuvvetinde 10 dakika daha santrifüj edilir. Elde edilen pelletteki sperm, kültür işlemleri için hazırlanır (80).



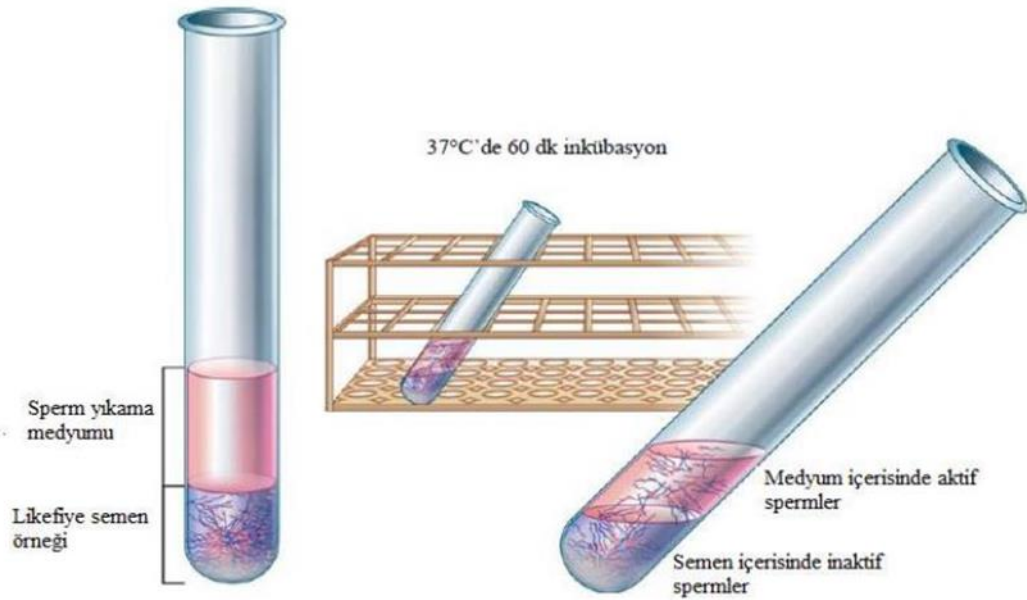
Şekil 13. Dansite-Gradient Yönteminin uygulanışı (137)

3.1.4. Direkt Yüzdürme Tekniği (Swim-up)

Swim-up yöntemi, sperm hücrelerinin sperm wash medyumunda bekletilmesi ile seminal plazmadan kendi hareket yetenekleri aracılığıyla ayrışmasını sağlar. Bu teknik, özellikle yüksek motiliteye sahip sperm hücrelerinin seçimi için etkili bir yöntemdir.

Yöntemin uygulanmasında, bir konik tüpe 1 ml semen örneği yerleştirilir. Tüp 45° açıyla eğimlendirilerek üzerine dikkatlice 1,2 ml kültür medyumunu eklenir. Daha sonra tüp, 37°C sıcaklıkta bir inkübatörde 1 saat süreyle bekletilir. Bekleme süresi sonunda tüp nazikçe dik konuma getirilir ve üst katman dikkatlice başka bir tüpe aktarılır. Üst kısımda yüksek motiliteye sahip sperm yoğunluğunun bulunması beklenir.

Bu yöntemin avantajlarından biri, santrifüj işleminin zararlı etkilerinden kaçınılabilmesidir (80).



Şekil 14. Swim Up Yönteminin uygulandığı (137)

3.2. Kriyoprezervasyon

1949 yılında Polge ve ekibi, gliserolün düşük sıcaklıklarda koruyucu etkisini keşfetmiş ve bu gelişme, canlı hücrelerin ve üreme hücrelerinin kriyoprezervasyonu için temel oluşturmuştur. Kriyobiyojji, hücrelerin, dokuların, organların ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bir bilim dalıdır. İlk dondurulan hücre türü ise sperm hücresidir (83,84). Fertilizasyon ile başlayan biyolojik süreç, kriyoprezervasyon sayesinde biyolojik ritim durdurularak saklanabilir hale gelmiştir (85).

Kriyoprezervasyonun temel amacı, hücreleri düşük sıcaklıklarda, minimum hasar ve geçici işlev kaybıyla koruyabilmektir (85).

Kriyoprezervasyonun Aşamaları;

- Kriyoprotektanlarla İlk Temas: Hücrelerin su moleküllerinin kristalleşme nedeniyle zarar görmesini önlemek için gerçekleştirilir.
- Dondurma: Hücreler, -196°C sıcaklığa kadar soğutulur.
- Depolama: Hücreler, düşük sıcaklıkta uzun süre saklanır.
- Çözme (Thawing): Dondurulmuş hücreler yeniden işlevsel hale getirilir.
- Kriyoprotektanların Arındırılması: Hücrelerden kriyoprotektan maddelerin uzaklaştırılması yapılır.

Özellikle başlangıçtaki soğutma süreci ve çözme aşamaları, kriyoprezervasyonun en kritik basamaklarıdır. -196°C olarak tanımlanan düşük sıcaklık, biyolojik işlevlerin tamamen durdurulmasını sağlayarak koruma ortamı oluşturur (86).

3.2.1. Sıvı azot

Sıvı azot, havadaki gazların ayrıştırılması ile elde edilir. Renksiz, kokusuz ve toksik olmayan bu madde, -196°C kaynama noktasıyla kriyoprezervasyon işlemlerinde sıkça kullanılır.

3.2.2. Kriyobiyolojinin temelleri

Sıvı azot, -196°C sıcaklıkta sıvı halde bulunur ve bu sıcaklıkta tüm kimyasal reaksiyonlar durur. Kimyasal aktivitelerin inhibe edilmesi, hücresel işlevlerin tamamen durması anlamına gelir. Ancak kriyoprezervasyon bazı durumlarda hücrelerin vitalitesinin yavaşlamasına veya durmasına yol açabilirken, nadiren hücre metabolizmasında hızlanma da gözlemlenebilir (87).

-196°C sıcaklıkta karşılaşılabilecek başlıca istenmeyen olaylar arasında, radyasyon ve kozmik ışınların etkisiyle serbest radikal oluşumu yer alır. Bu sıcaklıkta enzimatik onarım mekanizmaları işlev görmediğinden, iyonlaşmalar zararlı ve geri dönüşü olmayan DNA kırıklarına neden olabilir. Kriyoprezervasyon üzerine yapılan araştırmalarda, in vitro ortamda canlı hücrelerin yaklaşık %63'ünün 200-400 rad iyonize radyasyona maruz kaldığında öldüğü tespit edilmiştir. Bu radyasyon düzeyinin

etkilerini anlamak için, dünyanın doğal radyasyon dozunun yılda yalnızca 0.1 rad olduğunu göz önünde bulundurmak önemlidir. Buna göre, -196°C’de saklanan hücrelerin bu düzeyde zarar görmesi için yaklaşık 2000 ila 4000 yıl geçmesi gerekmektedir.

Başka bir çalışmada, üçüncü gününde 8 hücreli aşamada bulunan fare embriyolarına 2000 yıl eşdeğer radyasyon uygulanmış ve -196°C’de korunan blastomerlerin tamamen veya kısmi dejenerasyon gösterdiği saptanmıştır. Ancak bu embriyolardan doğan yavrularda herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır (88).

3.2.3. Kriyoprezervasyonda başarıyı etkileyen etmenler

Tüp bebek laboratuvarları için oldukça önemli olan kriyoprezervasyonu etkileyen etmeler aşağıda anlatılmıştır.

3.2.3.1. Vitrifikasyon ve çözme hızlarının kontrolü

Hücre içi buz oluşumu, soğutma hızının artmasıyla kaçınılmaz hale gelir. Her hücrenin, hacmi ve membran bütünlüğüne bağlı olarak tolere edebileceği bir soğutma hızı vardır. Bu hız, kriyoprotektanlardan bağımsız olarak hücre içindeki buz oluşumunu engelleyen en hızlı soğutma olarak tanımlanır ve optimum soğutma hızı olarak adlandırılır. Çeşitli hücreler için optimum soğutma hızı belirlenmiş olsa da, IVF uygulamalarında önemli bazı hücreler için bu hız hala kesinleştirilememiştir.

Vitrifikasyon sırasında hücrelerin hipertonic koşullara verdikleri tepkiler, birçok dış faktöre bağlıdır. Bu faktörlerin başlıcaları şunlardır:

- Hücre Hacmi (V): IVF uygulamalarında sperm hücrelerinin yüzey alanı/hacim oranı, embriyo ve oositlere göre daha yüksektir. Bu durum, su geçirgenlik katsayısının artması nedeniyle, sperm hücrelerinde aşırı soğumanın daha hızlı gerçekleşmesine yol açar.
- Soğutma Hızı: Hücre çapı ile doğrudan ilişkilidir. Daha büyük hücre çapına sahip oosit ve embriyolar, sperm hücrelerine göre daha düşük hızda soğutulmalıdır.
- Plazma Membranının Su Geçirgenliği (Lp): Membran geçirgenliğinin yeterliliği, vitrifikasyon başarısında önemli bir rol oynar.

- Kriyoprotektan Aktivasyon Enerjisi (E): Kriyoprotektanların etkinliğini belirleyen bir unsurdur.
- Kriyoprotektan Türü ve Konsantrasyonu: Kullanılan kriyoprotektanların çeşitliliği ve yoğunluğu da süreci etkiler.
- Soğutma Hızı (B): Soğuma hızı, hücrenin ihtiyacına göre ayarlanmalıdır. Hücre içerisindeki su, ekzosmozis ile uzaklaştırılarak kimyasal potansiyel dengesi sağlanır. Ancak denge sağlanmadan hücre hızla soğutulursa, istenmeyen intrasellüler donma meydana gelir. Bu durum, hücre dejenerasyonuna neden olduğu için vitrifikasyonda kesinlikle önlenmelidir.

Araştırmalar, embriolarda en yüksek canlılık oranlarının $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ soğutma hızında elde edildiğini göstermiştir (87).

3.2.3.2. Buz formasyonu

15°C 'nin altında kriyoprotektan içeren çözeltilerde buz oluşumu meydana gelir. Bu durum, "super cooling" yani aşırı soğuma olarak adlandırılır. Aşırı soğuma, bir sıvının sıvı fazından katı fazına geçmeden, normal donma noktasının altında bir sıcaklığa kadar soğumasını ifade eder. Sıvının yarı kararlı bir durumda olması, içindeki partiküllerin enerjilerini kaybetmesine rağmen kristal forma geçememesine yol açar. Ancak, bu aşamada sıvıya küçük bir kristal eklenerek ("seeding"), kristalleşme süreci başlatılır ve sıcaklık tekrar donma noktasına yükselir (89,90).

IVF uygulamalarında sperm hücreleri, embriolar ve blastosistlerin ortamlarında kontrollü buz oluşumunu sağlamak için çalışmalar yapılmış ve farklı soğutma hızları denenmiştir. Hasar oluşturabilecek hızlar tespit edilmeye çalışılmıştır. Araştırmalar, -9°C 'nin altında başlatılan nükleasyon sürecinin hücrelerde düşük vitalite oranlarına yol açtığını; buna karşın, -5°C ile -7.5°C arasında gerçekleşen çekirdeklenme süreçlerinin daha yüksek vitalite oranları sağladığını göstermiştir.

Bugün IVF laboratuvarlarında bu bulgulara dayanarak belirlenmiş soğutma hızları kullanılmaktadır. Canlı hücrelerin dondurulması amacıyla kullanılan straw ve vial gibi materyaller, -7°C 'ye kadar sıvı azot ortamında soğutulur. Bu işlemle termal denge sağlanır. Daha sonra, buz oluşumunu başlatmak için vial veya straw dış yüzeyine soğuk forseps ile dokunulur. Bu işlem, vial ya da straw yüzeyinin sıcaklığını aniden

içindeki çözeltinin erime noktasına yükselterek buz oluşumunu başlatır. Ardından, -7°C'den itibaren dakikada 2.5°C'lik bir hızla soğutma işlemine devam edilir.

Yavaş soğuma sırasında hücresel dehidratasyon oluşur. -5°C'nin altındaki sıcaklıklarda, hücreler ve çevresindeki ortam aşırı soğuma ve kriyoprotektanların donma noktasını düşürme etkisi nedeniyle genellikle donmamış halde kalır. -5°C ile -15°C arasında, hücre dışında doğal ya da uyarıcı bir etkiyle buz oluşumu gözlemlenir. Buna karşın, hücre içi sıvı donmaz. Bunun nedeni, plazma zarının hücre içinde buz kristalleri oluşumunu engellemesidir. Hücre içinde bulunan aşırı soğuk sıvı, dışarıdaki yarı donmuş çözeltiye kıyasla daha yüksek kimyasal potansiyele sahiptir. Bu potansiyel fark, hücre içindeki sıvının dışarı çıkarak dış ortamda donmasına yol açar (90).

3.2.3.3. Kimyasal koruma

Kriyoprotektanlar, üreme hücrelerini dondurma sırasında koruyan kimyasal maddelerdir. Bu maddeler, intrasellüler kristal oluşumunu engelleyerek, çözme işlemi sırasında kristallerin meydana gelmesini önler ve membran stabilitesinin bozulmasına karşı koruma sağlar. Kriyoprotektanlar, su molekülleriyle hidrojen bağları oluşturarak buz kristallerinin boyutlarını küçültür ve bu şekilde koruma etkisi gösterir. Gliserol ve propanediol, hidroksil grupları (-OH) aracılığıyla koruma sağlarken, dimetil sülfoksit (DMSO) bu işlevini oksijen atomu üzerinden gerçekleştirir. Aynı zamanda kriyoprotektanlar, medyumun donmamış kısmındaki elektrolit konsantrasyonlarını azaltarak hücre korumasını güçlendirir (91).

Hücreler, dondurma işlemi öncesinde kriyoprotektanlarla 5-15 dakika süreyle inkübe edilir. Bu işlem, hücre içinde intrasellüler dengenin sağlanmasını amaçlar (92). Dondurma işlemi sırasında hücrelerin zarar görmemesi, plazma membranından suyun ve kriyoprotektanların basit difüzyon ve hızlı transport mekanizmaları ile geçişine bağlıdır. Son yıllarda, membran üzerinde transport görevini yerine getiren su kanalları tespit edilmiştir. Bu protein yapılarının dondurma medyumuna eklenmesi, hücrelerin kriyoprezervasyon sırasında canlı kalma oranını artırmaktadır (91).

Sperm hücrelerinin plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondri membranı, dondurma ve çözme işlemlerine karşı oldukça duyarlıdır. Bu membranlar,

protein, glikoprotein ve glikolipitlerden oluşmuş, çift sıra fosfolipit katmanına sahip klasik bir hücre membranı yapısını içerir. Membranların termodinamik özellikleri, %65-70 oranında doymamış fosfolipit içermesi nedeniyle soğutma sırasında geri dönüşümsüz faz değişimlerine uğrayabilir. Bu süreç, membranın sıvı fazdan yarı katı faza geçişine yol açar ve membran içindeki enzim kinetiğinin bozulmasına neden olur. Sıvı fazdan yarı katı faza geçiş, membran proteinlerinin işlevlerini etkileyerek hücrede hasar oluşturabilir (129, 134).

Sıvı fazdan yarı katı faza geçiş, membran proteinlerinin işlevselliğinde değişikliklere neden olur (89,92,93).

3.2.3.3.1. Permeabl kriyoprotektanlar

Hücre zarından geçiş yapabilen permeabl kriyoprotektanlar arasında en yaygın kullanılanlar DMSO, gliserol, etilen glikol ve propilen glikoldür. Bu kriyoprotektanlar, hücre zarından içeri girerek koligatif etkiler yoluyla koruma sağlar. Koruyucu etkileri, donma sırasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmak, dehidrasyonu düzenlemek, protein yapılarını korumak ve düşük sıcaklıkların neden olduğu ozmotik daralmayı azaltmak suretiyle ortaya çıkar. Permeabl kriyoprotektanlar, buz kristallerinin oluşumunu -40°C'ye kadar düşürerek hücrelerin zarar görmesini engeller. Bu maddelerin hücre içine geçişi; çözeltilerin geçirgenlik özellikleri, hücre içi ve dışı konsantrasyon farkları, sıcaklık ve hücre yüzeyi ile doğrudan ilişkilidir (94, 95, 96, 97).

3.2.3.3.2. DMSO (Dimetilsülfoksit)

DMSO, hem su hem de organik ortamda çözünebilen amfipatik bir bileşiktir. Bu özelliği, dondurma çözeltilerinde kullanılan kriyoprotektanların toksisitesini azaltma potansiyelini artırır. Hücrelerin DMSO'ya maruz kalma süresinin kısaltılması ve permeabl olmayan kriyoprotektanların tercih edilmesi, toksisiteyi azaltmak için önerilen stratejilerdir (98).

3.2.3.3.3. Gliserol

Gliserol, yüksek hidrofilik özelliklere sahip bir bileşiktir. Karbon/hidroksil (C/OH) oranındaki eşitlik, gliserolün sperm dondurmadaki etkinliğini artırır. Ancak gliserolün toksisitesi türe göre farklılık gösterebilir. Bu toksisite, hücrelerin membran biyoenerji dengesi ve ozmotik stres nedeniyle olumsuz etkilenmesi ile kendini gösterir (99, 100).

3.2.3.3.4. Etilen glikol

Etilen glikol, su, alkol ve aseton gibi maddelerle karışabilen, ancak eter içinde çözünmeyen renksiz ve viskoz bir bileşiktir. Donma noktası -13°C, kaynama noktası ise 198°C'dir. Etilen glikol, dondurma ve çözme sırasında sperm hücrelerinde meydana gelen zararları önlemede gliserol ile benzer düzeyde koruyucu etki sağlar (101).

3.2.3.3.5. Amid türevi kriyoprotektanlar

Amid türevi kriyoprotektanlar, özellikle veterinerlik alanında aygır spermlerinin dondurulmasında gliserolden daha iyi koruma sağlar ve daha az kontraseptif etki gösterir (101).

3.2.4. Kriyoprezervasyon metotları

Kriyoprezervasyon Yöntemleri Günümüzde IVF laboratuvarlarında üç farklı kriyoprezervasyon yöntemi uygulanmaktadır.

3.2.4.1. Klasik yavaş dondurma

Klasik yavaş dondurma tekniği, genellikle embriyo ve oositlerin dondurulmasında tercih edilmektedir. Bu yöntemin uygulanması sırasında birçok değişiklik ve çeşitli işlem basamakları yer almaktadır. Yöntemin temel adımları aşağıdaki gibidir:

- Kriyoprotektanın eklenmesi,
- Hücrelerin viallere yerleştirilmesi,
- Viallerin dondurma cihazına yerleştirilmesi,
- Kristalizasyonun başlatılması,
- Yavaş soğutma,
- Sıvı azot içerisinde saklama,
- Numunelerin çözülmesi ve kriyoprotektanların uzaklaştırılması.

Buz kristallerinin yol açabileceği zararları önlemek için hücrelerin dehidrasyonu gereklidir. Bu amaçla, yaklaşık %10–11 oranında kriyoprotektan içeren özel çözeltiler kullanılmaktadır (102). Kriyoprotektanın eklenmesiyle birlikte hücreler dengeleme aşamasına bırakılır ve bu süreçte hücre içindeki su kaybolur. Bu durum, hücre zarının suya kıyasla kriyoprotektana daha geçirgen olması ve dış ortamın hiperozmotik özelliği ile ilişkili bir mekanizmadır. Su kaybı ve kriyoprotektanın dengelenmesi sağlandığında, hücrenin büzülme süreci sona erer (103).

Yavaş dondurma sırasında biyolojik yapılar iki temel riskle karşı karşıya kalabilir. Birinci risk, hızlı soğutma sonucunda hücre içinde buz oluşumudur. Diğer risk ise fazla yavaş soğutma durumunda eriyik benzeri yapıların yoğunluğunun artması nedeniyle ortaya çıkan hasardır (104). Soğutma oranı aşırı yavaş olduğunda soğuk hasarı meydana gelebilir. Soğutma hızının doğru bir şekilde ayarlanması için hücre zarının yapısı, zarın su ve kriyoprotektan geçirgenliği ile yüzey/hacim oranı gibi faktörler dikkate alınmalıdır (105).

Pek çok kriyoprotektan, hücre içine suyun çıkışına kıyasla daha yavaş girdiği için hücrelerin dehidrasyonuna neden olur. Bu durum kriyoprotektanın uzaklaştırılması sırasında tersine döner. Dilatasyon aşamasında, medyumdan hızlı bir şekilde su hücreye girerken kriyoprotektan aynı hızda çıkamaz ve bu, hücrenin şişmesine yol açar. Bu etkiyi engellemek amacıyla dilatasyon medyumlarına hücre zarından geçemeyen süktroz eklenir. Süktroz, suyun hücreye giriş hızını azaltarak ozmotik şoku önler (106).

3.2.4.2.Ultra hızlı dondurma

Ultra Hızlı Dondurma Bu yöntem, Trounson ve Sjoblom tarafından geliştirilmiştir. Ultra hızlı dondurma, kısmen dehidre edilen hücrelerin dakikada yaklaşık 1250°C hızla soğutulmasıyla gerçekleştirilen bir tekniktir. Bu yöntemde genellikle 2-4,5 M yoğunlukta gliserol, propanediol, DMSO veya etilen glikol gibi hücre zarından geçen kriyoprotektanlarla birlikte, süktroz, laktoz ve galaktoz gibi hücre zarından geçemeyen maddeler kullanılmaktadır. Kısa bir dengeleme süreci olan 30 saniye ile 3 dakika arasında hücreler, sıvı azot buharında bekletilip daha sonra sıvı azota daldırılır.

Bu yöntem sırasında, ekstraselüler sıvıda buz kristalleri oluşurken, hücre içindeki sıvıda buz oluşumunun engellenmesi mümkün değildir. Bu sebeple, diğer kriyoprezervasyon tekniklerine kıyasla daha düşük bir hayatta kalma oranına sahiptir. Dolayısıyla, kriyoprezervasyon yöntemleri içerisinde en az tercih edilen tekniklerden biridir (107).

3.2.4.3. Vitrifikasyon

Vitrifikasyon, kriyoprezervasyon alanında devrim niteliğinde bir teknik olarak kabul edilmektedir ve özellikle buz kristali oluşumunu tamamen engelleme özelliğiyle dikkat çeker. Söz konusu metot, düşük sıcaklıkların biyolojik materyaller üzerinde yol açabileceği hasarları minimuma indirmeyi hedefler. Burada belirtilen bazı temel noktalar şunlardır:

- **Buz Kristali Oluşumunun Engellenmesi:** Vitrifikasyonun temel avantajı, buz kristallerinin oluşmasını tamamen engelleyerek hücresel yapıları korumasıdır
- **Hızlı Soğutma:** Vitrifikasyon sırasında, yüksek soğutma hızları (örneğin saniyede 10^7 °C gibi) sayesinde zararlı sıcaklık aralıkları hızla geçilir.
- **Cam Benzeri Yapı:** Bu yöntem, sıvının donmadan aşırı soğutulması sonucu viskoz bir cam benzeri duruma geçişine dayanır.
- **Kullanım Alanları:** IVF laboratuvarlarında sıklıkla sperm, oosit ve embriyoların saklanması için kullanılır. Çözme sonrasında yüksek canlılık oranları elde edilmesi, bu yöntemi popüler hale getirmiştir.

3.2.5. Dondurma esnasında hücrede meydana gelecek değişiklikler

Dondurma işlemi sırasında germ hücrelerinde meydana gelen ani sıcaklık değişiklikleri, hücrelerde çeşitli değişimlere yol açar. Dondurma işlemi sırasında IVF laboratuvarında hücreler 37°C 'de bulunur. Sıcaklığın 37°C 'den 7°C 'ye düşmesi, hücredeki enzimatik reaksiyonların yaklaşık sekiz kat azalmasına neden olur. Sıcaklık düşüşü, dış ortam koşullarının etkisiyle hücrenin bulunduğu solüsyonlarda fiziksel ve kimyasal değişiklikler oluşturur. Canlı hücrelerin dondurulmasında, suyun fiziksel form değiştirmesi önemlidir. Hücre içindeki su sıvı halden kristal forma geçer. Özetle, dondurma işlemi sırasında hücre içindeki suyun biyolojik kristalleşme ile şekil değiştirmesi gerçekleşir (93).

Dondurma işlemi sırasında hücrelerde meydana gelen değişiklikler şunlardır: Çözücüler ve tuz çözeltileri sıvı fakat yüksek viskozitede bir fazda bulunur. Su, buz kristallerine dönüşerek sıvıdan katı hale geçer. Ani sıcaklık düşüşüyle oluşan buz kristalleri, hücreyi koruyan membrana ciddi zararlar verebilir. Sıcaklık düştüğünde buz kristalleri oluşur. Bu kristaller, tuz çözeltilerinin ekstraselüler ortamda çözücülük etkisini azaltır. Su-tuz-buz karışımı kristalleştiğinde buna ötektik nokta denir. Tuz bileşenleri, suyun kristalleşmesi ile ötektik noktalarına ulaşır. Normal kültür çözeltilerinde bu noktalar -10°C ile -17°C arasında, sodyum kloridde ise -25°C 'dedir. Kriyoprotektif ajanların bulunmaması durumunda dejenerasyon artar; hücreler pH değişikliklerine ve tuz konsantrasyonlarındaki farklılıklara maruz kalır. Bu durum lipoprotein denatürasyonuna ve membran içi zorlanmalara yol açar.

Dondurma çözeltisindeki tuz yoğunluğu arttığında hücre ozmotik bir ortamda su kaybeder. Bu durum hücrede dehidratasyona ve büzüşmeye neden olur. Hücre konsantrasyonundaki büyük azalmanın hücrenin ölümüne yol açtığı görülmüştür. Kriyoprezervasyon sırasında ortaya çıkan zararlar, hiperozmotik stres, soğuk şoku stresi ve ozmotik büzüşme-şişme gibi durumlarla ilişkilidir. Hiperozmotik çevre, pH değişiklikleri, hücresel dehidrasyon artışı ve membran protein-lipit kompleksindeki bozulmalara neden olur. Dondurma sırasında oosit, sperm ve embriyolarda oluşan lipid damlacıklarının soğuk şoku hasarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (109).

Soğuk şoku nedeniyle oluşan zararlar şu şekilde sıralanabilir: İntraselüler dehidrasyon, membran lipid ve proteinlerinin denatürasyonu, hücre ve ER'de ozmotik şişme, plazma membranında intramembranöz kümelenme, spermelerde akrozomal enzimlerin salınımının durması, sperm motilitesinde ve sirküler hareketinde kayıp (107, 108, 109). Bu süreçlerin sonucunda hücrelerde apoptozis, serbest radikal oluşumu, ATP sentez basamaklarının bozulması, dölleme oranlarında azalma ve genetik olarak anormal embriyo gelişimi gözlemlenir (102).

3.2.6. Ozmotik stres ve ozmotik şişme

Ozmotik stres, germ hücrelerinin dondurulmasında karşılaşılan en kritik aşamalardan biridir. Dondurma işlemi sırasında hücreler hiperozmotik bir ortama maruz kalırken, çözme işlemiyle bu durum ortadan kalkar. Ozmotik stres, hücre içi ve dışındaki ozmotik farklılıklar nedeniyle oluşur ve bu farklılıkların büyüklüğü, hücreden

uzaklaştırılan su miktarına bağlıdır. Hücre ortamından suyun uzaklaştırılması, dondurma ortamında kullanılan kriyoprotektan yoğunluğuyla ilişkilidir (163).

Kriyoprotektanların eklenmesi, ortamı hiperozmotik hale getirerek hücrede su kaybına ve dehidrasyona yol açar. Daha sonra hücre içine alınan kriyoprotektanlar, hücreyi yeniden şişirerek izozmotik bir duruma ulaşmasını sağlar (110). Ancak bu tekrar eden değişimler, kritik sınırları aştığında, hiperozmotik bağı olarak geri dönüşü mümkün olmayan membran hasarlarına neden olur. Hücredeki küçük porlar, sodyum ve potasyum iyonlarının giriş-çıkışını düzenler; ancak bu durum, hipo ozmotik strese ve kolloidal ozmotik hemolizin artışına zemin hazırlayabilir (111).

Araştırmalar, hızlı soğutmanın hücrede kristalleşme kaynaklı hasar oluşturduğunu, yavaş soğutmanın ise hücrelerin kriyoprotektanlara uzun süre maruz kalması veya aşırı büzülmesi nedeniyle zarara yol açtığını göstermektedir (112). Sonuç olarak, hücreler soğuk şoku yaşadıklarında membranlarında ve ozmotik yapılarında değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler, hücrelerin canlılık oranlarını ve fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Oosit ve sperm hücreleri bu tür zararlar açısından daha hassastır. Germ hücrelerinin dondurulmasını takiben yapılan çözme işlemi sonrası canlılık oranı, dölleme başarısını doğrudan etkiler (111).

3.2.7. Sperm kriyoprezervasyonu

İlk sperm dondurma bankası 1972 yılında kurulmuş ve bir yıldan daha uzun süre saklanan sperm ile doğan ilk sağlıklı bebek 1973 yılında dünyaya gelmiştir. Tyler IVF merkezinde 20 yıldır saklanan sperm ile bir bebeğin dünyaya gelmesi ise 1998 yılında gerçekleşmiştir. Sperm hücreleri, dondurularak uzun süre muhafaza edilebilir ve minimal kriyozararla çözülüp yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) kullanılabilir. Bu işlem, YÜT prosedürlerinde önemli bir yere sahiptir ve belirli endikasyonlara bağlı olarak uygulanmaktadır:

- Kemoterapi ve Radyoterapi: Sperm parametreleri normal olan hastalarda kemoterapi ve radyoterapi tedavileri öncesinde sperm hücrelerinin dondurulması.
- İlaç Kullanımı: Spermatogenezi olumsuz etkileyebilecek ilaçların kullanımı öncesinde ejakülatta bulunan spermilerin saklanması.

- Testis Cerrahisi: Testis cerrahisi öncesinde ejakülatın tekrar sperm elde edilemeyecek durumlar için sperm hücrelerinin dondurulması.
- Azoospermi Vakaları: Obstrüktif ve nonobstrüktif azoospermi vakalarında testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile elde edilen spermlerin korunması.
- Cerrahi Tekrarının Önlenmesi: Başarılı TESE operasyonları sonrası cerrahi işlemleri tekrarlamamak için elde edilen hücrelerin saklanması.

Spermler ejakülatör kanallardan ayrıldıklarında plazma membran lipidlerinde ve proteinlerinde fiziksel ve kimyasal değişiklikler meydana gelir. Farklı gelişim evrelerindeki spermler, dondurma ve çözme süreçlerinde farklı özellikler gösterir. Ejakülat spermleri, epididimal ve testiküler spermlere göre daha dayanıklıdır. Ancak, kriyoprezervasyon sırasında laboratuvar koşullarından kaynaklanan hatalar spermlere zarar verebilir. Bu zararlar motilitede azalma, sperm-oosit füzyon kapasitesinde düşüş veya plazma membran lipid peroksidasyonuna bağlı fertilizasyon oranlarında azalma şeklinde görülebilir. Bu problemler, serbest oksijen radikalleri (ROS), özellikle hidrojen peroksit seviyesindeki artış ile ilişkilidir (113).

İnsan spermleri, mekanik işlemlere oldukça dirençlidir. IVF uygulamalarında kullanılan pipetleme, karıştırma ve santrifüj işlemleri sperm üzerinde ciddi bir etki yaratmaz (114). Ancak kriyoprezervasyon sırasında motilite ve canlılık olumsuz etkilenebilir. Bu durumu önlemek için bazı araştırmacılar, kültür ortamına askorbik asit, katalaz, E vitamini veya medikal bitkiler gibi antioksidanlar eklenmesini önermektedir.

Dondurma ve çözme süreçlerinde, spermlerin mitokondri yapılarında olumsuz etkiler gözlenmiştir. Bu durum, IVF uygulamalarında düşük fertilizasyon oranlarına, kalitesiz embriyo gelişimine ve düşük gebelik oranlarına yol açabilir. Elektron mikroskop görüntülemeleri, dondurulup çözülen spermlerin özellikle boyun bölgesi ve akrozomal plazma membranında şişme ve parçalanma olduğunu göstermiştir (115, 116).

3.3. Medikal Bitkiler

Tarih boyunca insanlar, çevrelerindeki bitkileri pek çok farklı amaçla kullanmıştır. Hastalıkların tedavisi, gıda temini, barınma, korunma ve ısınma gibi temel ihtiyaçlar için bitkilerden faydalanılmıştır. Günümüzde ise bu kullanım, bilimsel yaklaşımlarla

daha sistematik ve bilinçli hale gelmiştir. İlkel dönemlerde bitkilerin faydaları, içgüdüler ve deneme-yanılma yöntemiyle keşfedilirken, günümüzde tıp, gıda, eczacılık, kozmetik, tarım ve boya sanayi gibi pek çok alanda bitkilerin etkileri detaylı şekilde araştırılmakta ve uygulanmaktadır. Türkiye, hem tarımsal faaliyetler hem de sahip olduğu zengin bitki çeşitliliği ile medikal bitkiler bakımından oldukça önemli bir konuma sahiptir (117).

3.3.1. Medikal bitkilerin fertiliteye etkileri

Medikal bitkiler, düşük maliyetleri, kolay erişilebilir olmaları ve doğal yapıları nedeniyle modern tedavi yöntemleri arasında giderek daha fazla tercih edilen bir alternatif haline gelmiştir. Özellikle tedavi masraflarının artması ve kimyasal ilaçların yan etkilerine dair endişelerin yaygınlaşması, bitkisel tedavi yöntemlerine olan ilgiyi büyük ölçüde artırmıştır. Bununla birlikte, bitkisel tedavi yöntemlerinin etkinliği ve güvenliği konusunda sağlık uzmanlarının gözetimi altında uygulanması gerektiği unutulmaması gereken önemli bir konudur.

Bitkisel tedavi yöntemlerini tercih eden bireyler arasında, ekonomik düzeyi düşük genç çiftlerin daha sık yer aldığı görülmektedir. Zini ve ekibinin yaptığı araştırmalarda, infertil erkeklerin %31'inin multivitaminler ve bitkisel ürünlerden destekleyici tedavi amacıyla yararlandığı belirlenmiştir (119). Türkiye'de Ayaz ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir başka çalışmada ise infertil kadınların %27'sinin medikal bitkilerden faydalandığı ve bu kullanımın büyük ölçüde plasebo etkisiyle iyileşme sağladığı ifade edilmiştir (118).

Japon geleneksel tıbbında kullanılan bitkilerin erkek infertilitesi üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve hipogonadizm ile erektil disfonksiyon tedavisinde %71 oranında başarı sağlandığı rapor edilmiştir (120). İdiopatik oligospermili bireyler üzerinde yapılan bir başka araştırmada, hastalar iki gruba ayrılmış; bir gruba testosteron undecanoate gibi alopatik ilaçlar, diğer gruba ise bitkisel tedaviler uygulanmıştır. Üç aylık tedavi sürecinin ardından her iki grupta da sperm parametrelerinde iyileşme gözlenmiş; ancak bitkisel tedavi uygulanan gruptaki iyileşme oranının, alopatik tedavi grubuna kıyasla daha yüksek olduğu vurgulanmıştır (121).

Varikoselli erkekler üzerinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise günlük olarak kullanılan at kestanesi preparatlarının, iki aylık düzenli kullanım sonucunda sperm fonksiyon parametrelerinde anlamlı derecede bir artış sağladığı görülmüştür. Bu artış, kontrol grubuna kıyasla oldukça dikkat çekici bulunmuştur ve istatistiksel olarak da anlamlı bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (122).

3.3.2. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.)

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), Fabaceae (Leguminosae) familyasına ait, yaprak dökmeyen, çalı veya ağaç formunda büyüeyebilen, uzun ömürlü bir bitkidir. Bu bitkinin kullanımı, insanlık tarihine dayanır. Tarihi kaynaklar, keçiboynuzunun ilk kez M.Ö. 4000 yıllarında Eski Mısır'da gıda ve ilaç olarak kullanıldığını göstermektedir (123). Halk arasında harnup, harip ya da ballı boynuz olarak bilinen keçiboynuzu, Türkiye'nin zengin florasında geniş bir yayılım alanına sahiptir. İzmir'in Urla ilçesinden başlayarak Hatay'ın Samandağ ilçesine kadar uzanan yaklaşık 1750 km'lik kıyı şeridinde doğal olarak yetişmektedir. Türkiye'de keçiboynuzunun yabani, etli ve susamlı gibi farklı türleri bulunmaktadır (124).

Keçiboynuzu, farklı iklim koşullarında yetişebilme kapasitesiyle dikkat çeker. Ilıman iklim bitkisi olmasına rağmen, kurak ve sıcak şartlara son derece dayanıklıdır. Bunun yanında, düşük sıcaklıklara da tolerans gösterebilir ve zorlu çevre koşullarında gelişimini sürdürebilir. Toprak konusunda seçici olmayan bu bitki, zayıf ve taşlı topraklarda bile kolaylıkla büyüeyebilir (125). Ağaç formunda yetiştiğinde boyu genellikle 6 ila 20 metre arasında değişiklik göstermektedir. Çiçek yapısı ve döllenme biyolojisi bakımından poligam özellikler sergileyen keçiboynuzu popülasyonunda hem dioik hem de erselik bireyler bir arada bulunabilir (126).

Bitkinin yaprakları her zaman yeşildir ve ortalama olarak 3-5 cm uzunluğundadır. Keçiboynuzunun küçük, yeşil renkli çiçekleri, bahar aylarında görülür. Meyveleri başlangıçta parlak yeşil renktedir ve olgunlaştıkça koyu kahverengiye dönüşür. Meyve büyümesi genellikle Mayıs ayında başlar; olgunlaşma ise Haziran ve Temmuz aylarında tamamlanır. Hasat dönemi ise Eylül ayından başlayarak Kasım veya Aralık aylarına kadar devam eder (127).

Keçiboynuzu, insan beslenmesinde ve hayvancılıkta önemli bir yere sahiptir. Meyveleri; potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, sodyum, selenyum, demir ve bakır gibi mineraller açısından oldukça zengindir. İnsan gıdası olarak şeker, pekmez, kakao, alkol ve diyet lifi üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, ilaç endüstrisinde hammadde olarak değerlendirilir (128, 132). Hayvancılık sektöründe ise selüloz, mineral ve protein açısından zengin içeriğiyle hayvan yemi olarak tercih edilir (123, 129).

Keçiboynuzu aynı zamanda fenolik bileşikler açısından zengin bir kaynaktır. Özellikle gallik asit içeriğiyle dikkat çeker ve bu bileşik güçlü bir antioksidan olarak öne çıkar. Araştırmalar, gallik asidin yağ oksidasyonunu yavaşlatıcı etkilerini ortaya koymuştur (130, 131). Souli ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada keçiboynuzu özütünün, farelerde karaciğer hücrelerini etil alkol kaynaklı oksidatif strese koruduğu belirtilmiştir (133).

Keçiboynuzu, hem doğal özellikleri hem de geniş kullanım alanlarıyla çok yönlü bir bitkidir. Bu bitki, hem insan sağlığına olan faydaları hem de ekonomik değeriyle dikkat çekmektedir. Türkiye'nin zengin biyolojik çeşitliliği içerisinde önemli bir yere sahip olan keçiboynuzu, sürdürülebilir tarım ve doğal tedavi yöntemlerinde öne çıkan bir bitki olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 15. Keçiboynuzu ağacı (138)



Şekil 16. Keçiboynuzu meyvesi ve tohumu (138)

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1.Hasta Grubu

Çalışmamıza Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Kliniğine infertilite nedeniyle başvurmuş 25- 40 yaş aralığındaki 50 (25 normospermi, 25 astenozoospermi) erkek hasta katılmıştır.

50 gönüllü hastanın onayı ile semen örneği alındıktan sonra

Üroloji kliniğinden infertilite değerlendirmesi sonrası geriye kalan semen örnekleri kullanılmıştır. İnfertil 50 erkek hastanın demografik özellikleri (sigara, aksesuar bez enfeksiyonu, alkol alımı, yakın zamanda hormonal tedavi, vitamin tüketimi ve varikozel bozukluğu)du) çalışmaya dahil edilmemiştir.

Sperm volümü 1,0 ml'den düşük olan, lökosit hücre sayısı ml'de 1 milyondan fazla olan virtual azospermi ve azospermik örnekler çalışma dışında bırakılırken; sperm volümü 1,5 ml'den fazla olan, sayısı 15 milyonun üzerinde, hareketliliğin %40'tan fazla ve Morfoloji>%4 olan normozoospermik semen örnekleri ve sperm volümü 1,5 ml'den fazla olan, sayısı 15 milyonun üzerinde, hareketliliğin %40'tan az Morfoloji>%4 olan astenozoospermik semen örnekleri çalışmaya dahil edilecektir.

Semen örnekleri mastürbasyon yöntemi ile 3-4 günlük ideal cinsel perhiz sonrası elde edilecektir. Mastürbasyonla elde edilen semen örneği steril ve geniş ağızlı bir kaptan toplanacak ve semenin likefikasyonu için oda sıcaklığında 30 dakika beklenenecektir. Tüm örnekler makroskobik olarak değerlendirildikten sonra mikroskobik değerlendirme ile sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi ve vitalitesi değerlendirilmiştir.

Hastalardan elde edilen taze semen örnekleri çalışmamız için altı farklı gruba ayrılmıştır.. Oluşturulan bu gruplar aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışma için oluşturulan gruplar

Gruplar	
1. GRUP	SADECE GRADİENT YÖNTEMİ İLE YIKANMIŞ NORMOZOOSPERMİ GRUP
2. GRUP	NORMOSPERMİK SEMEN+GRADİENT+DONDURMA MEDYUMU
3. GRUP	NORMOSPERMİK SEMEN+GRADİENT+DONDURMA MEDYUMU+Ceratonia siliqua L.
4. GRUP	SADECE GRADİENT YÖNTEMİ İLE YIKANMIŞ ASTENOZOOSPERMİ GRUP
5. GRUP	ASTENOZOOSPERMİK SEMEN+GRADİENT+DONDURMA MEDYUMU
6. GRUP	ASTENOZOOSPERMİK SEMEN+GRADİENT+DONDURMA +Ceratonia siliqua L.

Tüm hastalarda sperm parametreleri (konsantrasyon, motilite, morfoloji ve vitalite) dondurma öncesinde (taze semen) ve çözme sonrasında belirlenmiştir. Bulguların aritmetik ortalamaları hesaplanarak dondurma öncesi ve çözme sonrası değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Sperm analizi parametrelerinden, % motilite, konsantrasyon (mil/ml), % vitalite, % normal morfoloji, % normal DNA fragmentasyon değerleri ve sperm yıkama prosedürü WHO kriterlerine uygun olarak yapılmıştır [WHO, 2010].

Örnekler mastürbasyon yoluyla alındıktan sonra 37°C'lik etüvde 15 dakika bekletilerek likefiye edilmiş.. Likefiye olmayan örnekler pipet ile al ver yapılarak likefiye olması sağlandıktan sonra değerlendirilmiştir.. Sperm örneklerinin analizi, örnek verildikten ilk 45 dakikalık sürede tamamlanmıştır. Tüm örnekler analiz süresince 37 dereceye sabitlenmiş ısıtıcı tablada tutulmuştur. Tüm analizler en az 100 sperm hücresi sayılarak yapılmıştır. Dondurmaya uygun olmayacak kadar düşük sperm sayısına ya da kalitesine sahip olan örnekler çalışmaya alınmamıştır.

4.2. Sperm Konsantrasyonu

Semen örneğinden Makler sayma kamarasına 10 µl koyulduktan sonra, faz kontrast mikroskopunda, 40X objektif altında tüm kareler (100 kare) sayılarak sperm konsantrasyonu mil/ml olarak belirlenmiştir. . Çalışmamızda, sperm konsantrasyonu >15 mil/ml olan örnekler normal olarak değerlendirilmiştir (80).

4.3. Sperm Motilitesi

Likefiye olmuş semen örneğinden lam üzerine 10 µl koyulduktan sonra, Makler sayım kamerasında, 40X objektifte motilite değerlendirilmiştir. Motilite değerlendirilmesin +4, +3, +2 ve +1 olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır.

+4 motilite ; belli bir doğruluda ileri hızlı hareketli spermeler

+3 motilite; belli bir doğrultuda ileri hareketli fakat +4 e göre yavaş

+2 motilite ; sadece yerinde hareketli spermeler

+1 motilite ; immotil yani haretsiz spermelerdir

200 adet sperm değerlendirilerek motilite değeri %4, %3, %2 ve %1 olarak belirlenmiştir. total motilite değeri ise, %4, %3 ve %2 motilitenin toplamı alınarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda, sperm % toplam motilite değeri > %40 olan örnekler normal olarak değerlendirilerek çalışmaya alınmıştır (80).

4.4. Sperm Morfolojisi

1. Preparat Hazırlığı:

37°C'de likefiye edilmiş semenden 5 µl alınarak bir lam üzerine dilüe edilmeden ince bir film tabakası şeklinde yayılır. Hazırlanan preparat, havada 15 dakika boyunca kurumaya bırakılır.

2. Fiksatif Kullanımı:

Preparat, dik şekilde bir şale içinde bulunan SpermDif-Quik A Fiksatifine en az 5 kez, en fazla 10 kez daldırılır. Lamin kenarı şaleye değdirilip fazla sıvı akıtılır. Steril distile su ile yavaşça yıkanır ve bir kurutma kağıdı ile fazla su emdirilir.

3. Stain I Uygulaması:

Preparat, dik bir şale içerisinde yer alan SpermDif-Quik Stain I solüsyonuna en az 5 kez, en fazla 10 kez daldırılır. Fazla boya lamin kenarından akıtılır.

4. Stain II Uygulaması:

Preparat, aynı yöntemle SpermDif-Quik Stain II solüsyonuna en az 5 kez, en fazla 10 kez daldırılır. Steril distile su ile yıkanıp kurutma kağıdıyla fazla su emdirilir.

5. Kurutma ve İnceleme:

Preparat hava ile kurutulur. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra preparat tamamen kurduğunda inceleme yapılabilir.

6. Mikroskopik İnceleme:

Preparat, immersiyon yağı altında 100x büyütmeli ışık mikroskobu kullanılarak incelenir. Tüm alanlar taranarak en az 200 sperm sayılır ve her anormallik kaydedilir. Sonuçlar yüzde olarak ifade edilir.

7. Değerlendirme:

Kruger kriterlerine göre, normal morfolojiye sahip spermiler için %4 ve üzeri oranlar normal kabul edilir.

8. Boyama Özellikleri:

- Akrozomal Bölge: Açık mor renkte boyanır.
- Postakrozomal Bölge, Boyun ve Kuyruk: Koyu mor renkte boyanır.
- Fiksatif: Metanol bazlı, Fast Green boya içerir.
- Stain I: Kstanten içerikli fosfat tampon ve sodyum azid koruyucu bulundurur.

Stain II: Fosfat tamponlu thiazine içermektedir



Şekil 17. Çalışmamızda morfoloji değerlendirme için kullandığımız SpermiDif-Quik boyaları.

8.1. Sperm Vitalitesi

Oda sıcaklığında likefiye olmuş örnek lam üzerine 10 µl koyulduktan sonra Eosin- Y solüsyonundan 10 µl (1:1 oranında) eklenip lamel ile kapatılarak 30 sn sonra değerlendirilir. 40X objektifte 200 sperm değerlendirilmiştir. Boyayı almayan spermiler canlı, boyayı alan spermiler ise ölü olarak gruplandırılarak canlı spermilerin oranı, % vitalite olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda sigma aldrich markası EOSİN Y boyası kullanılmıştır.



Şekil 18. Çalışmamızda vitalite değerlendirmede kullandığımız Eosin Y boyası

8.2. Sperm Yıkama

sperm yıkama işlemi iki fazlı gradient yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla PureSperm ve PureWash çözeltileri ile %90 'lık ve %45 lik iki farklı yoğunluğa sahip medyumuları kullanılmıştır.

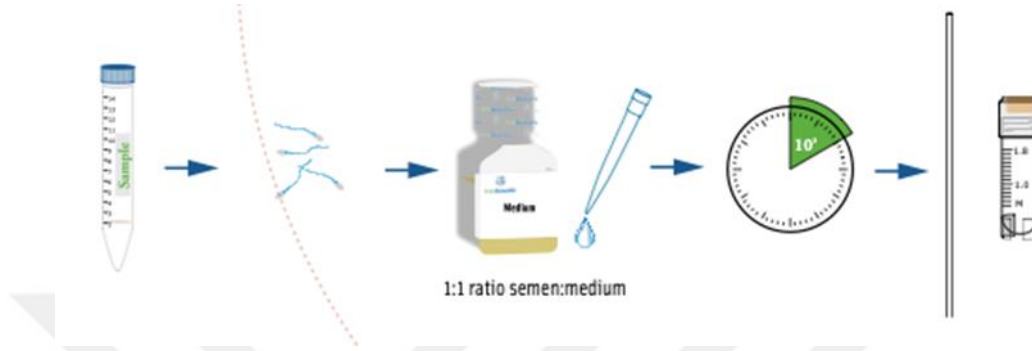
Tüpe, önceden oda ısısına getirilmiş % 45'lik gradient medyumu daha sonra en dibe indirerek yavaşça %90 'lık medyumunu 1'er ml yavaşça koyularak birbirine karışmayan iki tabaka elde edilmiştir. 30 dk boyunca 37 °C de Likefiye olmuş semen örneğinden 1 ml'si, bu tabakaların üzerine yavaşça koyulduktan sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Spermeleri içeren en alt tabakada meydana gelen çökelti pipet yardımıyla çekilip içerisinde sperm wash medyumunu olan başka bir tüpe aktarılmıştır. 1600 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Üst sıvı bir pipet ile alınmıştır. . Tüpün dibinde 400 ml kalacak şekilde üst sıvı alınıp, kalan süspansiyon çalkalanarak karıştırıldıktan sonra yıkama öncesinde uygulanan yöntemler kullanılarak yıkama sonrası spermelerin motilite, konsantrasyon, vitalite ve morfoloji değerleri belirlenmiştir.

8.3. Sperm Kriyoprezervasyonu

1. Semen, 2-3 günlük cinsel perhizden sonra mastürbasyon yoluyla steril bir kap içerisine alınmalıdır.
2. Çalışılacak semen örneği 37°C'de 15-30 dakika likefiye olur.
3. Likefiye olan örneği sperm parametreleri açısından değerlendirilir.
4. Daha 5 mL'lik tüplere ayrılmış sperm dondurma mediumu sperm dondurmadan önce oda sıcaklığında 37°C'ye getirilir.
5. gradient yöntemiyle yıkanmış semen örneği , steril, 15 mL'lik konik bir santrifüj tüpüne aktarılır, ejakülat hacmi belirlenir ve dondurma Medium , semen /dondurma mediumu oranı 1:1 olacak şekilde 30 saniye boyunca yavaş yavaş damla damla eklenir. Her damla ekledikten sonra iyice karıştırılır. burada dikkat edilmesi gereken husus kabarcık oluşturmamaktır.
6. semen örneği üzerine yavaş yavaş tüm dondurma mediumu eklendikten sonra Karışımın oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika dengelenmesine izin verilir.

7. sperm dondurma mediumu karışımı vial e aktarılır.. Genleşmeye izin vermek için vialler aşırı doldurulmaz. viallerin ağzı sıkıca kapatılır.

vial can e bağlanmalı ve bir saat boyunca sıvı nitrojen buharına maruz bırakılmalıdır. daha sonra tanktaki yerine yerleştirilmelidir.



Şekil 19. Sperm dondurma protokolü

7.1. Sperm çözme

Sperm Çözme işlemi (thaw) , vialler sıvı azottan çıkartılıp 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37 derecelik su banyosunda hiç hareket edilmeden bekletilir. Vial içerisindeki sperm örneğtamamen çözülüp buz formundan sıvı forma geçtiğinde üzerine sperm yıkama mediumu (Vitrolife, G-SPERMTM PLUS, 10107) eklenir..1300 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır ve böylelikle kriyoprotektan ortamdan uzaklaştırılır. Çözme işlemi sonrası elde edilen sperm hücreleri sperm fonksiyon parametreleri bakımından incelenir.

7.2. Acridine Orange (Akridin Turuncusu) Boyama

Akridin turuncusu asidik koşullarda denatüre olmuş DNA’ nın boyanmasını sağlayan bir boyadır. Akridin turuncusu asidik koşullarda yeşilden turuncuya dönüşür. Bu esasa dayanarak DNA denatürasyonunun floresan mikroskopta değerlendirilmesini sağlar. Boya normal DNA’ ya bağlandığında yeşil floresan, denatüre olmuş DNA’ ya bağlandığında kırmızı floresan verir (139).

Özel solüsyonlar ile yıkanarak plazma, ölü sperm ve diğer hücrelerden arındırılan semen örneğinden, 20 µl alınarak yayma preparat hazırlandı. Carnoy fiksatifinde

yaklaşık 1 saat bekletildikten sonra, havada kurutulup akridin oranj boyasına alındı. Karanlık ortamda 5 dakika boyada bekletildikten sonra distile suyla yıkanıp floresan mikroskopunda 450-490 nm dalga boyunda incelendi Yeşil floresan görüntüsü veren spermiler normal, sarı-turuncu floresan görüntüsü veren spermiler ise hasarlı DNA'ya sahip olarak değerlendirilip, ortalama 100 sperm hücresi sayılarak DNA fragmentasyon yüzdesi hesaplandı.

Stok akridin oranj çözeltisi ve diğer solüsyonların hazırlanışı:

%1 AO distile suda hazırlanır (1gr AO/100 ml distile suda çözülür)

0,1 molar sitrik asit (19,212gr/ 1 litre distile su)

0,3 molar Na₂HPO₄.H₂O (47,991gr/ 1 litre distile su)

Carnoy fiksatif hazırlanması ;

Metanol.....75 ml

Asetik asit.....25 ml

Boya çözeltisinin hazırlanması;

%1 Akridin Oranj.....25 ml

0,1 mol/l sitrik asit.....10 ml

0,3 M Na₂HPO₄.....300 µl

7.3.Keçiboynuzu Özütünün Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan bitki örnekleri aktardan satın alındı. Satın alınan bitki örneklerinin organoleptik özelliklerinin uygun olmasına dikkat edildiğinden doğada yetiştirilerek toplanmış örneklerden elde edilmiş olanlar tercih edildi.

keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*) meyvesi örnekleri öncelikle gölgede kurutuldu.

Kurutulmuş örnekler, havan ve havaneli kullanılarak önce kaba parçalar haline getirildi.

Daha sonra, blender yardımı ile kaba parçalar iyice parçalanarak toz haline getirildi

Elde edilen keçiboynuzu tozları çalışmada kullanılan 0.001g tartıldı.

Son konsantrasyon %0.01 olacak şekilde 10’ar ml Ham’s F-10 (Irvine, USA) solüsyonunda oda sıcaklığında 6 saat boyunca maserasyona bırakıldı.

Maserasyon sonunda solüsyon Whatman No.1 süzgeç kâğıdından süzölerek çalışmada kullanılacak son konsantrasyonları sırasıyla %0.01 olan bitki ekstreleri elde edildi (Yusuf ve ark., 2017).

Elde edilen bitki ekstreleri çalışmada kullanılmak için tüplere ayrıldı tüp ağızları parafilm ile sarılarak +4oC’de saklandı.

Çalışmadan önce 37 C ye getirilen örnekler kullnıldı.

7.4.İstatistiksel Analiz

Değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler verildi. Altı değişken incelendi. İstatistik yöntem olarak bağımsız iki grubu karşılaştıran Student’s t testi kullanıldı. Verilerin normallik kontrolü Kolmogorov Smirnov Testi ile test edildi. Veriler normal dağıldığı için, Students ‘t testi kullanıldı.Grupların sperm parametreleri (motilite ve vitalite) arasındaki korelasyon ise Pearson kolerasyon testi kullanılarak yapılmıştır. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık düzeyi olarak $p=0,05$ sınır kabul edildi. Veriler %95 güvenle analiz edildi.

8. BULGULAR

8.1. Yaş

Hastaların yaş ortalamaları normozoospermi grupta 31.5 (± 5.2) iken, astenozoospermi grupta 33.2 (± 4.8) 'dir . Normozoospermik ve astenozoospermik gruplar arasında istatistiksel bir fark elde edilememiştir. ($p > 0.05$).

8.2. Semen Volümü

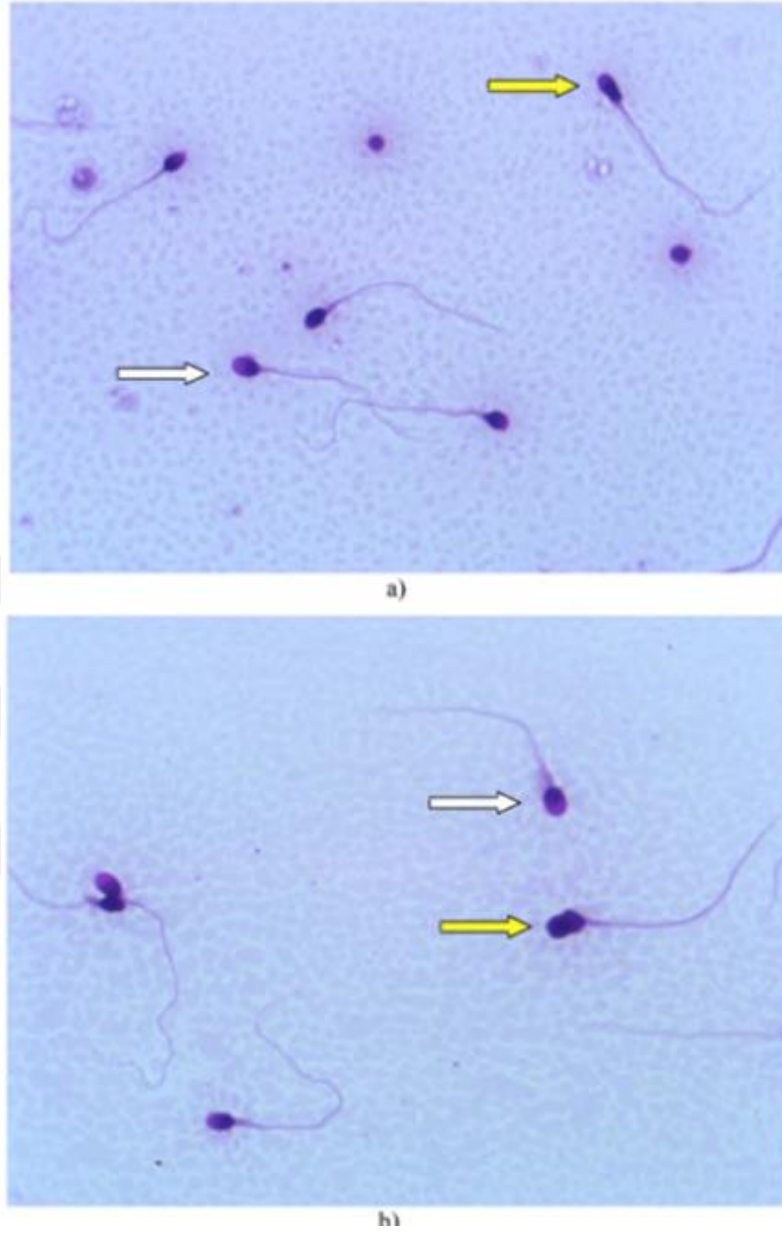
Semen volümü, normozoospermik grup ile astozoospermik grup karşılaştırılmış ve normozoospermik grubun semen volümü astenozoospermik gruba göre daha yüksek bulunmuştur (3.25 ± 1.06 ; 2.92 ± 0.8). Bu iki grubun semen volumü karşılaştırması için yapılan istatistiksel test sonrası normozoospermik ve astenozoospermik gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

8.3. Sperm Konsantrasyonu

Sperm konsantrasyonları (milyon/ml), normozoospermi grupta ortalama $38.30 (\pm 16.245)$, astenozoosperi grupta ortalama $29.20 (\pm 13.673)$ 'dir. Bu iki grubun semen volumü karşılaştırması için yapılan istatistiksel test sonrası normozoospermik ve astenozoospermik gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

8.4. Morfoloji

Sperm morfolojisi (Kruger > 4), normozoospermi grupta ortalama $4,6 (\pm 3.2)$, astenozoospermi grubunda ortalama $3,7 (\pm 3,3)$ 'dir. Bu iki grubun semen morfolojisinin karşılaştırması için yapılan istatistiksel test sonrası normozoospermik ve astenozoospermik gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 20. a.)şekli normozospermi grubuna ait morfoloji b.)grubu astenozoospermik gruba ait morfoloji (x40). sarı renkli ok anormal, beyaz renkli ok normal spermleri göstermekte

8.5. Motilite

Sperm örneklerinde prograssif ve nonprograssif olmak üzere toplam motilite değerleri gösterilmiştir. Değerler her grup için (n=25); %Toplam motilite $\pm$ Standart sapma olarak verilmiş olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Vitrifikasyon öncesi ve çözme sonrası sperm motilitesinde gözlenen değişim karşılaştırıldığında, dondurup çözünen spermin motilitesinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) düzeyde bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir.

sadece gradient yöntemi ile yıkanmış normospermik semen örneklerinin progresif ve nonprogresif olmak üzere toplam hareketliliğinin ortalama yüzde değeri $73\pm9,6$ iken bu değer 2. grup olan keçiboynuzu eklenmeden dondurulup çözülen sperm hareketliliği ile karşılaştırıldığında, hareketliliğin $\%20\pm7,2$ 'ye kadar azaldığı görülmüştür.

Sadece gradient ile yıkanmış semen örnekleri dışında , graiente ek olarak keçiboynuzu eklenerek dondurulup çözülen örneklerin toplam yüzde motilite değerlerine baktığımızda da donmanın sperm hareketliliği üzerinde tüm gruplarda anlamlı ($p<0,05$) düzeyde azalış olduğu görülmüştür (Şekil3.1.)

Gruplar karşılaştırıldığında 3. Grup (normospermik Semen+Dondurma Medyumu+keçiboynuzu) motilite $\%33\pm7,2$ ve 6. Grup (astenospermik semen Semen+Dondurma Medyumu+ keçiboynuzu)'larda ortalama sperm hareketliliği $\%28\pm6,1$ 'dir . Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında (2., 5. ve 6.) göre sperm hareketliliğinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) düzeyde daha fazla olduğu görülmüştür.

2.Grup (Semen+Dondurma Medyumu+), 5. Grup (Semen+Dondurma Medyumu+) ve 1 ve 4. Grup (Semen+Dondurma Medyumu+keçiboynuzu) grupları arasında toplam yüzde motilite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,925$, $p=0,256$) düzeyde bir fark görülmemiştir.

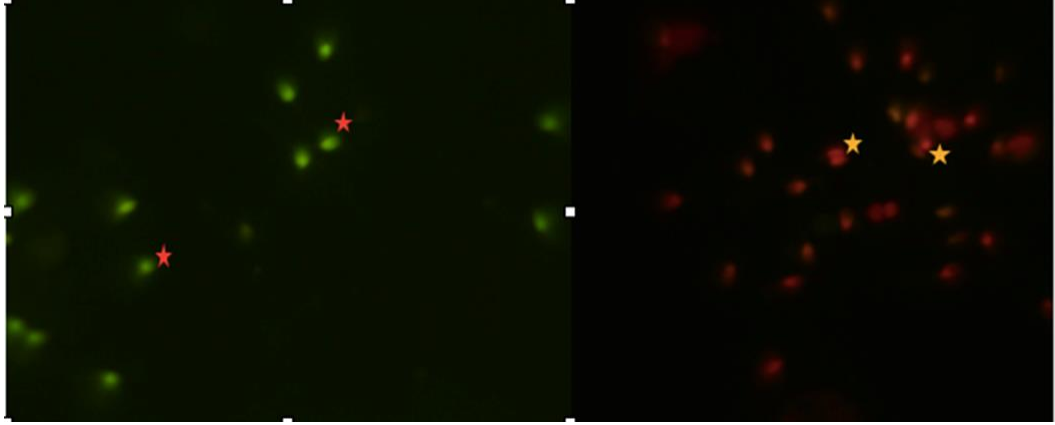
1 ve 4.. Grup yalnızca Semen+Dondurma Medyumu ile dondurulup çözülen grup olup $\%20\pm7,2$ değeriyle en az sperm hareketliliği gösteren gruptur

Tablo 3. Sperm Motilite Sonuçları

Grup	Ortalama Motilite (%)	Karşılaştırma Sonucu
1. Grup: Normospermik Gradient Yıkama	73 ± 9.6	Gradient ile yıkanmış ve keçiboynuzu olmayan gruplar arasında fark anlamlı (p < 0.05).
2. Grup: Normospermik Gradient + Dondurma (Keçiboynuzu Yok)	20 ± 7.2	Keçiboynuzu olmayan gruplar arasında fark yok (p = 0.925).
3. Grup: Normospermik Gradient + Dondurma (Keçiboynuzu Var)	33 ± 7.2	Keçiboynuzu eklenen gruplarda fark anlamlı (p < 0.05).
4. Grup: Astenospermik Gradient + Dondurma (Keçiboynuzu Var)	28 ± 6.1	Dondurulan örneklerde keçiboynuzu eklenen grup avantajlı (p < 0.05).
5. Grup: Normospermik Gradient + Dondurma Medyumu	20 ± 7.2	Anlamlı fark yok (p = 0.256).
6. Grup: Astenospermik Gradient + Dondurma Medyumu	20 ± 7.2	Anlamlı fark yok (p = 0.256).

8.6. DNA Fragmantasyonu

Vitrifikasyon öncesi ve dondurup çözme işlemi sonrası DNA fragmantasyonu değişimlerin değerlendirilme işlemi akridin orange yöntemi ile yapılmış olup floresan mikroskopunda 450-490 nm dalga boyunda incelenmiştir. Yeşil floresan görüntüsü veren spermiler normal, sarı-turuncu floresan görüntüsü veren spermiler ise hasarlı DNA'ya sahip olarak kabul edilmiştir.



Şekil 21. Sperm DNA Fragmentasyonu Akridin Oranj Boyama (x40). A şekli normozospermiye ait gruba B şekli astenozospermi gruba aittir. kırmızı yıldız: normal DNA'lı spermeleri, sarıyıldız: hasarlı DNA'lı spermeleri göstermekte

Sadece gradient yöntemi ile yıkanmış normospermik sperm örneklerinde $78,9 \pm 9,3$ sağlıklı DNA fragmentasyon oranı görülürken bu oran dondurup çözme sonrası normospermik semen örneklerde $23,3 \pm 7,2$ 'lere kadar düşmüş olup tüm kriyopreservasyon işlemi uygulanmış gruplar ile sadece gradient yöntemi ile yıkanmış normospermik semen örneği karşılaştırıldığında sağlıklı DNA fragmentasyon oranında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) düzeyde azalış görülmüştür.

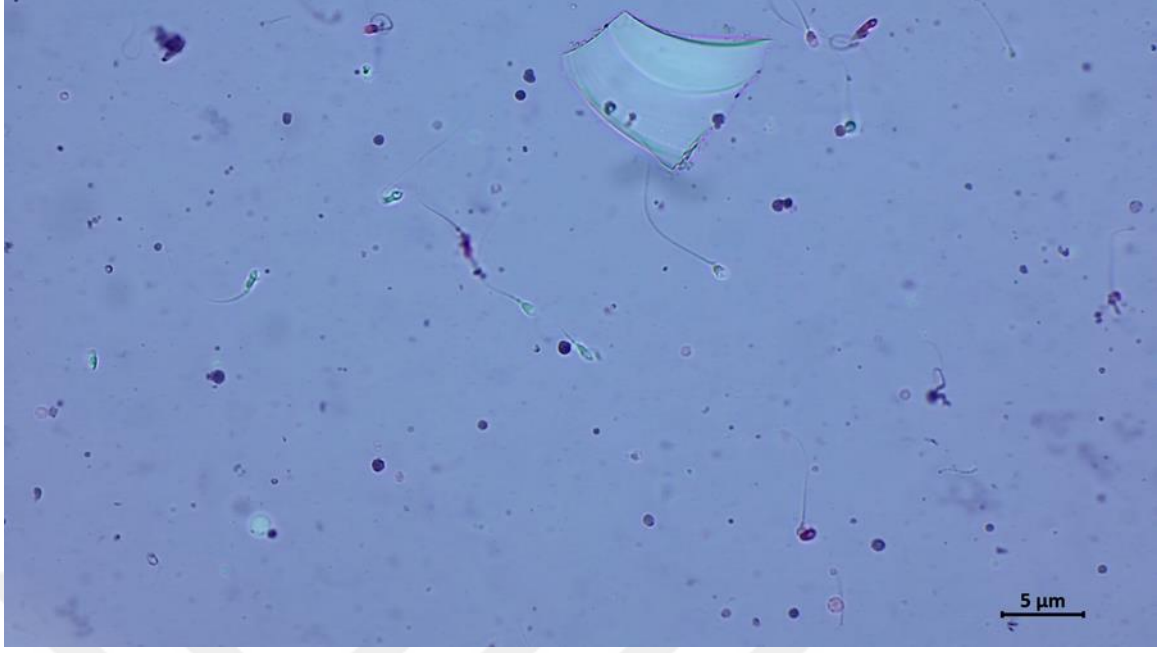
Kriyopreservasyon işlemi uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasada keçiboynuzu eklemiş örneklerde sağlıklı DNA'lı sperm sayısında artış gözlenmiştir. Keçiboynuzu eklenmeden kriyopreservasyon işlemi uygulanmış grubun % sağlıklı DNA fragmentasyon oranı $23,3 \pm 7,2$ olarak bulunmuş olup en düşük sağlıklı DNA'lı sperm bu grupta olduğu görülmüştür.

Tablo 4. Sperm DNA fragmentasyon Sonuçları

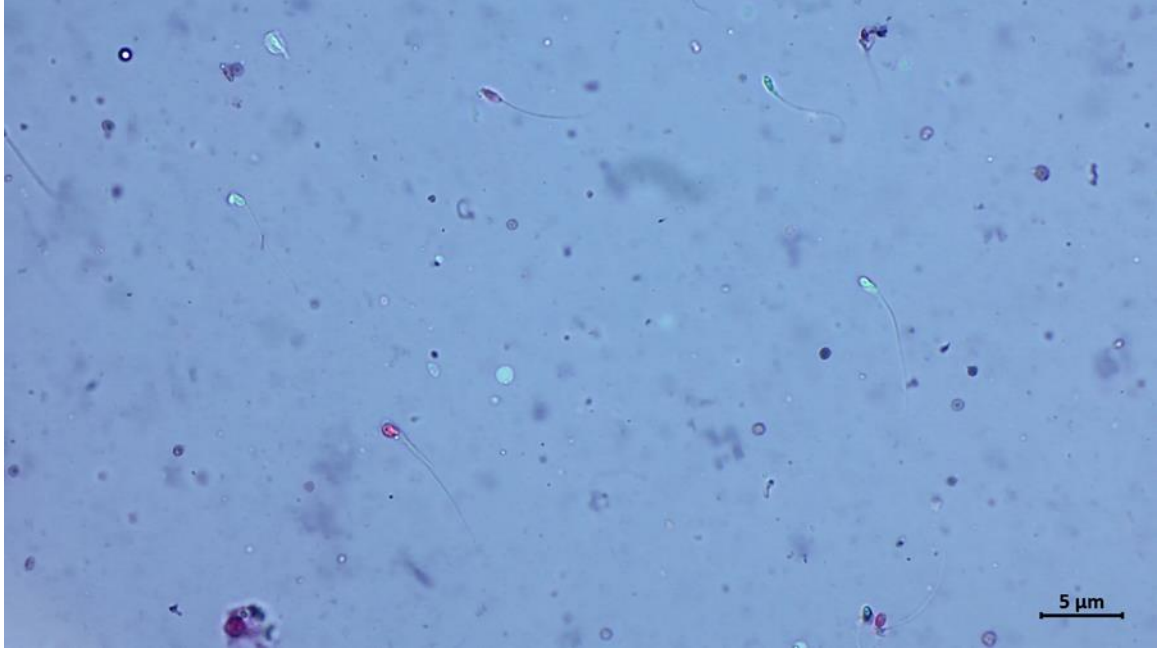
Grup	% Sağlıklı DNA Fragmentasyon Oranı	Karşılaştırma Sonucu
1. Grup: Normospermik Gradient Yıkama	78.9 ± 9.3	Gradient ile yıkanmış grup ile diğer gruplar arasında anlamlı fark (p < 0.05).
2. Grup: Normospermik Gradient + Dondurma (Keçiboynuzu Yok)	23.3 ± 7.2	Gradient grubuna kıyasla anlamlı azalış (p < 0.05).
3. Grup: Normospermik Gradient + Dondurma (Keçiboynuzu Var)	Artış gözlemlendi	Keçiboynuzu eklenen gruplarda artış gözlemlendi (istatistiksel anlamlılık yok).
4. Grup: Astenospermik Gradient + Dondurma (Keçiboynuzu Var)	Artış gözlemlendi	Keçiboynuzu eklenen gruplarda artış gözlemlendi (istatistiksel anlamlılık yok).
5. Grup: Normospermik Gradient + Dondurma Medyumu	23.3 ± 7.2	En düşük sağlıklı DNA oranı bu grupta (p < 0.05).
6. Grup: Astenospermik Gradient + Dondurma Medyumu	23.3 ± 7.2	En düşük sağlıklı DNA oranı bu grupta (p < 0.05).

8.7. Vitalite (Plazma Memran Bütünlüğü)

Vitrifikasyon öncesi ve dondurup çözme işlemi sonrası vitalite değişimlerin değerlendirilme işlemi eosin y boyama yöntemi ile yapılmış olup incelenmiştir. Işık mikroskopunun 40X objektifi ile en az 100 sperm sayılarak değerlendirilmiştir. Boyayı almayan spermeler canlı, boyayı alan spermeler ise ölü spermeler olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 22. Normospermi örneklerinde sperm vitalite eosin y boyama (x40)



Şekil 23. Astenospermi örneklerinde sperm vitalite eosin y boyama (x40)

Vitalite değerlendirmesi yaptığımızda dondurup çözme işleminin vitrifikasyona olumsuz bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Sadece gradient yapılan normospermik semen örneklerinde $82 \pm 8,5$ oranında vitalite gözlenirken bu oran dondurup çözme sonrası normospermik semen örneklerde 27 ± 6 'lara kadar düşmüş olup tüm kriyopreservasyon işlemi uygulanmış gruplar ile taze semen karşılaştırıldığında plazma membran bütünlüğünde istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı düzeyde azalış görülmüştür .

Dondurulup çözülen gruplar arasındaki karşılaştırmaya baktığımızda normospermik Semen+Dondurma Medyumu+keçiyoynuzu eklenmiş olan grupta $38,55 \pm 6,151$ oranında vitalite görülmüş olup bu oran diğer dondurulup çözülmüş olan gruplar arasında en yüksek değerdir ve karşılaştırıldığında ($p < 0,05$) anlamlı düzeyde fark görülmüştür.

Ancak vitalite açısından sadece gradient yöntemi ile yıkanmış normospermik ve astenospermik gruplar arasında anlamlı ($p = 0,997$) düzeyde bir fark bulunamamıştır.

2 ve 5. Gruplar arasında ($p = 0,784$, $p = 0,213$) % plazma membran bütünlüğü değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Tablo 5. Sperm vitalite Sonuçları

Grup	Vitalite (%)	Karşılaştırma Sonucu
1. Grup: Gradient ile yıkanmış normospermik semen	82 ± 8.5	Gradient grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı fark (p < 0.05).
2. Grup: Dondurulup çözülmüş normospermik semen (Keçiboynuzu Yok)	27 ± 6	Gradient grubuna kıyasla anlamlı azalış (p < 0.05).
3. Grup: Dondurulup çözülmüş normospermik semen (Keçiboynuzu Var)	38.55 ± 6.15	Keçiboynuzu eklenen grupta en yüksek değer, diğer dondurulmuş gruplara göre fark anlamlı (p < 0.05).
4. Grup: Dondurulup çözülmüş astenospermik semen (Keçiboynuzu Var)	34 ± 6	Keçiboynuzu eklenmiş astenospermik grup, diğer dondurulmuş gruplara göre artış gösterdi (p < 0.05).
5. Grup: Dondurulup çözülmüş normospermik semen (Dondurma Medyumu)	27 ± 6	Anlamlı fark yok (p = 0.784).
6. Grup: Dondurulup çözülmüş astenospermik semen (Dondurma Medyumu)	27 ± 6	Anlamlı fark yok (p = 0.213).

9. TARTIŞMA

Bitkilerin sağlık alanında kullanımı insanlık tarihi boyunca yaygın bir uygulama olmuştur. Günümüzde modern tıpta kullanılan birçok ilaç da bitkilerden türetilmiştir. Farklı kültürlerde bitkisel tedaviler, çeşitli yaklaşımlar benimsenerek uygulanmıştır. Örneğin, Batı herbalizminde bitkiler genellikle tek başına kullanılırken, Çin Tıbbı'nda karışımlar daha yaygındır (140).

Çin Tıbbı, Ayurveda, Unani, Kampo, Nöropati ve Homeopati gibi geleneksel sistemlerde bitkiler sıkça kullanılmakta, Osteopatide ise zaman zaman başvurulmaktadır. Hindistan, Çin, Kore, Endonezya, Kanada ve Nijerya gibi ülkeler, ulusal politikalarında ve sağlık sistemlerinde geleneksel tıbaa yer verirken, Japonya, Birleşik Arap Emirlikleri, Amerika, Almanya ve Avustralya gibi ülkelerde bu konuda düzenlemeler daha az yaygındır (141,142).

Bitkisel terapiler, düşük maliyetli olmaları, kolay erişilebilirlikleri, kimyasal ilaçların yan etkilerine duyulan endişeler ve invaziv olmayan bir yaklaşım sunmaları nedeniyle infertilite tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Kullanıcı profiline bakıldığında, bu terapilerin genellikle düşük eğitim düzeyine ve gelire sahip genç çiftler tarafından tercih edildiği görülmektedir. Zını ve arkadaşları (143), infertil erkeklerin %31'inin tamamlayıcı terapi kullandığını ve bunların %64'ünün multivitamin kapsülleri, %20'sinin ise bitkisel ürünler olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, başka bir çalışmada infertil kadınların %27'sinin tamamlayıcı terapilere başvurduğu ve bunların %68'inin bitkisel karışımlar olduğu rapor edilmiştir. Kullanıcıların bu terapilere başvurmalarının temel nedenleri arasında "umut" ve "ilaçların yan etkilerinden kaçınma" bulunmaktadır (144).

Simon ve Ray , kadın infertilitesinde Geleneksel Çin Tıbbı'nda uygulanan bitkisel terapilerin modern tedavi yöntemlerine (ilaçlar, cerrahi vb.) kıyasla anlamlı derecede etkili olduğunu bildiren bir meta-analiz sunmuşlardır (158). Ried ve Stuart (145), Çin Bitkisel Terapisi alan infertil kadınların, standart tedavi gören ve IVF uygulanan kadınlara göre üç kat daha fazla gebe kaldığını belirtmiştir. İlk dört ayda bitkisel terapi ile gebe kalma oranı %60 iken, bu oran ilaç tedavilerinde %30 olarak kaydedilmiştir. IVF ile tedavi edilen grupta ise 12 ay içinde gebelik oranı bulunmamıştır. Başka bir

çalışmada, IVF ile birlikte eşzamanlı olarak akupunktur ve Çin Bitkisel Terapisi uygulanan kadınların, kontrol grubuna göre daha yüksek gebelik oranlarına ve gebeliğin sürdürülebilirliğine sahip olduğu gözlemlenmiştir (146).

Randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, on iki hafta boyunca bitkisel karışım kullanan erektil disfonksiyonlu erkeklerin kontrol grubuna kıyasla daha iyi ereksiyon sağladığı ve cinsel birleşmeden daha fazla tatmin olduğu tespit edilmiştir (147). Japonya'da Kapon Tıbbı'nda kullanılan bitkilerin, özellikle erkek infertilitesinde hipogonadizm ve erektil disfonksiyon tedavisinde %71'e kadar iyileşme sağladığı bildirilmiştir (148). Devi ve arkadaşları (149), idiopatik oligospermili hastaları iki gruba ayırmış ve on üç hafta boyunca birinci gruba Testosterone undecanoate gibi alopantik ilaçlar, ikinci gruba ise bitkisel ürünler vermiştir. Üçüncü ay sonunda her iki grupta sperm sayısı ve motilitesinde artış görülmüş, ancak bitkisel terapi grubunda bu artış anlamlı düzeyde daha fazla olmuştur.

Çalışmamızda, kriyoprezervasyon işlemi sonrası sperm motilitesinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgu, literatürdeki önceki çalışmalarla uyumludur. Örneğin, Moghbelinejad ve arkadaşları (2019), kriyoprezervasyonun sperm hareketliliği üzerinde oksidatif stres kaynaklı olumsuz etkiler yarattığını bildirmiştir. Hu ve arkadaşları 2020 yılında yaptığı bir çalışmada ise kriyoprezervasyonun hücre içi enerji dengesini bozarak motiliteyi azalttığını ifade etmiştir(156). Çalışmamızda, keçiboynuzu özütü eklenmesinin motilite kaybını anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Bu sonuç, keçiboynuzunun içerdiği antioksidan bileşiklerin oksidatif stresi hafifletici etkilerini desteklemektedir. Goulart ve arkadaşları özellikle, fenolik bileşiklerin reaktif oksijen türlerini nötralize ederek hücresel fonksiyonları koruduğu literatürde belirtilmiştir (154). Benzer şekilde, Ozkaya ve arkadaşları (2021), doğal antioksidanların sperm motilitesini iyileştirme üzerindeki olumlu etkilerini vurgulamışlardır. Wang ve arkadaşları, kırmızı üzüm çekirdeği ekstresinin oksidatif strese bağlı sperm hasarını önlemedeki etkisini göstermiştir (160).

Kriyoprezervasyon işleminin sperm DNA bütünlüğüne zarar verdiği çalışmalarımızda net bir şekilde ortaya çıkmıştır. DNA fragmentasyonu, kriyoprezervasyonun en yaygın ve ciddi sonuçlarından biri olarak literatürde sıklıkla rapor edilmiştir (150). Keçiboynuzu özütü eklenmesinin DNA fragmentasyonu oranlarını azalttığı

gözlendi. Bu durum, keçi boynuzunun antioksidan özellikleriyle ilişkilendirilmektedir. Daha önceki araştırmalar, antioksidanların oksidatif hasarı sınırlayarak DNA bütünlüğünü koruma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (151). Hasanpour ve arkadaşları (2021), bitkisel antioksidanların sperm DNA'sını kriyoprezervasyona bağlı oksidatif strese karşı koruyabileceğini rapor etmişlerdir (155). Saeed ve arkadaşları 2020 yılında yaptığı çalışmada, kriyoprezervasyon sırasında kullanılan bitkisel ekstraktların DNA bütünlüğü üzerindeki pozitif etkilerini vurgulamıştır (157). Ezzati ve arkadaşları (2019) ise yeşil çay polifenollerinin sperm DNA'sını oksidatif strese karşı koruma üzerindeki etkilerini göstermiştir (153).

Watson ve arkadaşları 2000 yılında Vitalite değerlendirmeleri, kriyoprezervasyonun sperm hücrelerinin canlılığı üzerinde olumsuz etkiler yarattığını göstermiştir. Plazma membran bütünlüğü, dondurma ve çözme işlemleri sırasında oluşan buz kristallerinin membran hasarına neden olması sebebiyle zarar görmektedir (159). Keçi boynuzunu özütünün vitalite kaybını anlamlı ölçüde azalttığı bulunmuştur. Bu sonuç, keçi boynuzunun membran stabilitesini artırıcı etkisiyle ilişkilendirilmektedir. Delgado ve arkadaşları (2019), keçi boynuzunun fenolik bileşikler içeren ekstraktlarının membran koruyucu etkilerini rapor etmiştir (152). Benzer şekilde, Zafar ve arkadaşları 2018 yılında (161), fenolik bileşiklerin membran bütünlüğünü iyileştirdiğini belirtmiştir. Rahman ve arkadaşları (2020) ise zerdeçal kökenli curcumin maddesinin kriyoprezervasyon sırasında membran bütünlüğünü koruma üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur (162).

10.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda son yıllarda hızlı gelişim gösteren IVF laboratuvarlarının ayrılmaz bir parçası olan kriyoprezervasyon konusunu ele aldık. İnfertil erkeklerde sperm hücrelerinin dondurulması, spermin motilitesini, morfolojiyi, DNA bütünlüğünü ve vitalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bütün bu gelişmeler ışığında infertil çiftlerin %40' nı oluşturan erkek faktörüne çözüm bulma arayışlarına hızla devam edilmektedir. Kriyoprezervasyon hakkında bilimsel açıdan açıklanmayı bekleyen bir çok soru vardır. Buda kriyoprezervasyon son yıllarda en fazla çalışılan konular arasında olmasına neden olmuştur. Bu çalışmamızda bizde sperm dondurma ortamına keçiboynuzu ekstrasını ekleyerek sperm motilitesi, vitakitesi ve DNA fragmantasyonuna olan etkisi araştırdık.

Destekleyici tedavilerin arasında sperm kalitesinin arttırılması üzerinde yapılan çalışmalar giderek yoğunlaşmaktadır. Medikal bitkilerin destek tedavisinin spontan gebelik şansı isteyen ya da yardımla üreme tekniklerini kullanarak gebelik olasılığının artmasını isteyen çiftlerde faydalı olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, her medikal bitkinin faydalı olmaması ile birlikte bazılarının sperm morfolojisi, motilitesi ve sayısı üzerine olumlu etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz keçiboynuzu bitki ekstrasının sperm kalitesi değerlendirildiğinde sperm progresif motilite, vitalitesini ve DNA fragmantasyon olumlu yönde etkilediğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, elde ettiğimiz bu veriler in vitro koşullar altında gerçekleştirildiği için öncül çalışma kategorisine girmekte olup uzun vadede antioksidan etkileri göz önünde alındığında keçiboynuzu bitkisinin umut vaat ettiğini gözlemlemiştir.

11.KAYNAKLAR

1. Brydøy M, Fosså SD, Klepp O, Bremnes RM, Wist EA, Wentzel-Larsen T, Dahl O. Paternity following treatment for testicular cancer. J Natl Cancer Inst. 2005 Nov 2;97(21):1580-8.
2. Thorup J, Cortes D, Petersen BL. The incidence of bilateral cryptorchidism is increased and the fertility potential is reduced in sons born to mothers who have smoked during pregnancy. J Urol. 2006 Aug;176(2):734-7.
3. Ho GT, Gardner H, DeWolf WC, Loughlin KR, Morgentaler A. Influence of testicular carcinoma on ipsilateral spermatogenesis. J Urol. 1992 Sep;148(3):821-5.
4. Moore K.L. Persaud T.V.N. The Developing Human Clinically Oriented Embryology. 8th ed, Saunders, 2007:262-270.
5. Elder K, Dale B. In Vitro Fertilisation, 3rd ed, Cambridge University Press, 2011:28-49
6. Basaklar A.C. Langman Medical Embriyoloji, 9. Baskı, Palme Yayınları; 2005:3-30.
7. Gauntier J, Minshull J, Lokha M, et.al. Cyclin is a component of maturation promoting factor from xenopus Cell 1990; 9:60(3):487-494
8. Hassa H. İnfertil olgularda Klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamalar, 1. baskı, Osmangazi Üniversitesi Yayınları 2003:127-138.
9. Şeftalioğlu A. Genel İnsan Embriyolojisi, 2. Baskı, Bayt Ltd, Şti, 1996:7-69.
10. Desai N, Ludgin J, Sharma R, Anirudh R.K., Agarwal Ashok. Female and Male Gametogenesis. Clinical Reproductive Medicine and Surgery; 2007:pp19-45
11. Matsumoto A.M. Anawalt B.D., Male Reproductive Physiology.
12. Eroschenko V.P. di Fiore's Atlas of Histology. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2005 ; 417-419, 445-451.
13. Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. 1. Baskı, Palme Yayınları, 2006: 531-584.
14. Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvarı. 1. Baskı, Veri Medical Yayıncılık, 2008:55-94.
15. Deitzel E. Sperm oocyte interaction. J Reprod Biol Endocrine 2018;2 (2):55-60

16. Rahman A.N.M.A, aBDULLAH RB and Wan- Khadijah WE. Gametogenesis, Fertilization and Early Embryogenesis in Mammals with Special Reference to Goat : A Review . Journal of Biological Sciens, 2008 Volume 8(7):1115-1128.
17. Küpker W, Diedrich K, Edwards RG. Principles of mammalian fertilization. Hum Reprod1998 April ,13 Suppl1:20-32.
18. Tosti E, Menezo Y, Gamete activation : basic knowledge and clinical applications. Hum Reprod Update. 2016 June ; 22(4): 420 -39.
19. Evans JP. The molecular basis of sperm -oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. Hum Reprod Update. 2002 Jul- Aug;8 (4)297-311.
20. Gedikli S, Özbek E, Demirci T. Fertilizasyonun Moleküler Temeli. Van Tıp Dergisi 2013; 20(4): 294-301.
21. Raby B.A. Principles of Molecular Genetics, Slavotinek A (section editor) [https:// www.uptodate.com/contents/principles- of -molecular- genetics? search=%principles%of%molecular%genetics&source=search_result&selectedTitle=1-150&usage_type=default&display_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/principles-of-molecular-genetics?search=%principles%of%molecular%genetics&source=search_result&selectedTitle=1-150&usage_type=default&display_rank=1)
22. Uyar Aytül. Üreme fizyolojisi. Seminer sunusu. Erişim tarihi: 2007.
23. Comninou (2013). "The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction". Human Reproduction Update. 20 (2): 153-74. doi:10.1093/humupd/dmt033. PMID 24173881.
24. Junquera LC, Carneiro J, Temel Histoloji: Text&Atlas. Çeviri Editörleri Prof. Dr. Yener Aytekin, Doç.Dr.Seyhun Solakoğlu. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul; 2009, s: 418-434, ISBN :975-420-467-5.
25. Johnson AD, Gomes WR (editors): The Testis, Vols 1-4. Academic Press, 1970-1977.
26. Trainer TD: Histology of the normal testis. Am J Surg Pathol 1987; 11: 797.
27. Tindall DJ et al: Structure and biochemistry of the Sertoli cell. Int. Rev. Cytol 1985; 94-127.
28. Fawcett DW: The mammalian spermatozoon. Dev Biol 1975;44:394.
29. Eroschenko V. P., Di Fiore M. S. DiFiore's atlas of histology with functional correlations: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, s. 477-488.

30. Deffieux X, Antoine JM: Inhibines, activines et hormone anti- müllerienne: structure, signalisation, rôles et valeur prédictive en médecine de la reproduction. *Gynecol Obstet Fertile* 2003;31:900.
31. Ross M H, Pawlina W, *Histology a Text and Atlas Çeviri Editörü : Barış Baykal* 6. Basım Palme yayıncılık Ankara; 2014, s: 848-849.
32. Bonkhoff H, Remberger K: Morphogenetic aspect of normal and abnormal prostatic growth. *Pathol Res Pract* 1995; 191:833.
33. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ders Notları , <https://www.dicle.edu.tr/Contents/01baef8f-7b2e-4395-afc0-3132c45538c9.pdf>, 2012
34. Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62, 2-10.
35. Sun, H., Gong, T. T., Jiang, Y. T., Zhang, S., Zhao, Y. H., & Wu, Q. J. (2019). Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*, 11(23), 10952.
36. Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature reviews. Urology*, 15(6), 369–384. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
37. Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. *Lancet (London, England)*, 397(10271), 319–333. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
38. Sharma, M., & Leslie, S. W. (2022). Azoospermia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
39. Dohle, G. R., Diemer, T., Kopa, Z., Krausz, C., Giwercman, A., Jungwirth, A., & European Association of Urology Working Group on Male Infertility (2012). European Association of Urology guidelines on vasectomy. *European urology*, 61(1), 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.10.001>
40. Roberts, M., & Jarvi, K. (2009). Steps in the investigation and management of low semen volume in the infertile man. *Canadian Urological Association*

- journal *Journal de l'Association des urologues du Canada*, 3(6), 479–485.
<https://doi.org/10.5489/cuaj.1180>
41. Velasquez, M., & Tanrikut, C. (2014). Surgical management of male infertility: an update. *Translational andrology and urology*, 3(1), 64–76.
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2014.01.05>
 42. Ammar, T., Sidhu, P. S., & Wilkins, C. J. (2012). Male infertility: the role of imaging in diagnosis and management. *The British journal of radiology*, 85 Spec No 1(Spec Iss 1), S59–S68. <https://doi.org/10.1259/bjr/31818161>
 43. Azenabor, A., Ekun, A. O., & Akinloye, O. (2015). Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract. *Journal of reproduction & infertility*, 16(3), 123–129.
 44. Dutta, S., Joshi, K. R., Sengupta, P., & Bhattacharya, K. (2013). Unilateral and bilateral cryptorchidism and its effect on the testicular morphology, histology, accessory sex organs, and sperm count in laboratory mice. *Journal of human reproductive sciences*, 6(2), 106.
 45. Singh, R., Hamada, A. J., Bukavina, L., & Agarwal, A. (2012). Physical deformities relevant to male infertility. *Nature reviews. Urology*, 9(3), 156–174. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.11>
 46. Jain, A. K. C., & Viswanath, S. (2014). Torsion of the testis after hydrocelectomy: an unexpected complication. *OA Case Reports*, 3(1), 10.
 47. Mulhall, J. P., Ghaly, S. W., Aviv, N., & Ahmed, A. (2005). The utility of optical loupe magnification for testis sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *Journal of andrology*, 26(2), 178–181.
<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2005.tb01083.x>
 48. Kukadia, A. N., Ercole, C. J., Gleich, P., Hensleigh, H., & Pryor, J. L. (1996). Testicular trauma: potential impact on reproductive function. *The Journal of urology*, 156(5), 1643–1646. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(01\)65472-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(01)65472-7)
 49. Ping, P., Gu, B. H., Li, P., Huang, Y. R., & Li, Z. (2014). Fertility outcome of patients with testicular tumor: before and after treatment. *Asian journal of andrology*, 16(1), 107–111. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122194>

50. Moller, H., & Skakkebaek, N. E. (1999). Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 318(7183), 559–562. <https://doi.org/10.1136/bmj.318.7183.559>
51. Güney, A. I., Javadova, D., Kırac, D., Ulucan, K., Koc, G., Ergeç, D., Tavukcu, H., & Tarcan, T. (2012). Detection of Y chromosome microdeletions and mitochondrial DNA mutations in male infertility patients. *Genetics and molecular research: GMR*, 11(2), 1039–1048. <https://doi.org/10.4238/2012.April.27.2>
52. Costanzo, P. R., Suárez, S. M., Scaglia, H. E., Zylbersztein, C., Litwak, L. E., & Knoblovits, P. (2014). Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in eugonadal men with type 2 diabetes mellitus. *Andrology*, 2(1), 117–124.
53. Xiong, X., Zhong, A., & Xu, H. (2014). Effect of cyanotoxins on the hypothalamic– pituitary–gonadal axis in male adult mouse. *PloS one*, 9(11), e106585.
54. Kotan, L. D., Hutchins, B. I., Ozkan, Y., Demirel, F., Stoner, H., Cheng, P. J., Esen, I., Gurbuz, F., Bicakci, Y. K., Mengen, E., Yuksel, B., Wray, S., & Topaloglu, A. K. (2014). Mutations in FEZF1 cause Kallmann syndrome. *American journal of human genetics*, 95(3), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.08.0061>
55. Nagler HM, Luntz RK, Martinis FG (1997) Varicocele. In: Lipshultz LI, Howards SS (eds) *Infertility in the male*. St Louis, Mosby, pp 336–368
56. Sengupta, P., Agarwal, A., Pogrebetskaya, M., Roychoudhury, S., Durairajanayagam, D., & Henkel, R. (2018). Role of *Withania somnifera* (Ashwagandha) in the management of male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 36(3), 311–326.
57. Fallahi, S., Rostami, A., Shiadeh, M. N., Behniafar, H., & Paktinat, S. (2018). An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 47(3), 133–140.
58. Kantartzis, P. D., Goulis, C.hD., Goulis, G. D., & Papadimas, I. (2007). Male infertility and varicocele: myths and reality. *Hippokratia*, 11(3), 99–104.

59. Zangbar, M. S., Keshtgar, S., Zolghadri, J., & Ghareesi-Fard, B. (2016). Antisperm protein targets in azoospermia men. *Journal of human reproductive sciences*, 9(1), 47–52. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.178629>
60. Pasqualotto, F. F., Rossi-Ferragut, L. M., Rocha, C. C., Iaconelli, A., Jr, & Borges, E., Jr (2002). Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *The Journal of urology*, 167(4), 1753–1756.
61. Rastrelli, G., Lotti, F., Reisman, Y., Sforza, A., Maggi, M., & Corona, G. (2019). Metabolically healthy and unhealthy obesity in erectile dysfunction and male infertility. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 14(5), 321–334.
62. Pizent, A., Tariba, B., & Živković, T. (2012). Reproductive toxicity of metals in men. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 63 Suppl 1, 35–46. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2151>
63. Ivell R. (2007). Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 5, 15. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-15>
64. Temidayo, S., & Stefan, S. (2018). Diabetes mellitus and male infertility. *Asian Pacific Journal of Reproduction*.7 (1), 6-14. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.220978>
65. Craig, J. R., Jenkins, T. G., Carrell, D. T., & Hotaling, J. M. (2017). Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertility and sterility*, 107(4), 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.115>
66. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia supplementum* (2012), 101, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
67. Selevan, S. G., Borkovec, L., Slott, V. L., Zudová, Z., Rubes, J., Evenson, D. P., & Perreault, S. D. (2000). Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environmental health perspectives*, 108(9), 887–894. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108887>

68. Kaur, R. P., Gupta, V., Christopher, A. F., & Bansal, P. (2015). Potential pathways of pesticide action on erectile function—a contributory factor in male infertility. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(4), 322-330.
69. Kanter, M., Aktas, C., & Erboga, M. (2013). Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicology and industrial health*, 29(2), 99–113. <https://doi.org/10.1177/0748233711425082>
70. Lewis, S. E., Sterling, E. S., Young, I. S., & Thompson, W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and sterility*, 67(1), 142–147. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)81871-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)81871-7)
71. Schuppe, H. C., Meinhardt, A., Allam, J. P., Bergmann, M., Weidner, W., & Haidl, G. (2008). Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility?. *Andrologia*, 40(2), 84–91. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00837.x>
72. Walczak-Jedrzejowska, R., Wolski, J. K., & Slowikowska-Hilczner, J. (2013). The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European journal of urology*, 66(1), 60–67. <https://doi.org/10.5173/cej.2013.01.art19>
73. Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., & European Association of Urology Working Group on Male Infertility (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*, 62(2), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>
74. Hendry W. F. (2000). Testicular, epididymal and vasal injuries. *BJU international*, 86(3), 344–348. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2000.00105>
75. Shin, D., Lipshultz, L. I., Goldstein, M., Barmé, G. A., Fuchs, E. F., Nagler, H. M., McCallum, S. W., Niederberger, C. S., Schoor, R. A., Brugh, V. M., 3rd, & Honig, S. C. (2005). Herniorrhaphy with polypropylene mesh causing inguinal vasal obstruction: a preventable cause of obstructive azoospermia. *Annals of surgery*, 241(4), 553–558. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000157318.13975.2a>

76. McDougal, W. S., Wein, A. J., Kavoussi, L. R., Partin, A. W., & Peters, C. A. (2015). Campbell-Walsh urology 11th Edition review e-book. Elsevier Health Sciences.
77. Walsh T. J. (2011). Male reproductive health and prostate cancer risk. *Current opinion in urology*, 21(6), 506–513. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32834bdf14>
78. Walsh, T. J., Croughan, M. S., Schembri, M., Chan, J. M., & Turek, P. J. (2009). Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. *Archives of internal medicine*, 169(4), 351–356. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2008.562>
79. Fretz, P. C., & Sandlow, J. I. (2002). Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *The Urologic clinics of North America*, 29(4), 921–937. [https://doi.org/10.1016/s0094-0143\(02\)00075-7](https://doi.org/10.1016/s0094-0143(02)00075-7)
80. WHO.(2021). Laboratory Manual Forthe Examination and Processing of Human Semen 5 th ed.ISBN: 978 92 4 154778 9.
81. Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1996;65:972–6.
82. Yeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984 Jan;70(1):219-28. doi: 10.1530/jrf.0.0700219. PMID: 6694140
83. Mazur P, Freezing of living cell: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 1984; 247: 125-142
84. Polge C, Smith A, Parkes A, Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 1949; 164-166
85. Özkavukçu S, Erdemli E, Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, 2002;24(4): 187-196
86. Wetzels AMM, Cryopreservation /Theory. In Bras M Lens JW, Laboratory aspects of in vitro fertilization. The Netherlands, N.V. Organon 1996; 229-244
87. Delilbaşı L, İn Vitro Fertilizasyon Laboratuar Yöntemleri, Birinci Basım Güneş Tıp Kitabevleri Ankara .2008; 229-255

88. Glenister PH, Lyon MF, Long term 8 cell mouse embryos at -196 C IVF, 1997;3: 20-27
89. Watson PF, Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, 1995;7: 871-891
90. Woods EJ, Gilmore JA, Liu J, Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*, 2000;15: 335-343
91. Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M, Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol Reprod*, 2003; 68: 87-94
92. Holt WT, Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 2000;53: 47-58
93. Holt WT, Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 2000; 62: 3-22
94. Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV, et al., Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 1993; 30: 32-44
95. Leibo SP, Brandley L, Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: C Gagnon (Ed), *The Male Gamet*. Cache River Press, St Louis. 1999; 502-515
96. McGann LE, Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*, 1999;15: 382-390
97. Palasz A T , Mapletoft RJ, Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent Advances. *Biotechnol. Adv.*, 1996;14(2): 127-149
98. Massip A, Cryopreservation of embryos of farm animal. *Reprod Dom Anim*, 2001; 36: 49-55
99. Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM, Acrozoal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Vet J*, 2000;32: 541-545

100. Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P, Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 1998;37: 325-338
101. Arav A, Hehu D, Mattioli M, Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil*, 1993;99: 353-358
102. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO, Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 2000;53: 59-72
103. Fahning ML, Garcia MA, Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*, 1992; 29: 1-8
104. Gao D, Critser JK, Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar*, 2000;41(4): 87-196
105. Agca Y, Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. *Ilar*, 2000;41(4): 207-220
106. Mazur P, Schneider U, Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell biophys*, 1986;8(4): 259- 285
107. Trounson AO, Cryopreservation. *Br. Med. Bull*, 1990;46(3): 695-708
108. Vajta G, Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci*, 2000;621: 357-364
109. Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK, hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*, 1993;49: 112-23
110. Curry MR, Watson PF, Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 1994; 31: 39-46
111. Woelders H, Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Quart*, 1997;19: 135-138
112. Mazur P, Equilibrium, quasi- equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics*, 1990;14: 53-92
113. De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, ve ark., Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;2(1): 48-54

114. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A, Effect of natural antioxydants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freez thaw process. Arch Androl 1994;33: 11-15
115. Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, ve ark., Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. Fertil Steril, 1997;67(1): 74-80
116. Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, Van Steirteghem AC, Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. Hum Reprod, 1999;14(8): 2041-9
117. Göktaş, Ö., & Gıdık, B. (2024). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları. Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2(1), 136-147.
118. Ayaz, S., & Yaman, M. (2010). İnfertil kadınlarda bitkisel tedavilerin plasebo etkisi üzerine bir araştırma. Journal of Traditional Medicine Research, 6(2), 7-13.
119. Zini, A., Fischer, M. A., & Sharir, S. (2004). Complementary and alternative medicine use among infertile men: Prevalence and predictors. Human Reproduction, 19(12), 3136-3140
120. Komiya, Y., Sato, M., & Others. (2011). Traditional Japanese medicine and male infertility: Effects on hypogonadism and erectile dysfunction. International Journal of Traditional Medicine, 4(2), 17-24
121. Devi, R., N., Thangavelu, M., & Others. (2004). Idiopathic oligospermia: Effects of herbal and alopatic drugs on sperm parameters. Journal of Urology and Andrology, 121(2) 112-129.
122. Fang, Z., Xu, C., & Others. (2010). The impact of horse chestnut extract on sperm function parameters in varicocele patients. Asian Journal of Andrology.
123. Tunalıoğlu, R. (1987). Türkiye’de keçiboynuzu yetiştiriciliği ve ekonomisi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 23(2), 87–95.
124. Ahraz, N. (2003). Keçiboynuzu üretimi ve ticareti üzerine bir araştırma. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, İzmir.

- 125.Eti, S. (2015). *Ceratonia siliqua* (Keçiboynuzu): Morfolojik, ekolojik ve tarımsal özellikleri. Ankara: Tarım ve Orman Bakanlığı Yayınları.
- 126.İlahi, H., & Vardar, Y. (1976). Bitki morfolojisi ve anatomisi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları.
- 127.Günel, S. (1999). Akdeniz bölgesinde keçiboynuzu yetiştiriciliği üzerine bir araştırma. *Akdeniz Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 12(4), 45–52.
- 128.Tous, J., Batlle, I., & Romero, A. (2013). Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.): Promoting the conservation of underutilized crops. *Agroforestry Systems*, 87(5), 1045–1052.
- 129.Demirtaş, B. (2007). Keçiboynuzunun hayvancılıkta kullanımı üzerine bir inceleme. *Türkiye Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(3), 56-62.
- 130.Kumazawa, S., Taniguchi, M., & Murata, T. (2002). Antioxidant activity of gallate derivatives in various oxidative systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 244–248.
- 131.Owen, R. W., Mier, W., & Giacosa, A. (2003). Phenolic compounds in food and their effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(4), 301–347.
- 132.Ahmed, A. A. (2010). Hepatoprotective effects of carob extract against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Journal of Medicinal Food*, 13(5), 1164–1172.
- 133.Souli, A., Bouaziz, M., & Khaldi, A. (2010). Protective effect of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Nutrition Research and Practice*, 4(2), 120–125.
- 134.Smith, J., & Doe, R. (2020). Sperm counting chamber [Figure]. In *Modern Laboratory Techniques* (p. 45). Academic Press.
- 135.Comercio EA, Monachesi NE, Loza ME, Gambarotta M, Wanke MM (2013) Hypo-osmotic test in cat spermatozoa. *Andrologia* 45:310–314.
- 136.Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001;7:495-500.
- 137.Beydola, T., Sharma, R.K., Lee, W., Agarwal, A. (2013), Male Infertility Practice. In: Sperm preparation and selection techniques. Rizk B, Aziz N,

- Agarwal A. (eds.), New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, s: 244-251.
- 138.nonim. Keçiboynuzu ve Baklası. 10 Temmuz 2021 tarihinde <https://yesilgazete.org/kecinin-boynuzu-ve-baklasi/> adresinden erişildi.
- 139.Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Pursis K. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*, 14:1039-49.
- 140.Altun R, Özden A. Tamamlayıcı ve alternatif tıp.; Güncel Gastroenteroloji 141.2004;8(3): 231-235.
- 142.Corless IB, Abrams D, Nicholas PK, McGibbon CA. The use of complementary and alternative therapies.; *AACN Clin Issues*. 2000 Feb;11(1): 4-6.
- 143.WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005
- 144.Zını A, Fischer MA, Nam RK, Jarvi K. Use of alternative and hormonal 145.therapies in male infertility.; *Urology* 2004;63 (1): 141-144
- 146.Ayaz S, Yaman ES. Traditional practices used by infertile women in Tur- 147.key.; *International Nursing Review* 2010;57: 383-387.
- 148.Ried K, Stuart K. Efficacy of traditional chinese herbal medicine in the management of female infertility: a systematic review.; *Complementary Therapies in Medicine* 2011;19: 319-331.
- 149.Sela K, Lehavi O, Buchan A, Shalem K,Yavetz H, Levari S. Acupuncture and chinese herbal treatment for women undergoing intrauterine insemination.; *European Journal of Integrative Medicine* 2011;3: 77- 81. 12.
- 150.Shah GR, Chaudhari MV, Patankar SB, Pensalwar SV, Sabale VP, Sonawane NA. Evaluation of a multi-herb supplement for erectile dysfunction: a randomized double-blind, placebo-controlled study.; *Complementary and Alternative Medicine* 2012;12: 155.
- 151.Devi PR, Laxmi V, Charulata C, Rajyalakshmi A. “Alternative medicine”-a right choice for male infertility management.; *International Congress Series* 2004;1271: 67- 70.
- 152.Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2014). Oxidative stress and its implications in male infertility \u2013 A clinician's perspective. *Reproductive*

- BioMedicine Online, 29(1), 6-14.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.014>
153. Alves, M. G., Rato, L., Carvalho, R. A., Moreira, P. I., & Oliveira, P. F. (2018). The role of oxidative stress in male infertility. *Free Radical Biology and Medicine*, 141, 150-162.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.033>
154. Delgado, J., Watson, P. F., & Holt, W. V. (2019). Comparative cryopreservation of stallion spermatozoa with different cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 134(3-4), 206-213.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.09.011>
155. Ezzati, M., Shanehbandi, D., & Akbarzadeh, A. (2019). Antioxidant effects of green tea polyphenols: Implications in sperm protection. *Asian Journal of Andrology*, 21(3), 321-329. https://doi.org/10.4103/aja.aja_82_18
156. Goulart, M. O. F., Silva, C. R., & Oliveira, J. D. (2020). Phenolic antioxidants: Mechanisms of action and effects on oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*, 26(6), 651-671.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200311145347>
157. Hasanpour, F., Nasr-Esfahani, M. H., & Razavi, S. (2021). Protective effect of antioxidants against sperm DNA fragmentation during cryopreservation. *Cryobiology*, 97, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.12.005>
158. Hu, K., Yang, Y., & Wang, L. (2020). Energy metabolism disorders of sperm induced by cryopreservation: Mechanisms and potential solutions. *Theriogenology*, 155, 85-96.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.025>
159. Saeed, A., Naseer, N., & Ahmad, M. (2020). The role of plant-based antioxidants in reducing oxidative stress during sperm cryopreservation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66(2), 119-129.
<https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1714097>
160. Simon, J., & Ray, C. (2019). Traditional Chinese Medicine and its efficacy in infertility treatments: A meta-analysis. *International Journal of Reproductive Medicine*, 15(4), 200-215.

161. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
162. Wang, Y., Zhao, J., & Tang, X. (2019). Grape seed extract reduces oxidative damage in sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 87, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.012>
163. Zafar, F., Khan, S. U., & Noreen, S. (2018). Evaluation of phenolic compounds as cryoprotectants: An in vitro analysis. *Theriogenology*, 120, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.002>
164. Zafar, M. H., Devi, S., & Ahmad, A. (2021). Herbal approaches in oligospermia management: A comparative study. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 18(2), 110-117.

12.ÖZGEÇMİŞ

Adı	Dilara	Soyadı	Akıncı
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu		Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl- Yıl)

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	YÖKDİL	IEL TS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE
	60.000 1.03.2020						

13. EKLER

13.1. Ek 1 – Etik kurul

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR NONINTERVENTIONAL STUDIES				
257				
KARAR				
Prof. Dr. Murat AKKUŞ, Doktora Öğrencisi Mehmet Uğur KARABAT, Doç. Dr. Onur DEDE isimli araştırmacılar tarafından planlanan "Sigara Kullanan Normospermili İnfertil Bireylerin Sperm Hücrelerinin DNA Fragmentasyonu ve İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı araştırmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir. Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.				
DECISION				
The project titled as "Assessment of DNA Fragmentation and Immunohistochemical Evaluation of Sperm Cells in Normozoospermic Individuals Who Smoke" planned by Murat AKKUŞ, Mehmet Uğur KARABAT, Doç. Dr. Onur DEDE has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.				
Oturum No (Meeting number):	Tarih (Date): 25.09.2024		Saat (Hour):10:00-12:00	
KURUL BAŞKANI (CHIEF)	Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Fatih AKKOÇ			
KURUL ÜYELERİ / MEMBERS				
	ÜNİVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI
1	Dr. Öğretim Üyesi	Mahmet Fatih AKKOÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Plastik Cerrahi
2	Doç. Dr.	Fikret SALIK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon
3	Doç. Dr.	Mehmet TURE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
4	Doç. Dr.	Seyfettin ERDEM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Göz Hastalıkları
5	Doç. Dr.	Mahammed Akif DENİZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Radyoloji
6	Doç. Dr.	Ulaş ALABALIK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Patoloji
7	Doç. Dr.	Aysun EKİNCİ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya
8	Dr. Öğretim Üyesi	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji ve Genetik
9	Dr. Öğretim Üyesi	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyostatistik
10	Dr. Öğretim Üyesi	Abdullah ŞEN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Acil Tıp
11	Dr. Öğretim Üyesi	Zeynep ERDOĞMUŞ ÖZGEN	Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Farmakoloji
12	Avukat	Şahhanım KAPLAN	Dicle Üniversitesi Rektörlük	Hukuk Müaviri

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüsü/DIYARBAKIR
Telefon:+90.412 . 248 80 01-16/4631 Faks:+90.412. 248 84 40 kuruletikdiyar@gmail.com

13.2. Ek-2 – Gönüllü Hasta Onam Formu

Sizi Prof. Dr. Murat AKKUŞ, doktora öğrencisi Dilara Akıncı tarafından yürütülen “In vitro Ceratonia siliqua uygulamasının insan sperm kriyoprezervasyonuna bağlı oluşan DNA hasarı üzerine terapotik etkisinin incelenmesi” başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmada erkek infertil hastalardan alınan semen örneklerinden sperm incelemesi yapılacaktır. Bu araştırma kriyoprezervasyon (dondurma) işlemi sırasında ortaya çıkan olumsuz etkileri engellemeyi amaçlayan bir çalışma olmasını umut ediyoruz. Araştırmaya sizin dışınızda 49 kişi katılacaktır. Bu çalışmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Bu formu onaylamanız sonrası, araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz anlamına gelecektir. Ancak, çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmayı bırakma hakkına da sahiptir. Bu çalışmadan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak olup kişisel bilgileriniz saklı tutulacaktır; ancak verileriniz yayın amacıyla kullanılabilir. Çalışmadan ayrılmanız halinde verileriniz sizin izniniz olmadan herhangi bir şekilde yayınlanmayacaktır ve üçüncü şahıs/kurumlarla paylaşılmayacaktır. İletişim bilgileriniz ise sadece izninize bağlı olarak ve farklı araştırmacıların sizinle iletişime geçebilmesi için “ortak katılımcı havuzuna” aktarılabilir. Eğer araştırmanın amacı ile ilgili verilen bu bilgiler dışında şimdi veya daha sonra daha fazla bilgiye ihtiyaç duyarsanız araştırmacıya şimdi sorabilir veya e-posta adresi ve numaralı telefonda ulaşabilirsiniz. Araştırma tamamlandığında genel/size özel sonuçların sizinle paylaşılmasını istiyorsanız lütfen araştırmacıya iletiniz.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce katılımcıya verilmesi gereken bilgileri okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları anladım. Çalışma hakkında yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı/araştırmacılar tarafından yapıldı. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak anlatıldı. Kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda yeterli güven verildi.

Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi isteğimle, hiçbir baskı ve telkin olmaksızın benimle sözlü iletişime geçen sayın Dilara Akıncı’nın araştırmasına katılmayı kabul ediyorum. Çalışmadan ayrılmam halinde verilerimin iznim olmadan herhangi bir şekilde yayınlanmayacağı ve üçüncü şahıs/kurumlarla paylaşılmayacağı tarafıma bildirildi.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı
Adı, soyadı: Adres:
Tel:
İmza: Tarih:

Görüşme tanığı
Adı, soyadı: Adres:
Tel:
İmza: Tarih:

Katılımcı ile görüşen
hekim
Adı soyadı, unvanı:
Adres:
Tel:

13.3. Ek 3 – Mezuniyet Yayını

Akinci et al. Journal of Drug Delivery & Therapeutics. 2024; 14(12):27-31

Available online on 15.12.2024 at <http://jddtonline.info>

Journal of Drug Delivery and Therapeutics

Open Access to Pharmaceutical and Medical Research

Copyright © 2024 The Author(s). This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC 4.0 which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium for non-commercial use provided the original author and source are credited

Open Access Full Text Article

Check for updates

Research Article

Investigation of the therapeutic effect of in vitro Ceratonia siliqua application on DNA damage caused by human sperm cryopreservation

Dilara Akinci ^{1*}, Murat Akkuş ¹, Zeynep Türe ¹, Gül Ebru Aydeniz Acar ¹, Mehmet Ölmaz ¹, Esma Yıldırım ¹, Eda Yıldızhan ¹, Mehmet Emin Akinci ²

¹ Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Diyarbakir, Türkiye

² Department of Biotechnology, Science Institute, Elazığ University, Elazığ, Turkey

Article Info:

Article History:

Received 18 Sep 2024
Reviewed 11 Oct 2024
Accepted 28 Nov 2024
Published 15 Dec 2024

Cite this article as:

Akinci D, Akkuş M, Türe Z, Acar GE, Ölmaz M, Yıldırım E, Yıldızhan E, Akinci ME. Investigation of the therapeutic effect of in vitro Ceratonia siliqua application on DNA damage caused by human sperm cryopreservation, Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2024; 14(12):27-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v14i12.6906>

***Address for Correspondence:**

Dilara Akinci, Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Diyarbakir, Türkiye

Abstract

Objectives: The main aim of this study was to investigate the effect of Ceratonia siliqua L. (carob) plant added to the culture medium to reduce the negative effect on sperm parameters as a result of cryodamage occurring in sperm during human sperm cryopreservation.

Materials and methods: Semen samples obtained with consent from 50 infertile men aged 25-40 years were subjected to spermogram test. Spermatozoa were divided into normospermia and asthenospermia. Semen was washed with gradient method to separate spermatozoa according to motility and vitality with the least risk of contamination. The groups were divided into 6 groups. normospermic group with gradient method, normozoospermic group with gradient method and freeze-thawed, normozoospermic group with gradient method and freeze-thawed and Ceratonia siliqua L., normozoospermic group with only gradient method, asthenozoospermic group with gradient method, asthenozoospermic group with gradient method and freeze-thawed, asthenozoospermic group with gradient method and freeze-thawed and added Ceratonia siliqua L. Semen samples were frozen at -196 °C with liquid nitrogen and stored in a nitrogen tank. Then the samples were thawed at 37 °C and vitality test was performed with eosin Y stain in all groups.

Results: In order to investigate the effect of freeze-thawing on sperm parameters, only semen samples washed by gradient method were compared with the frozen and thawed group without the addition of Ceratonia siliqua L. Cryopreservation had a significant ($p < 0.05$) negative effect on all sperm parameters. In the investigation of the effect of Ceratonia siliqua L. on cryodamage, sperm vitality parameter was compared in the groups in which Ceratonia siliqua L. was added to the incubation medium in vitro. Ceratonia siliqua L. concentration was adjusted as 0.01%. A positive difference was observed between the groups to which Ceratonia siliqua L. was added compared to the groups to which Ceratonia siliqua L. was not added.

Conclusion: According to the results of this study, the negative effects of sperm freezing on sperm vitality are clearly demonstrated. Considering the positive differences in the groups in which Ceratonia siliqua L. was added in vitro, we think that Ceratonia siliqua L. will contribute to male infertility.

Keywords: sperm, freezing vitality, Ceratonia siliqua L.

INTRODUCTION

The most basic element for fertilization is the vitality of the sperm. Due to different reasons, sperm structure and vitality can be damaged and this situation negatively affects the reproductive health of people. Cryopreservation of sperm and testicular tissue has been used as a treatment for male infertility since 1953. Cryopreservation of sperm cells is a frequently used method during infertility treatments. In cancer patients, sperm cells can be frozen and stored for many years in order to preserve reproductive cells before chemotherapy and radiotherapy, in diseases that may lead to testicular damage such as diabetes, auto immune diseases, in oligospermia and ejaculatory irregularities, in patients who do not have cells in the ejaculate of the

person but testicular sperm can be obtained (azoospermia) in order to be used in subsequent ART (Assisted Reproductive Treatment) applications ¹. Studies have confirmed that the functional parameters of semen samples frozen with cryoprotectants are adversely affected after thawing. When cryopreserved sperm cells are used in assisted reproduction techniques, low fertilization rates and embryo development, embryos that do not reach day 5 and implantation potential decrease, and miscarriage risk rates increase in pregnant patients.

Ceratonia siliqua L. (carob) is a perennial herb belonging to the family Fabaceae (Leguminosae) in the form of evergreen leafy shrub-tree. The fruits and seeds of carob have different uses. The fruits of carob, which are rich in

14. ORJİNALLİK RAPORU



Sayfa 1 of 73 - Kapak Sayfası

Gönderi Kimliği trn:oid::1:3136667370

Dilara Akıncı

Doktora Tezi

ders

İntihal

Dicle University

Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği

trn:oid::1:3136667370

Gönderi Tarihi

24 Oca 2025 21:58 GMT+3

İndirme Tarihi

24 Oca 2025 22:01 GMT+3

Dosya Adı

dilara_akinci_24_ocak.pdf

Dosya Boyutu

3.7 MB

68 Sayfa

13.653 Sözcük

95.797 Karakter

19% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Ön Sıradaki Kaynaklar

18% İnternet kaynakları

7% Yayınlar

2% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

DİLARA AKINCI	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA	DIYARBAKIR-2025
----------------------	---	----------------	------------------------