

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SEROTONİN TEMELLİ SPERM YIKAMA MEDYUMUNUN
OPTİMİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Sinem DOĞAN

1800005343

Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özge ÇELİK

OCAK 2024

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SEROTONİN TEMELLİ SPERM YIKAMA MEDYUMUNUN
OPTİMİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Sinem DOĞAN
1800005343

Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özge ÇELİK

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Prof Dr. Fatma Gül ÖZCAN

Doç. Dr. Nadiye KÖROĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YILMAZER

OCAK 2024

ÖNSÖZ

Çalışmamda bana yön gösteren, destek ve emeklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Özge Çelik 'e,

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Atakent Hastanesi Tüp Bebek Bölümü Laboratuvar Direktörü Doç. Dr. Turgut Aydın ve Kadın Doğum bölüm doktoru Doç. Dr. Nadiye Köroğlu'na çalışma desteği için sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmanın uygulama sürecinde desteğini esirgemeyen İstanbul Sebahattin Zaim Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim görevlisi Dr. Yasemin Yılmaz'ın desteği için teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için "BAP-2212" numaralı projeye vermiş oldukları destek ve olanaklar için İstanbul Kültür Üniversitesi "Bilimsel araştırma projeleri koordinasyon birimine" teşekkürlerimi sunarım.

Ocak / 2024

Sinem DOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
SİMGE LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	3
2.1.1. Testis	3
2.1.2. Leydig Hücreleri.....	4
2.1.3. Sertoli Hücreleri	4
2.2. Spermatogenezis.....	7
2.2.1. Mitoz	8
2.2.2. Mayoz.....	8
2.2.2.1 Spermioyogenesis	9
2.2.2.2 Spermatozoa	10
2.2.3. Sperm Baş Kısmı.....	11
2.2.3.1 Baş	11
2.2.3.2. Boyun.....	11
2.2.3.3. Kuyruk	11
2.3. Erkek İnfertilitesi.....	12
2.3.1. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi.....	13
2.3.1.1. Semen genel özellikleri.....	14
2.3.1.2. Semen hazırlık yöntemleri	15
2.3.1.3. Makroskopik olarak inceleme.....	15
2.3.2. Sperm Hazırlık Yöntemleri	17
2.3.2.1. Gradient yöntemi.....	17
2.3.2.2. Swim-up yöntemi	17

2.4. Serotonin'in Fertilité Üzerine Etkisi	18
2.4.1. L-Karnitin ve Koenzim Q10'un Fertilité Üzerine Etkisi.....	19
2.4.2. Sperm DNA Hasarı.....	21
2.4.3. Reaktif Oksijen Türevleri	22
2.4.3.1. Sperm ROS Tayini	23
2.4.4. Apoptoz	24
2.4.4.1. Semende Apoptoz Tayini (Anneksin V yöntemi)	25
2.4.4.2. Sperm kromatin yapı testi (SCSA®).....	26
3. METOT.....	27
3.1. Medyumun Ana Bileşiminin Hazırlanması	27
3.1.1. Earle Medyumu Hazırlanışı.....	27
3.1.2. Biggers, Whitten ve Whittingham (HAM) Medyumu Hazırlanışı.....	27
3.1.3. HAM F-10 Medyumu Hazırlanışı	27
3.2. Sperm Hücrelerinin Toplanıp Yıkanması.....	28
3.3. Serotonin Dozunun Belirlenmesi	30
3.4. L-Karnitin Dozunun Belirlenmesi.....	32
3.5. Koenzim Dozunun Belirlenmesi	34
3.6. L-Karnitin, Q10 ve Serotonin Etken Maddeli Sperm Yıkama Medyumunun Değerlendirilmesi	35
3.7. Sperm Hücre Sayım Yöntemi.....	35
3.8. Swim-up yıkama Yöntemi.....	37
3.9. Sperm Morfoloji Testi	37
3.10. Hazırlanan Prototip ile Yıkanan Sperm Örneklerinin DNA Hasarı ve ROS Değerlerinin İncelenmesi	37
3.10.1. Sperm DNA Testi.....	37
3.10.2. Semende Apoptoz Testi (Anneksin V).....	38
3.10.3. Semende Flow Sitometrik ROS Analizi.....	38
3.11. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Koenzim Q10 Doz Belirlenmesi	40
4.2. L-Karnitin Doz Belirlenmesi.....	42
4.3.5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama Medyumunun Diğer Ticari Medyumlarla Karşılaştırılması.....	44

4.4. Gruplar Arası Hareketliliğin İstatistiksel Karşılaştırılması	49
4.5. 5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama Medyumu ROS Analizi	52
4.6. 5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama Medyumu Apoptoz Analizi	54
4.7. 5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama Medyumu DNA Fragmentasyon Analizi	56
4.8. 5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama İşlemi Sonrası Morfolojik Değerlendirme	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR	60



KISALTMALAR

5-HT	: Serotonin
ABP	: Andojen bağlayıcı protein
ART	: Yardımcı üreme teknolojisi
BCL-2	: B hücreli lenfoma 2
CPT I	: Karnitin palmital transferaz I
DCF	: 20,70-Dikloroflorosein
DHE	: Dihidroetidyum
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DCFH-DA	: 20,70-Diklorofloroseindiasetat
ESHRE	: Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği
ETC	: Elektron taşıma zinciri
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
MOA	: Monoamin Oksidaz
OMM	: Dış mitokondriyal zar
OS	: Oksidatif stres
PI	: Propidyum iyodür
PS	: Fosfotidilserin
PTX	: Pentoksifilin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SA	: Semen analizi
SCSA	: Sperm kromatin yapı testi
SDF	: Sperm DNA fragmentasyonu
TNF	: Tümör nekroz faktörü
VDAC	: Voltaj bağımlı anyon kanalı
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1 DSÖ 2010 ve DSÖ 2021 'ye göre korunmasız cinsel ilişkiden sonraki bir yıl içinde gebe kalmaya çalışan çiftlerdeki erkeklerde semen parametreleri (WHO, 2010; WHO, 2021).....	13
Tablo 3.1 Earle, HAM F-10, BWW medyumlarında sperm hızı yüzdesi. Çalışılan Hasta Sayısı: 32 Kontrol Medyum: Irvine, Origio, Yıkama Öncesi, Test Medyum: Earle , HAM F-10, BWW	27
Tablo 3.2 HAM-100, HAM-200, HAM-300 medyumlarında sperm hızı yüzdesi, Çalışılan Hasta sayısı: 40, Kontrol Medyum: Irvine, Origio, Yıkama Öncesi, Test Medyum: HAM-100, HAM-200, HAM-300	29
Tablo 3.3 L-Karnitin 0,5 mg, L-Karnitin-1 mg, L-Karnitin 5mg medyumlarında sperm hızı yüzdesi. Çalışılan Hasta Sayısı: 43, Kontrol Medyum: HAM-200.....	31
Tablo 3.4 Koenzim 0,02 mg, Koenzim 0,01 mg, Koenzim 0,02 mg medyumlarında sperm hızı yüzdesi. Çalışılan Hasta Sayısı: 23, Kontrol Medyum: HAM-200, Yıkama Öncesi Test Medyum: Koenzim 200, Koenzim 1000, Koenzim 2000	33
Tablo 4.1 Koenzim Q10 Doz Ayarlanması (0,002 mg, 0,01 mg, 0,02 mg).Sperm yıkama sonrası genel hareketlik ve sperm sayısı	40
Tablo 4.2 Koenzim Q10 Doz Ayarlanması (0,002 mg, 0,01 mg, 0,02 mg). Sperm yıkama sonrası progresif hareketlilik	41
Tablo 4.3 L-Karnitin Doz Ayarlanması (0,5 mg, 1 mg, 5 mg). Sperm yıkama işlemi sonrası genel hareketlik ve sperm sayısı	42
Tablo 4.4 L-Karnitin Doz Ayarlanması.(0,5 mg, 1 mg, 5 mg).Sperm yıkama sonrası progresif hareketlilik.	43
Tablo 4.5 Sperm örnekleri alınan hastaların genel özellikleri	44
Tablo 4.6 Yıkama öncesi örneklerde genel hız sperm sayısı, yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri	44
Tablo 4.7 Irvine Scientific kullanılan örneklemede genel hız sperm sayısı, yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri	46

Tablo 4.8 Origio kullanılan örneklemede genel hız sperm sayısı, yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri.....	47
Tablo 4.9 SWM (5-HT)-(Ham-200+L-Karnitin+Koenzim) kullanılan örneklemede genel hız sperm sayısı, yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri.....	48
Tablo 4.10 Sperm Yıkama öncesi ve 3 solüsyon ile yıkama sonrası genel hız değerleri.SS:standart sapma(\pm)	49
Tablo 4.11 Sperm Yıkama öncesi ve 3 solüsyon ile yıkama sonrası sperm sayısı değerleri. SS:standart sapma(\pm)	50
Tablo 4.12 Sperm Yıkama öncesi ve 3 solüsyon ile yıkama sonrası progresif hareketlilik değerleri. SS:standart sapma(\pm).....	51

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1 Erkek üreme sisteminin şematik diyagramı.....	3
Şekil 2.2 Testis anatomisi	4
Şekil 2.3 Spermatogenezisin farklı aşamaları, hematoksilin ve eosin ile boyama.....	6
Şekil 2.4 Sperm baş, boyun ve kuyruk kısımları.	11
Şekil 2.5 Sperm morfolojik görünüşleri.....	16
Şekil 3.1 Earle, HAM F-10, BWW test medyumlarında sperm hızlarının karşılaştırılması.	28
Şekil 3.2 HAM-100, HAM-200, HAM-300 test medyumlarında sperm hızlarının karşılaştırılması.	29
Şekil 3.3 L-Karnitin 0,5 mg/mL, L-Karnitin /mL, L-Karnitin 5mg/ml test medyumlarında sperm hızlarının karşılaştırılması.	32
Şekil 3.4 Koenzim 0,002 mg/mL, Koenzim 0,01 mg/mL, Koenzim 0,02 mg/mL test medyumlarında sperm hızlarının karşılaştırılması.	34
Şekil 3.5 Makler sayım kamerası.Mehmet Ali Aydınlar Acıbadem Atakent Hastanesi	36
Şekil 3.6 Işık mikroskobu. Mehmet Ali Aydınlar Acıbadem Atakent Hastanesi	36
Şekil 4.1 Koenzim Q10 Doz Ayarlanması (0,002 mg, 0,01mg, 0,02mg). Sperm yıkama sonrası sonrası sperm sayısı. Pre-wash:yıkama öncesi, post wash yıkama sonrası ...	40
Şekil 4.2 Koenzim Q10 Doz Ayarlanması (0,002 mg, 0,01mg, 0,02mg). Sperm yıkama sonrası progresif hareketlilik. Pre-wash:yıkama öncesi, post wash yıkama sonrası..	41
Şekil 4.3 L-Karnitin Doz Ayarlanması (0,5 mg, 1 mg, 5 mg)Sperm yıkama işlemi sonrası ortalama sperm sayısı. Pre-wash:yıkama öncesi, post wash yıkama sonrası.	42
Şekil 4.4 L-Karnitin Doz Ayarlanması (0,5 mg, 1 mg, 5 mg). Sperm yıkama sonrası progresif hareketlilik. Post-wash: Yıkama sonrası.....	43
Şekil 4.5 Sperm örnekleri alınan hastaların genel özelliklerinin dağılımı	44

Şekil 4.6 5-HT/L-C/CoQ10 prototip sperm yıkama medyumu ROS analizi. Origio ®,Group2: Irvine ®,Group3: 5-HT/L-C/CoQ10 Gruplar arasında ROS değerlerinin karşılaştırılması.	52
Şekil 4.7 Scatter dot plot grafiğiyle uygun popülasyon seçilerek alınan temsili bir örnek olarak bir numunenin ROS deneyi Group1: Origio ®,Group2: Irvine ®,Group3: 5-HT/L-C/CoQ10 Gruplar arasında ROS değerlerinin karşılaştırılması. Ortalama ± SD. *p < 0,05 grup 1 ve 2.	53
Şekil 4.8 5-HT/L-C/CoQ10 prototip sperm yıkama medyumu apoptoz analizi Group1: Origio ®,Group2: Irvine ®,Group3: 5-HT/L-C/CoQ10	54
Şekil 4.9 Anneksin V-FITC/propidyum iyodür (PI) ile boyamadan sonra akış sitometrisi kullanılarak apoptoz tahlili. PI (y eksen) ile annexin V (x eksen) arasındaki temsili dağılım grafikleri. Temsili bir örnek olarak bir numunenin anneksin deneyi. Group1: Origio ®,Group2: Irvine ®,Group3: 5-HT/L-C/CoQ10	55
Şekil 4.10 5-HT/L-C/CoQ10 prototip sperm yıkama medyumu DNA fragmentasyon analizi (%) Group1: Origio ®,Group2: Irvine ®,Group3: 5-HT/L-C/CoQ10	56
Şekil 4.11 Temsili bir örnek olarak bir numunenin DNA fragmentasyon analizi. Group1: Origio ®,Group2: Irvine ®,Group3: 5-HT/L-C/CoQ10.....	57
Şekil 4.12 5-HT/L-C/CoQ10 prototip sperm yıkama işlemi sonrası morfolojik değerlendirme.....	58

SİMGE LİSTESİ

%	: Yüzde değeri
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CaCl₂.2H₂O	: Kalsiyum klorür dihidrat
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik sit
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
L	: Litre
M	: Molarite
mg	: Miligram
MgSO₄.7H₂O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
NaCl	: Sodyum klorür
NaH₂PO₄.H₂O	: Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
nm	: Nanometre
PG	: Primordiyal germ hücreleri
Sbb	: Scribbler

ÖZET

Bu tez çalışmasında, tüp bebek ve aşılama tedavi yöntemlerinde *in vitro* koşullarda kullanılmak üzere sperm hızını arttıran serotonin etken maddeli yeni bir sperm yıkama solüsyonunun (medyum) geliştirilmesi hedeflenmiştir. Türkiye ve Dünya'da serotonin etkin maddeli geliştirilen ilk sperm yıkama solüsyonudur.

Bu prospektif kohort çalışma, serotonin (5-HT), L-karnitin (L-C) ve Koenzim Q10 (CoQ10) gibi etken maddeler ile zenginleştirilmiş yeni bir sperm yıkama ortamının (SWM) sperm hareketliliğini artırma ve DNA hasarını azaltma potansiyelini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu etken maddelerin doz belirleme işlemi gerçekleştirildikten sonra oluşturulan *5-HT/L-C/CoQ10* sperm yıkama medyumu çok sık kullanılan iki ticari sperm yıkama medyumu ile (*SWM Origio®*, *Danimarka* ve *SWM Irvine Scientific®*, *Santa Ana, CA, ABD*) karşılaştırılmıştır.

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Atakent Hastanesi kliniğine gelen gönüllülerden alınan semen örneği aşağıda belirtilen üç farklı sperm yıkama medyumu ile analiz edilmek üzere üçe bölünmüştür;

- 1- *Origio® SWM*; HEPES, sodyum bikarbonat, insan serum albümini (HSA), taurin ve gentamisin sülfat,
- 2- *Irvine Scientific® SWM*; HEPES, sodyum bikarbonat ve HSA,
- 3- *5-HT/L-C/CoQ10 SWM*; serotonin, L-C ve CoQ10 ile takviye edilmiş HEPES tamponlu insan tubal sıvısı (HTF).

Sperm hareketliliği, apoptoz, reaktif oksijen türleri (ROS) ve DNA fragmentasyon oranları değerlendirilmiştir. Gruplar arasında genel ve progresif sperm hareketliliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak, *5-HT/L-C/CoQ10 SWM*'deki spermatozoalar daha düşük apoptoz, nekroz ve ROS seviyeleri ve daha yüksek canlılık oranı göstermiştir. Gruplar arasında DNA fragmentasyon indeksinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. *5-HT/L-C/CoQ10 SWM*, diğer iki ticari sperm yıkama ortamına göre sperm oksidatif stres ve apoptoz oranını azaltmıştır. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler, geliştirdiğimiz medyumun fertilizasyon başarı oranlarını arttırmak üzere bir sonraki denemelere geçebilecek potansiyeli olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Sperm yıkama medyumu, L-Karnitin, Koenzim Q10, Serotonin

ABSTRACT

Our study aims to develop a new sperm washing solution (medium) containing serotonin as an active ingredient to enhance sperm motility for use in in vitro conditions in assisted reproduction technologies such as in vitro fertilization and artificial insemination. This is the first sperm washing solution developed with a serotonin active ingredient in Turkey and worldwide.

This prospective cohort study was conducted to investigate the potential of a novel sperm washing medium (SWM) enriched with active ingredients such as serotonin (5-HT), L-carnitine (L-C), and Coenzyme Q10 (CoQ10) to enhance sperm motility and reduce DNA damage. After the dosage determination process of these active ingredients, the formulated 5-HT/L-C/CoQ10 sperm washing medium was compared with two commonly used commercial sperm washing media (SWM Origio®, Denmark, and SWM Irvine Scientific®, Santa Ana, CA, USA). Semen samples obtained from volunteers at Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Atakent University Hospital clinic were divided into three groups for analysis in different sperm washing media.:

- 1- *Origio® SWM*: composed of HEPES, sodium bicarbonate, human serum albumin (HSA), taurine, and gentamicin sulfate.
- 2- *Irvine Scientific® SWM*: composed of HEPES, sodium bicarbonate, and HSA.
- 3- *5-HT/L-C/CoQ10 SWM*: composed of HEPES-buffered human tubal fluid (HTF) supplemented with serotonin, L-C, and CoQ10.

Sperm motility, apoptosis, reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation were assessed. Sperm motility was categorized as progressive, non-progressive, and immotile. There were no statistically significant differences in total and progressive sperm motility between the groups. However, spermatozoa in the 5-HT/L-C/CoQ10 SWM exhibited lower levels of apoptosis, necrosis, and ROS with higher viability. No significant difference was observed in the DNA fragmentation index between the groups. The 5-HT/L-C/CoQ10 SWM reduced sperm oxidative stress and apoptosis compared to the other two commercially available sperm-washing media, suggesting its potential use to enhance in vitro fertilization success rates.

Keywords: Sperm washing media, L-Carnitine, Coenzyme Q10, Serotonin

1. GİRİŞ

Günümüzde çiftlerin en büyük sorunlarından biri çocuk sahibi olamamaktır. “Korunmasız düzenli cinsel ilişkiden sonra bir yıl içinde spontan olarak gebelik elde edilememesi” infertilite (kısırlık) olarak tanımlanır (Dünya Sağlık Örgütü, 1999). 48 milyon çift ve 186 milyon kişinin dünya çapında etkilediği öne sürülmektedir (Boivin v. d., 2007). Kısırlık üreme çağındaki sekiz çiftten birini etkiler ve vakaların %30' una katkıda bulunur (Patel v. d., 2017).

Çiftlerin yaklaşık olarak %50'sinde erkek faktörü temel neden olabilir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılındaki verilerine göre dünya nüfusunu %15'i yani günümüzde 90 milyona yakın çift kısırlık problemi yaşamaktadır. Bu oranın yaklaşık %50'si sperme bağlı problemlerden kaynaklanmaktadır. Bu problemler; sperm sayısının ve hızının az olması, sperm morfolojisinin bozuk olmasıdır (Barrat v. d., 2017). En önemli erkek kısırlığı değerlendirme yöntemi semen analizi (SA)'dir. Semen parametrelerinin değerlendirilmesi şu anda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından oluşturulan insan semeninin incelenmesi ve işlenmesi için laboratuvar kılavuzunda tanımlanan standartlara dayanmaktadır. 1980'de yayınlanan DSÖ laboratuvar el kitabının 1. baskısından 6. baskısına kadar, semen inceleme teknikleri, sperm hazırlama ve sperm dondurma yöntemleri ve kaliteyi iyileştirmeye yönelik yeni teknolojilerdeki son gelişmelerin dahil edilmesiyle zamanla önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (WHO, 2021). Sperm DNA'sının fragmente olması (SDF), semen sıvısındaki oksidatif stres (OS) ve reaktif oksijen türevlerinin (ROS) tespit edilmesinde oluşan son gelişmeler ve testler, doğal gebe kalma ve yardımcı üreme teknolojisi (ART) açısından üreme sonuçlarının tahminine ek ışık tutmuştur.

Sperm kaynaklı kısırlıkta en önemli tedavi aşılama ve tüp bebek yöntemleridir (Van Wolff, 2019). 2015 yılında yapılan Avrupa Üreme ve Embriyoloji Kongresinde yayınlanan bildiriye göre dünyada her yıl ortalama 1,5 milyon kez tüp bebek yöntemi uygulanmasına rağmen 350 bin sağlıklı bebek doğabilmektedir (Martinez, 2017).

Aşılama ve tüp bebek tedavilerinde beşinci, altıncı kez denemelerine rağmen çiftler çocuk sahibi olamamaktadırlar. Sperm sayısı ve hareketliliğindeki yetersizlikler gebelik şansını oldukça düşürmektedir (Westerman, 2020). Sperm hareketlilik düşüklüğü, normal yolla gebe kalmaya engel olduğu gibi yardımcı üreme (aşılama ve tüp bebek) tekniklerinde başarıyı etkileyen en önemli etkidir. (Borges v. d., 2016).

IVF tedavileri sırasında kullanılacak olan sperm hücresinin, normal morfoloji ve DNA yapısında olması gereklidir (Zaneveld v. d., 1991).

Swim-up ve gradient gibi sperm yıkama yöntemlerinin sperm hareketliliğini arttırarak fertilizasyon ve embriyo bölünmesinde pozitif katkıları olduğu gösterilmiştir (Cissen v.d., 2015). (Santiago v. d., 2017). Gradient sperm yıkama işlemlerinin santrifüj etkisi ile reaktif oksijen türevlerini arttırdığı ve DNA fragmentasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Aitken, 2017). Swim-up sperm yıkama işleminde elde edilen hareketli sperm, sperm sayısına orantılı olarak değişkenlikler göstermektedir (Manna v. d., 2020). Mevcut sperm yıkama medyumlarının içeriği tampon çözeltiler ve insan serum albümini gibi protein takviyelerinden oluşmaktadır. Menide bulunan ölü hücreler, bakteriler temizlenerek tedaviye uygun spermeler seçilir (Lindholmer v. d., 1974).

Ekzojen antioksidan ajanlar, erkek infertilitesini tedavi etmek için son yıllarda popüler bir tercih olmuştur. L-Karnitin (L-C)'nin spermelerin üretilmesinde, olgunlaşmasında, hareketliliğinde anahtar rolü bulunmaktadır ve L-C miktarının erkek epididimlerinde normal plazmaya göre 50 kat fazla bulunduğu ortaya çıkmıştır (Shang XJ v. d., 2015). CoQ10 hareketliliği az olan spermeler için tercih edilebilen bir antioksidandır. CoQ10 (ubiquinone) özellikle mitokondri membranında fazlasıyla bulunan, oksidatif strese bağlı olarak hücreleri hasardan koruyan bir antioksidandır. Sperm hareketliliği yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyduğu için, spermde çok fazla mitokondri bulunduğu kanıtlanmıştır. CoQ10, oksidatif stresten kaynaklanan DNA hasarına karşı spermeleri koruduğu ve hücrelerde bulunduğu miktarı arttıkça sperm sayısının ve hızının daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır (Alahmar v.d., 2020). Ayrıca serotonin (5-HT) miktarı ve sperm hareketliliğine ilişkin makaleler bulunmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada 5-HT'nin, sperm asktivasyonunda etkili olduğu tespit edilmiştir (Fujinoki, 2011). 5-HT vas deferensin, testislerdeki kan dolaşımının düzenlenmesinde, testislerin gelişmesinde ve testesteron üretiminde etkilidir (Tinajero v. d., 1993).

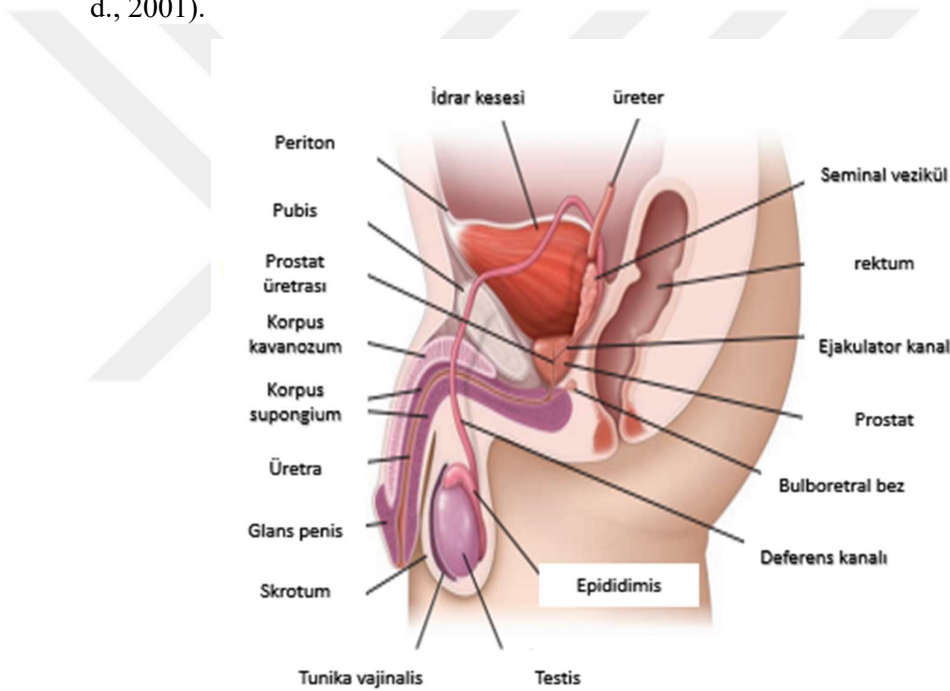
Bu çalışmada, L-C ve CoQ10 ile güçlendirilmiş 5-HT içeren yeni bir sperm yıkama medyumunu geliştirmeyi ve sperm hareketlilik, morfolojisi ve DNA hasarı üzerindeki etkisini ticari olarak kullanılan diğer sperm yıkama medyumları ile karşılaştırmalı olarak göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

2.1.1. Testis

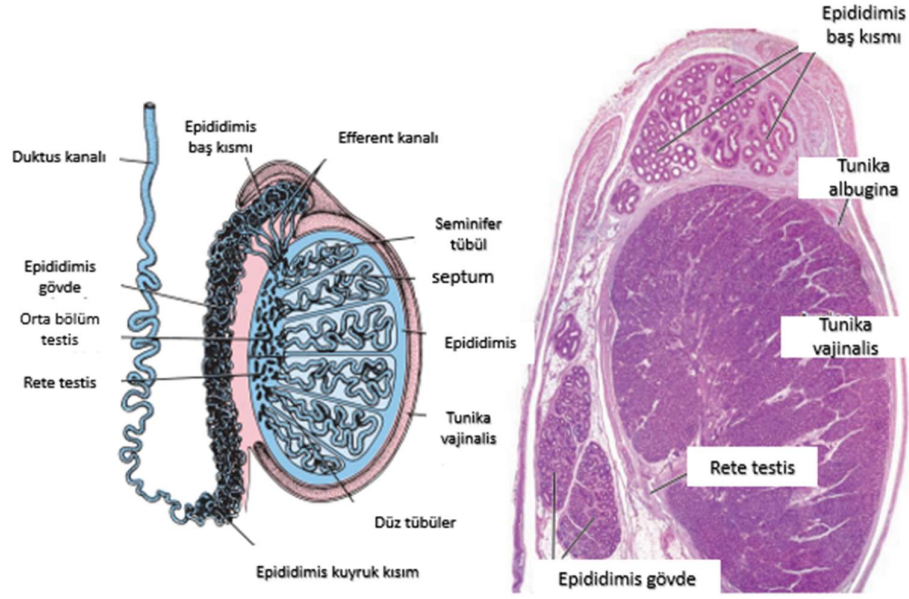
Testisler, genital kanallar, aksesuar seks bezleri ve penis; erkek üreme sistemini oluşturmaktadır (Şekil 2.1). Testisin iki ana görevi vardır: spermatogenez (erkek sperm hücresi yani gamet üretimi) ve steroidogenez olarak da adlandırılan seks hormonlarının (androjenlerin) sentezi. (Testosteron, spermatogenez için gereklidir ve erkek embriyonun embriyonik gelişiminde önemli bir rol oynar. Gametler ve androjenin üretildiği kısım olan testisler skrotum içerisinde yer almaktadır (Kittles v. d., 2001).



Şekil 2.1. Erkek üreme sistemini gösteren şematik bir diyagram.

Androjenler testosteronun yapımını gerçekleştirir. FSH ve LH hormonları hipofiz bezinden salgılanır ve sperm oluşumu için birlikte çalışırlar.

Bununla birlikte, testosteron, sperm üretimi ve ikincil karakterlerin oluşumu için gereklidir. Testislerde yer alan seminifer tübüller, spermin üretildiği yerdir. Sperm hücresi, spermatogenez ve spermiyogenez sırasında meydana gelir. Bu süreç, spermin tübüller arasına yerleşmiş sertoli hücreleri üzerinde bulunan premordiyal germ hücreleri (PGC) ile başlar (Holstein v. d., 2003). Şekil 2.2, testisin enine alınmış kesitini ve seminifer tübülün yapısını göstermektedir.



Şekil 2.2. Testis anatomisi

2.1.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, bağ dokusunda dağınık veya daha düzenli gruplar halinde bulunan ve granüllü sitoplazmaya sahip olan hücrelerdir. Yaklaşık olarak testis hacminin %5-12'sine katkıda bulunurlar (Christensen, 1975; De Kretser v. d., 1994). Erkek seks hormonu olan testosteron, leydig hücrelerinden meydana gelir (Payne v. d, 1980). LH, Leydig hücrelerine etki ederek testosteron üretimini uyarır. Bu, hipofiz üzerinde daha fazla LH salınımını engellemek veya modüle etmek için negatif bir bildirim oluşturur (Ewing v. d., 1993).

İntratestiküler testosteron konsantrasyonu, kandaki konsantrasyondan önemli ölçüde yüksektir ve temel işlevlerinden bazıları şunlardır: Hipofiz testis ekseninin aktivasyonu, maskülasyon ve cinsel davranışlar, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi, erkek genital organların farklılaşması ve ikincil cinsiyet özelliklerinin kazanılması.

2.1.3. Sertoli Hücreleri

Testis hacminin çoğu, fibröz septanın sınırları ve bağ dokusu içinde paketlenmiş seminifer tübüllerden oluşur. Seminifer tübüller, çoğalan ve gelişen birçok farklı cebe dağılarak testislerin içinde bir dizi kıvrımlı bir yapı oluşturur. Spermatogenezis bu tübüllerde gerçekleşir (Şekil 2.3). Seminifer tübüller, intestinal alandan leydig

hücreleri, kan damarları, lenfatikler ve sinir grupları ile ayrılır. Seminifer tübüllerin her birinin ortalama 180 mm çapında olduğu düşünülmektedir (Davidoff v. d., 1990).

Seminifer tübüller içinde sertoli hücreleri yer almaktadır. Bazal membrandan lümeneye doğru uzanmaktadır ve ucu rete testise açılır (Roosen-Runge v. d., 1978).

Salgılanan sıvı, rete testiste toplanarak epididimin duktal sistemine iletilir. Seminifer tübüllerin ortala'a %40'ı sertoli hücrelerinden meydana gelir ve uzun spermatid hücreleri bulunmaktadır (Russel v.d.,1993; França v. d., 1993).

Sertoli hücreleri, büyük bir hücre çekirdeğine sahiptir. Sertoli hücreleri sperm hücrelerine metabolik destek sağlar. Fonksiyonel ve endokrinolojik olarak spermatogenez için gereklidir (Russel v. d., 1993).

Spermatogenez sırasında, spermatogonyum hücreleri olgunlaşmak için seminifer tübüllerin bazal bölgesinde bulunurken, daha gelişmiş olan spermatid hücreleri lümeneye doğru hareket eder. Sertoli hücreleri, spermatogonyum hücrelerini besler ve hücre fagositozuna katılır. Sertoli hücreleri ile gelişmekte olan germ hücreleri arasında, spermatogenezin uygun bir hormonal ortam içinde sürdürülmesi için çoklu iletişim bölgeleri mevcuttur. FSH, sertoli hücrelerinde bulunan yüksek afiniteli FSH reseptörlerine bağlanarak androjen bağlayıcı proteinin (ABP) salgılanmasını işaret eder. ABP, testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenlerin bağlanmasına ve böylelikle konsantrasyonlarının çoğalmasına izin verir. Bu androjenler, spermatogenez başlatmak için kullanılır. Sertoli hücreleri ayrıca anti-müllerian hormonu salgılar, ve müllerian kanalların büyümesini engelleyerek, erkeğin embriyonik gelişimine izin verir (Behringer, 1995; Josso v. d., 2001).

Sertoli hücreleri, FSH düzenlemesini sağlayan inhibin salgılar. Sperm hücresi ergenlik döneminde üretilir ve ilk zamanlar bağışıklık sistemi tarafından tanınmayabilir. Ve bu nedenle kan testis bariyeri bir mikro ortam sağlar. İmmünolojik olarak korunan bir bölümde spermatogenez işlemi gerçekleşmektedir. Kan-testis bariyeri 2 bölümden oluşur: Seminifer epitele bitişik bazal bölge ve lümeneye doğru adluminal bölge. Bazal bölge; spermatogonyum hücrelerinin gelişimi için hizmet eder. Adluminal bölge; sekonder spermatositlerin ve spermatidlerin gelişimi için hizmet eder.

Normal spermatogenez için testislerin skrotumda bulunması şarttır ve bu hücreler pubertede olgunlaşır (Gallardo v. d., 1996).

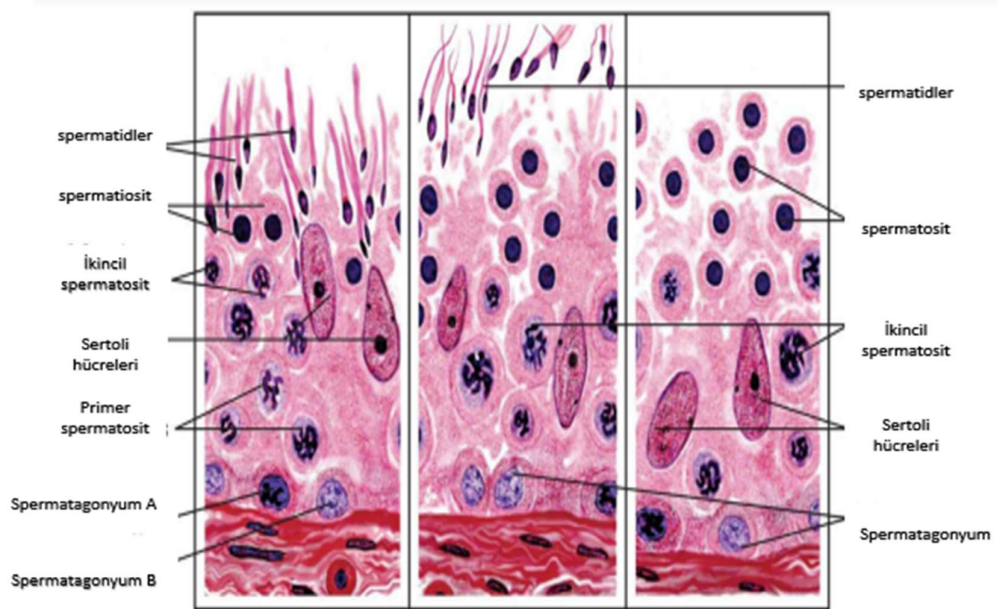
Sperm oluşumunda 2 aşama bulunur,

1- Sermatositogenezis; farklılaşma ve çoğalma ile spermatogoniumdan sperm meydana gelmesi.

2- Spermiogenezis; sperm in spermiumu oluşturması.

Pubertede hipotalamustan salgılanan GNRH ile, hipofiz ön lobundan FSH ve LH) salgılanmaya başlar ve seminifer tübülleri oluştururlar. Solid kalan primordial üreme hücreleri de spermatogonyumlara dönüşür (Şeftalioğlu, 1991).

Kromatinlerinin boyanma özelliğine göre A ve tip B spermatogonia vardır. Tip A spermatogonyum kök hücre olarak işlev görür. Tip B spermatogoniyalar mitotik bölünerek primer spermatisitleri oluşturur. Spermatogonyuma ve lümene daha yakın olan primer spermatisitler 1. mayotik bölünmenin profaz evresine girerler ve bu evre çok uzun olduğu için en çok sayıda bulunan spermatisit hücreleridir. Primer spermatisit: 46 (diploid) kromozom profaz safhası yaklaşık 22 gün sürer ve birinci mayoz bölünme tamamlanır. Haploid, sekonder spermatisit oluşur. Sitoplazmik köprüler ile bağlıdırlar ve ikinci mayoz bölünmeye girerek 23 haploid içeren kromozom spermatidleri oluştururlar (Şekil 2.3) Spermatogonyumdan spermatid oluşumuna kadar geçen döneme spermatisitogenez denir. İki mayoz bölünme sonucu haploid kromozom içeren dört adet spermatid meydana gelir 22+X, 22+Y (Davis v. d., 1994).



Şekil 2.3. Spermatogenezisin farklı aşamaları, hematoxilen ve eosin ile boyama.

2.2. Spermatogenezis

Diploid bir spermatogonyumun bir spermicide farklılaşma süreci spermatogenez olarak bilinir. Puberte döneminde hipofiz ön lobundan FSH ve LH salgılanmaya başlar. FSH ve LH etkisi ile, puberteye kadar aynı halde bulunan lümenlerin içi boşalıp farklılaşarak seminifer kordlar oluşur (Fujinoki, 2011).

Spermatogenezis üç kademe olarak gözlenir: (1) spermatogonyum hücrelerinin sayıca artarak farklılaşması, (2) mayoz bölünme ve (3) round spermatid hücrelerinin mayoz bölünmeden sonra sperm hücresine dönüşmesi. Spermatogenezis ergenlik döneminde başlar ve yaşam boyunca devam etmektedir. Spermatogenezis, primer haploid spermatidleri oluşturmak için mayoz I ve mayoz II bölünmeden oluşmaktadır ve bazal bölmede gerçekleşmektedir. Primer spermatosit hücreleri, sekonder spermatosit hücrelerini meydana getirmek için mayoz I bölünmeye girerler. İlk mayotik bölünme olan profaz evresi çok uzundur. Sekonder spermatosit hücreleri, sperm hücrelerini üretmek için mayoz II bölünmeye girerler (1,1-1,7 gün) (Roosen -Runge v. d., 1978).

2.2.1. Mitoz

Spermatogonyumun sayıca artması, çoğalmasını ve devamını içeren süreçtir. Genetik materyalin (kromozomların) kopyalandığı, nükleer zarfın parçalandığı ve kromozomların ve sitoplazmanın eşit bölünmesinin bir sonucu olarak iki yavru hücrenin oluştuğu kesin, iyi düzenlenmiş bir olaylar dizisidir (Berezney v. d., 1977).

DNA, spesifik düzenleyici proteinlerin etkileşimde bulunduğu döngü alanlarında düzenlenir. Mitoz bölünme fazı, spermatogonia A, spermatogonia B ve primer spermatositleri içerir. Birincil spermatositler, bir dizi mitotik bölünme yoluyla hücre içi köprülerle birbirine bağlanan gelişmekte olan germ hücreleri tarafından üretilir. Ergenlik çağından sonra spermatogonia hücre sayısı belirlenir ve öncü hücreler sağlamaya, farklılaşma ve olgunlaşma sürecini başlatmaya devam ederler (Mirkovitch v. d., 1984; Dickinson v. d., 1992).

2.2.2. Mayoz

Mayoz bölünme sırasında yeni bir genom belirlenene kadar kromozom eşleşme, çaprazlama (krossing-over) ve genetik farklılıklar gerçekleşir. Mayoz bölünme fazı iki

durumdan meydana gelir. İlk olarak diploid primer spermatosit hücresinden dört adet haploid spermatid hücresi elde edilir. İlk mayoz bölünmeden sonra, her homolog kromozom çifti bir eşini içerir ve bunlara sekonder spermatosit hücreleri (2n) denir. Mayoz bölünme; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evresinden oluşmaktadır. Bölünme tip B spermatogonyum hücresinin preleptoten primer spermatositleri oluşturduğunda başlar. Profazın leptoten evresinde, kromozomlar uzun filamentler halinde düzenlenmektedir. Zigoten evresinde, tetrad adı verilen homolog kromozomlar, sinapsis yaparak düzenlenir ve sinaptonemal kompleksler meydana gelmektedir. Bu aşamada crossing-over gerçekleşir ve pakiten aşamasında kromozomlar kısalır. Homolog kromozomlar diyakinezi sırasında yoğunlaşır ve geçiş bölgelerinden ayrılır. Rastgele oluşan sıralama ve dizilim, spermdeki genetik çeşitliliğin korunması açısından çok önemlidir. Sonunda profazda nükleer zarf bozulur ve metafazda kromozomlar ekvator plakasında düzenlenir. Anafaz evresinde, her bir kromozom, zıt kutuplara doğru hareket eden iki kromatitten oluşmaktadır. Telofaz evresinde hücre bölünmesi, sekonder spermatositlerin oluşumu ile gerçekleşir (kromozom sayısının yarısı). Primer spermatosit hücreleri, germinal epitelyumun en iri germ hücreleridir. İkinci mayozun profaz evresi çok kısa sürer ve her bir kromozomun iki kromatidi ayrılarak farklı yönlere hareket ettiğinden DNA içeriği yarı yarıya inmektedir. Telofazın sonunda, spermatidler tamamen ayrılmazlar, ancak senkronize gelişim için ince köprülerle birbirine bağlı kalırlar. Bu sperm hücreleri "22, X" veya "22, Y" kromozom içeren haploit hücrelerdir ve spermiyogenezis olarak bilinen tam farklılaşma evresinden geçer.

2.2.2.1. Spermiyogenez

Spermatid hücrelerinin sıkıştırılmış kromatin ile sperm hücresine farklılaşma süreci olarak ifade edilmektedir. Her aşama morfolojik olarak farklı tanımlanabilir. İlk olarak, hücrede mitokondri iyi gelişmiş, farklılaşmış ve akrozomal vezikül ortaya çıkmıştır. Kromatoid cisim sperm akrozom vezikülünün karşısındaki kutupta gelişir ve proksimal sentriyol ve aksial filamentler belirir. Bir sonraki evrede akrozom oluşur, ara parça ve kuyruk bölümü gelişir. Genomun inaktivasyonu ile post-mayoz evresinde kromatin yoğunlaşması meydana gelir. Histonlar geçiş proteinlerine, protaminler ise iyi gelişmiş disülfit bağlarına dönüştürülür.

Spermatid hücresi sertoli hücresinden kurtularak ve spermiasyon ile spermatozoon olarak túbülün lümenine girer. Spermatogonyumdan köken alan spermatit hücreleri, köprüler ile birbirine bağlı kalır. Sertoli hücreleri, spermatidler seminifer túbüllerin lümenine doğru giderken spermiasyona aktif olarak katılırlar. (Russel v. d., 1993).

Matür spermatid hücreleri, hücre içi oluşan köprülerini kapatarak, germinal epitel ile bağlantısını koparır ve sperm adı verilen serbest hareketli hücreler haline gelir (Smith v. d., 1994).

Spermatogenezis farklı türler arasında farklı zamanlarda gerçekleşir; insanda sabit olarak gözlenmektedir. Bir spermatogonyum hücresinin olgun yani matür bir spermatide dönüşmesi için gereken süre yaklaşık 70 ila 74 gün arasında olduğu tahmin edilmektedir (Heller v. d., 1964).

Spermatid olgunlaşma süresi yani semene (ejakülata) dahil edilebileceği bir yere yolculuğu yaklaşık 10-14 gün sürmektedir. Sperm kromatini yoğunlaşmaya başlar ve sentrioller sitoplazmadan çekirdeğin tabanına göç eder ve proksimal sentriolün çekirdeğe tutunması ile golgi fazını içerir ve distal merkezli aksonem oluşur. Apikal fazında, akrozom, çekirdek yüzeyinin yaklaşık %30-50'sini kaplayan çekirdek üzerinde ayrı bir başlık oluşturur (DeKretser, 1969).

Akrozom, dölleme için gerekli hidrolitik enzimleri içerir ve spermatidler sertoli hücrelerine gömülür. Maturasyon evresinde mitokondri, kılıfı ve yoğun dış lifleri meydana getirmek için kuyruğa doğru göç eder. Kuyruk yapısının tamamlanması için lifli bir kılıf oluşturulur ve spermatid hücresinin sitoplazmasının çoğu artık cisim olarak dışarı atılır. Sperm hücresi seminifer túbülün lümenine doğru göç eder. Sperm hücresinin uzaması tamamlandığında túbül lümenine doğru salınır. Ejakülat örneğinde, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) el kitabında açıklanan 20 milyon/ml'den çok daha yüksek bir sperm sayısının beklenmesi gereksede, durum böyle değildir (Rowe v. d., 1993). Bunun sebebi genelde gelişmiş hücrelerin %75'inin çoğunun apoptoz işlemini sonucunda elimine edilmesidir. Elimine edilmeyen hücrelerin yarısından fazlası ise anormaldir. Bu sebeple, üreme potansiyeli için sadece yaklaşık %12'si mevcuttur (Sharpe, 1994). Ve ayrıca günlük sperm üretimi yaşla birlikte azalmaktadır; sertoli hücrelerinin sayıca azalması, mayozun bölünme sırasında germ hücre dejenerasyonu ve yavaş bölünmede artış olması veya leydig hücrelerinin sayısındaki azalma ve testesteron azalması ile birlikte birincil spermatositlerin kaybı ile ilişkilidir.

2.2.2.2. Spermatozoa

Bölünme geçirmeyen, oldukça özelleşmiş hücrelerdir. Bir sperm, ‘‘Y kromozomu’’ (DNA) içeren bir baş ve hareketliliği sağlayan bir kuyruktan meydana gelmektedir. Spermatozoa; büyük bir çekirdeğe sahip olmasına rağmen büyük bir sitoplazmadan yoksundur (Hafez, 1976; Menkveld v. d., 1990).

2.2.3. Sperm Baş Kısmı

Yaklaşık olarak 4,0–5,5 mikrometre (μm) uzunluğunda olup 2,5–3,5 μm genişliğinde oval bir yapıya sahiptirler (Şekil 2.4). Işık mikroskopu altında en çok görülen anomaliler akrozom ve baş kusurları (büyük, küçük, round, pin head, piriform) ve vakuollü (boyanmamış vakuol alan tarafından işgal edilen akrozom kısmının $>20\%$ 'si) çift baş veya bunların herhangi birisi olabilir (WHO, 1999).

2.2.3.1. Akrozom

Golgi kompleksi olarak da adlandırılır. Baş bölgesinin yaklaşık üçte ikisini ve daha fazlasını içerir (Şekil 2.4). Elektron mikroskopu (TEM) altında gözlemlendiğinde, sperm başı eşit olmayan akrozomal ve post-akrozomal bölgelerine ayrılmıştır. Akrozom kısmı, döllenme için gerekli olan hyalüronidaz enzimi başta olmak üzere hidrolitik enzimleri içerir. Yumurtanın fertilizasyon işlemi sırasında, akrozomal zarın birçok yerde oosit zonası ile füzyonunu gerekmektedir. Akrozom reaksiyonu sırasında akrozomal enzimleri serbest bırakılır. (Hafez, 1976).

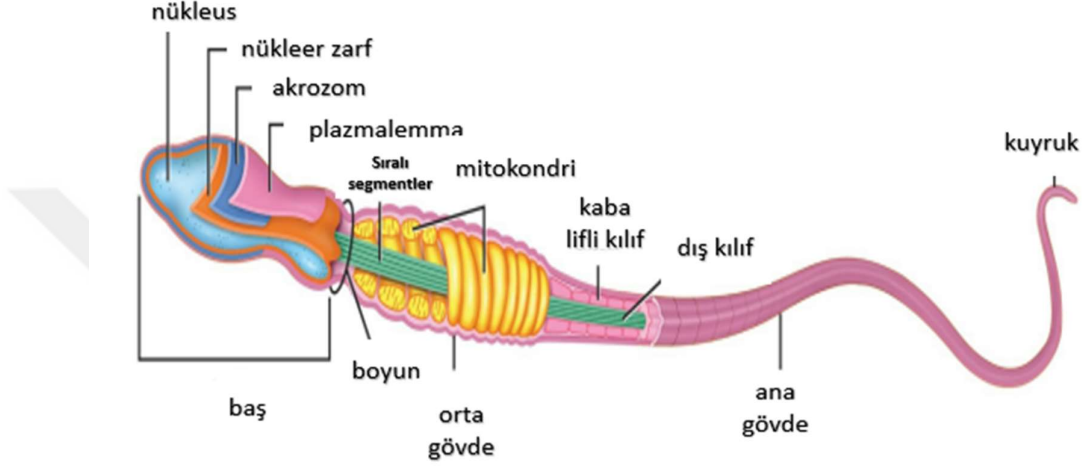
2.2.3.2. Boyun

Baş ve kuyruk arasında bir bağlantı oluşturur (Şekil 2.4). Mitokondri sperm hücresinin boyun bölgesinde yer alır ve sperm hareketliliği için enerji sağlar.

2.2.3.3. Kuyruk

Sperm kuyruğu yaklaşık olarak 55 μm 'dir. Boyun, orta, esas gövde kuyruk olarak dört kısımdan oluşur. Proksimal ve distal sentriyolü içeren ve başı kuyruğa bağlayan boyun bölgesidir (Şekil 2.4). Proksimal sentriyol çekirdeğe yakın, distal sentriyol ise, sperm kuyruğu olan aksonemin kaynağını oluşturur. Kuyruk; sperm hareketliliğini sağlayan sil yapısındaki mikrotübüllerden meydana gelmektedir. Sperm kuyruğu spermatid aşamasında ortaya çıkar. Spermatogenez sırasında, merkezci orta parça,

ana parça ve son parça olarak ayrılır. Mitokondri, orta kısım etrafında yeniden düzenlenir. Dokuz çift fibrilden oluşan ve eş merkezli bir halka ile çevrili iki fibrilden oluşan çekirdek, kuyruğun sonuna kadar devam eder. (Hafez, 1976).



Şekil 2.4. Sperm baş, boyun ve kuyruk kısımları.

2.3. Erkek İnfertilitesi

Kısırlığın küresel olarak çiftlerin %8-12'sini etkilediği ve çiftlerin yaklaşık %50'sinde erkek faktörünün birincil katkıda bulunan neden olduğu tahmin edilmektedir. Fertilitenin nedeni erkeklerde değişken olabilir. Spermatogenez sürecini engelleyen konjenital bozukluklar, birçok sağlık durumu ya da idiyomatik nedenler olabilir. Kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Semen analizi erkek infertilitesini değerlendirmede mihienk taşı olmaya devam etse de tanı ve yöntemi iyileştirmek için sperm kalitesini ve işlevini araştırmaya yönelik ileri tanı testleri geliştirilmiştir. Yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesi infertil çiftlerin çocuk sahibi olma şansını önemli ölçüde arttırmaktadır (Agarwal v. d., 2021).

2.3.1. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Son 40 yılda, Dünya Sağlık Örgütü, semen analizi testinde tekdüzelik ve uygunluk getirmek için semen inceleme metodolojisini standartlaştırmaya çalıştı. “İnsan Semeninin Örneğinin Değerlendirilmesi ve Çalışılması için Laboratuvar El Kitabı”nın

1. baskısı 1980 yılında yayınlanmıştır. Sonrasında, DSÖ el kitabının 5 baskısı daha yayınlanmıştır. 2010 yılında yayınlanan DSÖ kılavuzunun 5. baskısı dünya çapında uygulanmıştır ve erkek infertilitesinde en çok kullanılan tartışmalı belgelerden biri olarak kabul edilmektedir. Mart 2021'de DSÖ, halkın incelemesi ve önerileri için kılavuzunun 6. baskısının bir ön taslağını yayınlamıştır (Kandil v. d., 2021). Semen değerlendirmesinde normal değerler olarak kabul ettiğimiz sınırlar, fertil ve infertil çiftlerdeki semen değerlerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen istatistiksel değerlerdir. Normal sınırlar içinde olmasına rağmen doğurgan olan birçok erkek olduğu gibi, normal sınırlar içinde olmasına rağmen kısır olan erkekler de vardır. Ancak normal bir çifti değerlendirirken anormal semen analizi ve düşük sperm sayısı sonuçları direk olarak erkek faktörünü akla getirir ve ek olarak klinik ve laboratuvar değerlendirmeleri gerektirir. Tüm parametreler her zaman bir bütün olarak değerlendirilmelidir. Örnek olarak; ejakulat volümü, sperm hareketliliği ve morfolojik anormal sperm oranları her zaman bir bütün olarak değerlendirilmelidir. Semen değerleri arasında kısırlığa neden olan en fazla etkiye sahip olanlar sperm; *konsantrasyon, hareketlilik ve morfolojisidir*. Bu parametrelerden birinde sorun varsa doğurganlık açısından risk 2-3 kat, ikisinde sorun varsa 5-7 kat, üçünde de sorun varsa 16 kat artar. Semen analizinin nasıl yapıldığı ve analizi DSÖ tarafından yapılan yeni düzenlemelerle detaylı olarak belirlenmiştir. Semen analizinin belirli standartlara sahip laboratuvarlarda yapılması önerilir.

Erkek kısırlığının değerlendirilmesinde en temel test semen analizidir. 2 ila 7 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon ile verilir ve en geç 1 saat içerisinde değerlendirilir (Burrows v. d., 2002). DSÖ kriterlerine göre semen referans değerleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. DSÖ 2010 ve DSÖ 2021'e göre korunmasız cinsel ilişkiden sonraki bir yıl içinde gebe kalmaya çalışan çiftlerdeki erkeklerde semen parametreleri (WHO, 2010; WHO, 2021).

	DSÖ 2010	DSÖ 2021
Semen hacmi (ml)	1,5 (1,4-1,7)	1,4 (1,3-1,4)
Toplam sperm miktarı ($10^6/ml$)	39 (33-46)	39 (35-40)
Toplam hareketlilik (%)	40 (38-42)	42 (40-43)
Progresif hareketlilik (%)	32 (31-34)	30 (39-31)
Nonprogresif hareketlilik (%)	1	1 (1-1)
Hareketsiz sperm (%)	22	20 (19-20)
Yaşama oranı (%)	58 (55-63)	54 (50-56)
Normal formlar (%)	4 (3-4)	4 (3,9-4)

Erkek kısırlığı için nedenleri; seksüel; % 1,7, enfeksiyon; % 6,6, konjenital anomalilik: % 2,1, kazanılmış; % 2,6, varikosel; % 12,3, endokrin; % 0,6, immünolojik; % 3,1, idiyopatik; %75,1 (WHO; Patrick v. d., 1993). İnfertilite değerlendirilmesinde tıbbi öykü, semen analizi ve hormon (FSH, LH, Prolaktin, Testosteron, TSH) değerleri alınmalıdır.

2.3.1.1. Semen genel özellikleri

Ejakülat, sperm hücrelerinin yanı sıra, prostat, epididim, vas deferens, cowper bezleri ve üretral bezlerden gelen sıvılardan oluşan karışımıdır.

Sperma hücreleri ejakulatta bulunan esas hücre tipidir ve vas deferensin ampulla kısmında vas deferenste ve epididimin kauda kısmında yer alırlar. Semen volümünün %60'ı sekresyonlarından oluşur. Ejakülat visköz olup genellikle sarı renktedir (Bibbins v. d., 1992).

Prostat sıvısı ejakülat'n %20' sini oluşturur. Proteolitik enzimler bakımından zengindir ve böylelikle semenin sıvılaşmasını sağlarlar. Prostat sıvısında bulunan fibrinojen ejakülatın likefiye olmasını sağlar. Likefikasyon sonrası spermin hareket yeteneği artar. Diğer salgılar semenin %10-15 kadar bir kısmını oluşturur (Arce v. d., 1993).

Seminal sıvı sperm hücrelerinin enerjisi için gerekli besin maddelerini içerir; amonyak, kreatin, histamin, flavin, üre, vb., Ca, Cl, Fe, Mg, P, Na, K, S02, Zn vb., askorbik asit, ATP, sitrik asit, fruktoz vb. Ek olarak, amino asitler, glikoprotein, inhibin, insülin, prolaktin, relaksin, steroid bağlayıcı proteinler ve kan grubu antijenleri yer almaktadır (Gonzales v. d., 1992).

2.3.1.2. Semen hazırlık yöntemleri

Cinsel perhiz süresi 2 ila 7 gün arasında olmalıdır. Ejakülat örneği masturbasyon sonrası, laboratuvar çalışanı tarafından verilen steril kap içerisine alınır. Sperm analizi sonuçları sperm verme ve toplanma şekli, cinsel perhiz süresi ve aksesuar bezlerin aktivitesi gibi nedenlerden etkilenebilir. Bunlar mutlaka not edilmelidir (Alvarez v. d., 2003).

Makroskopik olarak; görünüm, viskoz olması, renk, hacim ve pH ölçümü yapılır. Mikroskopik analizde ise sperm aglütinasyon varlığı, sayısı, hareketlilik ve lökosit ve eritrosit benzeri hücrelerin değerlendirilmesi yapılır (WHO, 2010).

2.3.1.3. Makroskopik olarak inceleme

Sperm örneği verildikten sonra likefikasyon süresine bağlı olarak genelde 30 dakika ile bir saat içinde örnek incelemelidir. Likefiye olmayan yani sıvılaşmayan sperm örneklerinde mekanik pipetleme gerekebilir. Likefaksiyon prostattan salgılanan proteazlar tarafından gerçekleşir (WHO, 2021)

Normal örnek, homojen gri-opak görünüme sahiptir ve normal sperm sayısı homojen görünüme sahipken sayı az ise opak görünümü olabilir. Sperm örneğinde enfeksiyon mevcut ise koyu sarı renkte görülebilir. Eğer eritrosit içerirse kırmızı, kahve renkte olabilir ve enfeksiyon ve maligniteyi düşünmek gerekir (WHO, 2021). Normal semen hacmi 2 ila 6 ml arasındadır. Volümün az olması kanal tıkanıklığı veya konjenital vas deferens agenezisini düşündürür. Ayrıca, fazla semen hacmi aksesuar bezlerin inflamasyonunda görülen bir durumdur. Likefaksiyondan sonra yaklaşık 30 dakika içinde pH ölçülür. Semen örneği pH kâğıdı üzerine bir damla olacak şekilde yayılır. pH için 7,2 normal kabul edilir (WHO, 2021).

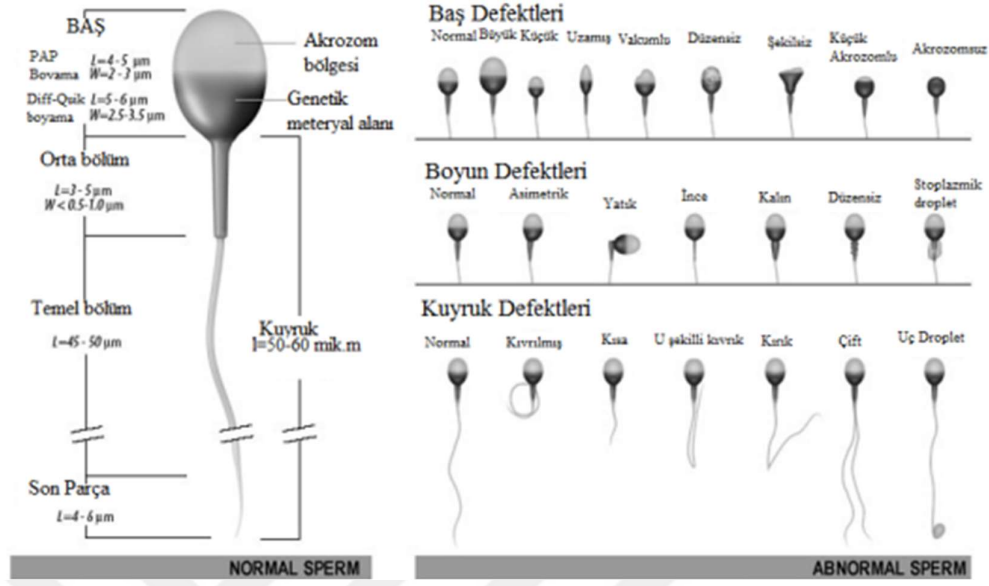
Sperm hareketlilik değerlendirmesi, sperm örneği likefiye olduktan sonra 30 ila 60 dakika içerisinde yapılmalıdır. Faz kontrast mikroskopta 200-400x büyütmede makler

kamarası ile değerlendirilir (Şekil 3.5). Sperm hareketliliğın değerlendirilmesi için progresif, nonprogresif ve hareketsiz şekilde 3 grup tanımlanmıştır (Tapısız v. d., 2012). Dölleme kapasitesi, gebelik oluşumu ve gebelik oranları ile ilişkilidir (Slama v. d., 2002).

Sperm sayımı için, makler sayım kamerası kullanılmaktadır. Makler kamerası, içerisinde yüz karelik bir alan bulunan bir sayım cihazıdır ve bu alan içindeki spermelerin sayılması yoluyla analizler yapılır (Tapısız, 2012). Sperm morfolojisi, boyama işleminin sonrası değerlendirilir. Sperm baş ve kuyruk anomalileri hareketlilik ve dölleme kapasitesi üzerine negatif etki oluşturur (Gardner v. d., 2010).

Morfoloji bakılırken tercih edilen boyama teknikleri papanicolaou, hematoksilen boya, toluidin blue-pironin, giemza ve nigrosin-eosin gibi teknikler sıralanabilir. Papanicolaou ve Diff-Quick boyaması en çok tavsiye edilen tekniklerdir. Günüzde daha çok Spermac ve Diff-Quik gibi boyama yöntemleri tercih edilmektedir (Gökçe v. d., 2011,).

Kruger ve ekibi tarafından Kruger-strict kriterleri ile sperm morfolojisi değerlendirilmeye başlanmıştır (Şekil 2.5). Kruger'e göre sperm normal morfoloji %4'den az olduğunda in vitro fertilizasyon yöntemi ile her oosit başına dölleme oranı %7,6 iken, %14'den büyük normal morfolojiye sahip spermelerde %63,9'a yükselmektedir. 2021 Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan laboratuvar kitabının da %4 oranı esas kriter olarak alınır (Hassa, 2003; Chemes v.d., 2003).



Şekil 2.5. Sperm morfolojik görünüşleri.

2.3.2. Sperm Hazırlık Yöntemleri

Sperm makroskopik incelenme işlemi sonrası sperm hazırlık yöntemi ikiye ayrılır; Gradient solüsyonu ve Swim-up metodudur (Oguz v. d., 2018).

2.3.2.1. Gradient yöntemi

Gradient yöntemi için yoğunluk farkı oluşturulur. %50-%90 veya %50-70-90'lık olacak şekilde gradient solüsyonları ile tabakalar oluşturulmaktadır. Sperm en üstten yavaşça bırakılarak tüpe aktarılır ve 1800 rpm 20 dk süre ile santrifüj edilerek üst fazlar atılır ve en altta kalan kısımda kalan sperm sıvısı alınır (Weinbauer v. d., 2010). Alınan sıvının üzerine yıkama solüsyonu eklenir tekrar santrifüj işlemi yapılarak yöntem tamamlanmış olur.

2.3.2.2. Swim-up yöntemi

Sperm örneği üzerine sperm yıkama solüsyonu eklenir ve karıştırılarak 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Sonrasında üst kısım alınarak altta kalan pellet kısmının üzerine 45 derecelik açı olacak şekilde tutularak sperm yıkama solüsyonu yavaşça eklenmektedir. 30 ila 60 dk sonra üst fazda bulunan sperm yıkama solüsyonuna doğru yüzmüş olan spermeler alınarak kullanılır (Volpes v. d., 2016).

2.4. Serotonin' in Fertilité Üzerine Etkisi

Serotonin; sinir hücreleri tarafından meydana getirilen bir nörotransmitter maddedir. Sinir hücrelerimizle mesajlar gönderir. Kan trombositlerinde ve merkezi sinir sisteminde de bulunmasına rağmen, en çok sindirim sisteminde mevcuttur. 5-HT, önemli bir amino asit olan triptofana dayanır. Düşük 5-HT seviyeleri, triptofan eksikliğinden kaynaklanabilir. Duyularınızdan motor becerilerinize kadar, 5-HT vücudunuzun her bölgesini etkiler. Triptofan, mevcut olan en büyük hidrofobik aminoasit yapısına sahip olup, proteinlerin katlanmasıyla oluşan sinyallerin oluşumunda önemli bir görev alır (Aoyagi v. d., 2001). Ayrıca, protein moleküllerinin yapısında en az bulunan aminoasitlerden biridir ve genellikle protein ağırlığının yaklaşık %1-2'sini oluşturur. Triptofan için genetik kod olarak yalnızca bir UGG vardır ve bu, diğer kodon parçalarının UGA, UAG ve UAA ile çakışmasından dolayı evrimsel olarak bir öneme sahiptir. 5-HT, triptofandan iki enzim tarafından sentezlenir. Moleküler oksijen gerektiren bir enzim olan tetra hidro-biyopterin ve aromatik aminoasit decarboksilaz yapıları, piridoksal fosfat gerektiren diğer enzimlerdir. Monoamin oksidaz A ve B yapıları, H₂O₂ ve hidroksi-indol-asetik asit yapılarını oluşturur. Bu mekanizma ilk defa funguslarda gözlenmiştir (Sablin v. d., 1998). 5-HT, omurgalılarda metilasyon yolu ile melatonin üretebilir (Azmitia, 2010). Triptofan hidroksilaz, 5-HT sentezini yavaşlatan ve sınırlayan bir enzimdir ve moleküler ağırlığı 51 kDa ve 444 amino asitten oluşur (Azmitia, 2007).

5-HT insanlar da dahil olmak üzere birçok türün testislerinde normal olarak bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca, 5-HT metabolize eden enzim olan monoamin oksidaz (MAO), sıçan ve insan testislerinin interstisyel hücrelerinde, seminifer tübüllerinde ve epididimitlerinde bulunur (Kalla, 1979; Levine, Sjoerdsma, 1962).

DeneySEL verilere gören normal aralıkta artan 5-HT, spermatozoanın hareketliliğinde ki iyileşme ile ilişkilidir, bu da fizyolojik bir rol olduğunu düşündürür. Bununla birlikte, bulgularımız, 5-HT'nin hareketliliği sağlamak için spermatozoa üzerinde etkili olduğu gösterilebilir.

Bazı araştırmacılara göre, 5-HT'nin testis fonksiyonlarına üzerine etkisi, serotoninin steroid salgılayan leydig hücreleri üzerinedir. Ve leydig hücrelerini doğrudan inhibe edici etkisinden kaynaklanan azalmış testosteron üretimine bağlı olduğunu düşünülmektedir (Kalla, 1979). Diğer çalışmalar, 5-HT'nin doğrudan seminifer

tübüller üzerinde testosteron seviyelerini değiştirmeden spermatogeneze ve serum seviyelerine etki edebildiğini göstermiştir (Niaraki v. d., 1982).

Serotonin ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise 5-HT seviyelerinin, *Drosophila platonica* (plt) erkeklerinin çiftleşmesi üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir. *Drosophila platonica* (plt) erkekleri dişiler ile ilişkiye girmek ister ancak çiftleşmeyi başaramaz. Çünkü plt'nin bir BMP (Kemik morfogenetik protein) sinyal bileşeni olan scribbler'(sbb)'nin anomalili bir alleli olduğu gösterilmiştir. Larvalarda sbb yıkımı, cinsiyet belirleyici protein Doublesex'i ifade eden yaklaşık sekiz serotonerjik nöronun kaybına yol açtığı ve 5-HT'nin dsx ifade eden nöronlardan genetik yoksunluğu, çiftleşme kusurlarına neden olduğu gösterilmiştir. 5-HT verilerek çiftleşmenin normal yürütülmesini desteklenmiştir. Belirli bir dsx ifade eden nöron alt kümesinin oluşması için sbb+ gelişimsel olarak gereklidir. Çiftleşme mekanizmalarının ve fertilitenin kontrolü için serotonerjik nöronların korunmuş katılımını ve cinsiyete özgü bir devre oluşumunda BMP sinyalinin anahtar rolü vurgulanmaktadır. 5-HT eksikliği yoluyla mutant erkeklerde çiftleşme kusurlarına neden olduğu gösterilmiştir. Cinsiyete özgü davranışlar için hücresel substratların geliştirilmesinde, çiftleşmenin düzenlenmesinde ve BMP sinyalinin düzenlenmesinde 5-HT'nin korunmuş rollerini vurgulamaktadır (Yilmazer v. d., 2016).

2.4.1. L- Karnitin ve Koenzim Q10'un Fertilité Üzerine Etkisi

DNA hasarının ölçülebilirliğine dair yapılan araştırmaların çoğalmasi ile birlikte serbest radikallerin kısırlık üzerine etkileri anlaşılmaya başlamıştır. Sigara ve alkol kullanımı vücutta serbest radikallerin artışına sebep olur. Ek olarak, enfeksiyonlara bağılı yanıt (örneğin T lenfosit, TNF alfa ve proinflamatuvar sitokin salınımının artması) vücudun serbest radikallere maruz kalmasına yol açar. Artan serbest oksijen radikalleri erkeklerde sperm hareketliliğini, semen hacmini, sayısını; kadınlarda, yumurta kalitesini, dölllenme oranını, canlılığını negatif yönde etkilemektedir. L-C ve CoQ10'un mitokondrial olayları düzenlenmesi ile sperm ve oosit hücrelerinin enerji metabolizmasını iyileştirdiği gözlenmiştir (Cecchino v. d., 2018). CoQ10 desteğı ile sperm hareketliliğı ve sayısının pozitif yönde arttığı gözlenmiştir (Balercia v. d., 2009). Majida ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, CoQ10 ve L-C etken maddesinin (düşük konsantrasyon 20 mikrogram (μg) ve yüksek konsantrasyon 40 μg) kombinasyonu, in vitro sperm parametrelerini iyileştirmek için

SMART-Pro (sperm yıkama medyumu) ortamına eklenmiştir. Aktivasyon sonrası tüm semen örnekleri için sonuçlar, aktivasyon öncesi ile karşılaştırıldığında normal sperm morfolojisinin yüzdesinde anlamlı ($P < 0.05$) bir artış ve sperm konsantrasyonunda önemli bir düşüş ($p < 0.05$) olduğunu, aktivasyon sonrası fragmente sperm DNA yüzdesinde anlamlı ($p < 0.05$) bir azalma görüldüğünü ve 40 µg L-C ve CoQ10 ile tedavi edilen spermatozoadaki DNA fragmentasyonunun, aktivasyon sonrası gruplar arasında en düşük seviyede olduğunu göstermişlerdir (Majida v. d, 2015).

Sperm mitokondriyal enerji üretimi için yeterli CoQ10 ve L-C konsantrasyonları önemlidir. Organizmada Q döngüsünde CoQ10'un üç redoks durumu meydana gelir: ubiquinone (CoQ10-oksitlemiş), ubiquinol (CoQ10H2-indirgenmiş) ve semiquinone (radikal olarak kısmen indirgenmiş). Güçlü bir lipofilik antioksidan olan ubikinol; C vitamini, E vitamini ve diğer antioksidanlar gibi antioksidanları yeniden üretebilir. Vücutta bulunan toplam ubiquinol miktarı, CoQ10'un yaklaşık %90'ı kadardır. Sperm hareketliliği, seminal sıvıdaki ubiquinol konsantrasyonu ve sperm sayısı arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. CoQ10 biyosentezi testislerde çok fazladır ve spermde yüksek seviyelerde bulunur. Sperm hareketliliği ile seminal plazma CoQ10 miktarı arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur CoQ10, solunum zincirinde elektron taşınmasını kontrol eder; elektronları kompleks I ve kompleks II'den alıp kompleks III'e taşır; ve protonları yağ asitlerinden matrise taşır. CoQ10, dış mitokondriyal zarın (OMM) voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC) aracılığıyla geçirgenlik geçiş gözenek açıklığını ve beslenme alımını kontrol edebilir. (Gvozdjakov v. d., 2014).

L-C ve asetil-L-C tek başına veya birlikte oksidatif stresi önemli derecede azaltır. L-C spermatozoa için enerji sağlar ve olgunlaşması üzerinde etkisi vardır. Ayrıca ROS'a karşı koruma sağlayan antioksidanlardır. L-C-ubikinol kombinasyonunun infertil erkeklerin sperm mitokondrileri üzerindeki faydalı etkisinin mekanizması, dış mitokondriyal zarın (OMM) VDAC tarafından alınması ve OMM deki karnitin palmitoil transferaz I (CPT I) aktivitesi ile ortaya çıkabilir.

2.4.2. Sperm DNA'sının Hasarı

Sperm kromatinin bütünlüğü, Y kromozumuna ait genetik bilginin iletilmesi için esastır. Sperm DNA hasarının da IVF tedavileri üzerinde olumsuz etkisi vardır. Sperm sayısı ve hareketliliği düşük olan erkek bireylerin, diğerlerine göre önemli ölçüde daha yüksek oranda sperm DNA fragmentasyonuna sahip olduğu bulunmuştur (Erenpreiss v. d., 2006; Spano v. d., 2000). Yardımcı üreme teknolojileri (ART) ile sperm DNA hasarı arasında çok sayıda araştırma negatif ilişkiler göstermiştir. (Lin v. d., 2008).

Spermatogenezin herhangi bir aşamasında sperm DNA'sı zarar görebilir. Sperm DNA'sını bozmak için en az üç moleküler yolun olduğu öne sürülmüştür: (i) sperm çekirdek kromatin yapısındaki değişiklikler (ii) geç apoptoz ve (iii) O.S. Kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi sperm işlevleri, küçük miktarlarda üretilen reaktif oksijen türlerinden (ROS) etkilenir. Bununla birlikte, aşırı ROS üretimi, sperm fonksiyonu ve morfolojisi ile negatif bağlantılıdır ve ürogenital sistem enfeksiyonları, nötrofiller ve makrofaj, radyasyon, kemoterapi ve sigara artan ROS üretimi ile ilişkilendirilmektedir (Aziz v. d., 2010).

Sperm hücrelerinin üretimi sırasında sperm hücresinde DNA hasarına neden olan ve tetikleyen temel mekanizmalar şunlar

- (i) spermatogenez sırasında apoptoz;
- (ii) spermiyogenez esnasında sperm kromatinin tekrar şekillenmesi sırasında DNA iplik kopmaları;
- (iii) oksijen radikalleri tarafından indüklenen DNA fragmentasyonu
- (iv) endojen kaspazlar ve endonükleazlar tarafından indüklenen DNA fragmentasyonu;
- (v) radyoterapi ve kemoterapiden dolayı DNA hasarı ve
- (vi) toksik maddelerin neden olduğu DNA hasarı.

Sperm DNA fragmentasyonuna neden olan olaylardan biri, testis kan dolaşımından dolayı oluşan ısı farklılıklarıdır (Suganuma v. d., 2005). Bununla birlikte, spermatogenez işlemi sırasında oluşan negatif etkilerin, testis dolaşımı sonrası oluşan hasara karşı daha duyarlı hale getirip getirmediği sorusu hala cevapsızdır.

2.4.3. Reaktif Oksijen Türevleri

Serbest radikaller olarak bilinen reaktif oksijen türevleri, oksijen metabolizmasının bir sonucu olarak üretilen en az bir eşleşmemiş elektrona sahip oksitleyici maddelerdir.

Serbest radikaller en yakın kararlı moleküle saldırırlar ve kendileri de bir zincirleme reaksiyon başlatırlar. Serbest radikaller çevrelerinde karşılaştıkları biyomolekülleri çok hızlı bir şekilde oksitleyebilir ve böylece olumlu veya olumsuz bir etki gösterebilir. Normal aerobik metabolizma, optimal ROS seviyeleri ile ilişkilidir çünkü ROS üretimi ile antioksidan aktivitesi arasında bir denge vardır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı oluşumu ve antioksidanların bu serbest radikalleri temizleyememesi nedeniyle sayıca antioksidanlardan fazladır (Sharma v. d., 1999). Bu tür olaylar hücre, doku ve organlara zarar veren patolojik etkilere neden olur (Aitken ve Baker, 1995).

Sperm hücresi; kapasitasyon işlemi, hiper-aktivasyon ve oosit-sperm füzyonu gibi işlemlerde eser miktarlarda ROS üretir (Sies, 1993; Lewis v. d., 1995). Bununla birlikte, normal hücre işlevini sürdürmek için gerekli olan yalnızca küçük bir miktarı tutmak için ROS sürekli olarak etkisiz hale getirilmelidir. Sperm maturasyon sürecinde, antioksidanların ana kaynağı olan rezidual (artık) sitoplazmada birikir. Bu süreç yavaşladığında, kalıntı sitoplazma, spermin orta bölgesinde sitoplazmik bir damlacık oluşturur ve sitoplazmik damlacıklar taşıyan bu olgunlaşmamış ve işlevsel olarak kusurlu spermatozoalar antioksidan ana kaynağıdır (Huszar v. d., 1997).

Residual, artık sitoplazma; aynı zamanda bir ROS kaynağı olan sitoplazmik enzimleri (G6PDH, SOD) içerir (Gomez v. d., 1996). Sperm hücresinin sitoplazma azlığı, antioksidan savunmanın azalmasına neden olur. Zayıf sperm kalitesi ile yüksek ROS arasında bir ilişki vardır. ROS üretmek için spermin iki ana sistemi vardır. Biri sperm plazma zarı seviyesinde NADH bağımlı oksidaz sistemidir, diğeri ise NADH bağımlı oksido-redüktaz (diforaz) sistemidir (Aitken v. d., 1997). Olgunlaşmamış spermatozoaların ROS üretimi ile sperm kalitesi arasında güçlü bir pozitif korelasyon vardır (Gomez v. d., 1998). İnsan ejakülatında DNA'sı hasarlı matür spermatozoa konsantrasyonu arttıkça immatür spermatozoa konsantrasyonu da arttığı gösterilmiştir (Gil-Guzman v. d., 2001).

Üreme sisteminde bulunan fazla ROS üretimi, sperm plazma zarının akışkanlığını ve bütünlüğünü etkiler. Sperm çekirdeğindeki DNA bazları, modifikasyonlara, sarmal kırılmalara ve kromatin çapraz bağlanması ile sonuçlanan oksidatif hasara karşı hassastır. Oksidatif stres nedeniyle DNA hasarı mutajenik değişimlere neden olur, bu

da döllenmeyi etkiler. Oosit, ilk bölünmenin başlamasından önce DNA iplikçik kırıklarını onarmalıdır, ancak daha az oksidatif madde olduğunda fertilizasyon gerçekleşebilir. Apoptoz ve OS, germ hat'ı DNA'sını zarar verir. Genetik yapısı nedeniyle Y kromozomu DNA hasarına açıktır ve çift sarmallı DNA delesyonunu düzeltemez. (Agarwal v. d., 2005).

2.4.3.1. Spermilerin ROS analizi

Bu yöntemde hidroksil, peroksil ve diğer ROS aktivitesini ölçmek için florojenik bir boya kullanılır ve ölçümler flow sitometrik yöntemle yapılır. Klinik validasyon çalışmalarında flow sitometrik ROS ölçümü fertilitenin bilinen faktörlerle ilişkili olarak bulunmuştur. ROS pozitif referans değeri %17,8 olarak alınmıştır. Sperm hücreleri 20,70-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) hücre içi H₂O₂'yi algılar ve dihidroetidyum (DHE) hücre içi O₂'yi algılar. DCFH-DA stabil, sperm geçirgen, floresan olmayan bir probdur ve serbest hücre içi H₂O₂ tarafından oksitlenir. 20,70-diklorofloresine (DCF) dönüşür ve yeşil bir renk verir. Etidyumun sodyum borhidrür ile indirgenmiş şekli DHE olarak bilinir. DHE, spermatozoa içinde serbestçe geçer ve bir süperoksit tarafından doğrudan EB (etidyum bromür) oksitlenebilir. Anyon, sperm hücresi tarafından üretilir. EB kırmızı bir ışık verir. ROS seviyelerinin ölçümü için, 1 ml sperm fraksiyonlarına ayrı ayrı DCFH-DA (25 l M) ve DHE (1,25 l M) ilave edilir ve 25°C'de DCFH-DA için 40 dakika ve DHE için 20 dakika karanlıkta inkübe edilir. Daha sonra, FL-1 kanalında saptanan yeşil flüoresans (DCF) 500 ile 530 nm arasında değerlendirilir; kırmızı flüoresans (HE), 590 ile 700 nm arasında değerlendirilir (uyarma dalga boyu 488 nm ve emisyon dalga boyu 530 nm olan FL-2 kanallarında). Veriler, floresan spermatozoa yüzdesi olarak ve DCFH-DA işlemi, DHE boyaması ve santrifüjü olmayan numune, negatif kontrol olarak değerlendirilir.

2.4.4. Apoptoz

Apoptoz için somatik hücrelerin iki ana yolu vardır: ekstrinsik veya intrinsik mitokondriyal. Uygun sitokinler, bağlanan tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörleri aracılığıyla apoptozun ekstrinsik yolunu başlatır. TNF-reseptör kümesi oluşumuna ve ardından Fas ile ilişkili proteinin ölüm alanı (FADD) ve kaspaz-8 veya kaspaz-10 ile aktivasyonuna neden olur, bu da ölüm reseptörü kaynaklı bir sinyal kompleksini temsil eder (Aitken, 2011). Programlanmış hücre ölümü, bozulan hücre homeostazı ile

bağlantılı olarak apoptozun içsel yoludur. Apoptozun düzenlenmesini sağlayan B hücreli lenfoma 2 (BCL-2) ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinleri arasındaki etkileşim ile düzenlenir (Youle v. d., 2008).

İntrinsik yolla apoptozu indüklemek için, sitokrom C'yi ve diğer apoptotik faktörleri, genellikle bu organoidin dış zarının penetre edilebilirliğinin artmasıyla ortaya çıkan mitokondriden salmak gerekir. Bu süreç pro-apoptotik BCL-2 ile ilişkili X/BAX ve BCL/2 proteinleri ve muhtemelen BCL/2 ile ilişkili yumurtalık öldürücü tarafından kontrol edilir; yalnızca BH3 ailesinden (tek bir BH3 alanı içeren BCL-2 proteinleri) pro-apoptotik proteinler tarafından aktive edilebilir (NOXA) (Aitken, 2011).

Sitokrom C salındığında direk olarak apoptozom oluşumuna katılır. Mitokondriyal elektron taşıma zincirini (ETC) bozar ve böylece oksijenin dört elektronunu bir elektrona indirgeyerek su yerine süperoksit oluşumuna neden olur. Apoptozom, sırasıyla caspase-9'u aktive ederek caspase-3 ve caspase-7'nin müteakip aktivasyonu ile kaspaz kaskadını başlatır (Cai v. d., 1998). Fosfatidilserin daha sonra zarın sitoplazmik yüzeyinde salınır. Programlanmış hücre ölümü ile nekroz arasındaki temel ayırım olan apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından fagositozu için bir sinyaldir (Dogan v. d., 2013).

Erkek gametler, gelişimleri sırasında somatik hücrelere benzer şekilde ölür. Somatik hücre işlemine benzer şekilde, spermatogenez sırasındaki apoptoz sürecindeki önem, DNA hasarına ve diğer bazı hücresel homeostaz sorunlarına yanıt olarak hücre sayısının düzenlenmesi ve hücrelerin ortadan kaldırılması talebiyle belirlenir. Ejakülatta apoptotik bir spermatozoanın varlığının birçok nedeni olabilir.

2.4.4.1. Semende apoptoz tayini (Anneksin V yöntemi)

Anneksin V- Alexa Fluor™ 488, PI antikoru kullanılarak flow sitometri yöntemi ile apoptotik ve nekrotik sperm hücrelerinin miktarı belirlenmektedir. Anneksin V'in erkek hastanın tedavi sürecinde verdiği cevabın takip edilebileceği bir biyomarker olarak kullanılması amaçlanmaktadır.

Hücre zarının çift tabakasının asimetrisi, apoptoz sürecinde meydana gelen en erken olaylardan biridir. Plazma zarında fosfatidilserin (PS), içten dışa doğru hareket eder. PS'nin hücre yüzeyinin dışına maruz kalması, hücrelerin apoptozun erken aşamasında olduğunu belirleme yeteneğine sahiptir. Bu hücreler, Anneksin V'in kalsiyuma

bağlanmasıyla tespit edilebilir (Koopman v. d., 1994; Andree v. d., 1990; Meers ve Mealy, 1993).

Birçok çalışmada, PS ifadesini saptayan flow sitometrisi ile birlikte floresan izotiyosiyanat (FITC) etiketli. Annexin V ile boyama kullanılarak spermatozoa tespit edilir. Canlı, apoptotik ve nekrotik spermleri aynı anda ayırt etmek için ek olarak vital boya propidyum iyodür (PI) etiketleme kullanılabilir. Apoptozun en karakteristik özelliği, apoptoz kaskadında nispeten geç bir fenomen meydana gelen endojen bir endonükleazın aktivasyonudur.

2.4.4.2. SCSA® sperm kromatin yapı testi

SCSA, sperm DNA bütünlüğünün ve kromatin yapısının eş zamanlı flow sitometrik ölçümleri için tescilli bir protokoldür. Klasik olarak, erkek fertilitatesini değerlendirmek için sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisini içeren semen testleri kullanılır. Bununla birlikte, son yüzyıllarda yapılan çok sayıda araştırma, sperm eksikliği dışında bu parametrelerin infertil ve fertil olma konusunda yetersiz olduğunu göstermiştir. Klasik semen testleri; ışık mikroskobu ölçümleridir.

SCSA testi ise ışık mikroskobu ile görülemeyen iç nükleer faktörleri ölçer ve SCSA testi, bir akış sitometresi gerektiren yüksek hassasiyetli bir testtir.

SCSA testi ile aşağıdaki veriler bulunabilir:

1. Her iki DNA sarmalının da kırılma derecesi
2. Sperme ait protaminler için değişen somatik histonların miktarı
3. Tüp bebek ile doğal gebelik sonuçları arasındaki ilişki
4. Genel olarak sağlıklı erkekler için göstergeler
5. Üreme toksik maddelerine doz yanıtı

L-C ve CoQ10 miktarı belirlenen sperm yıkama medyumu geliştirildikten sonra oluşturulan prototip yıkama medyumu ile yıkanan sperm örneklerinde DNA hasar testi için Flow Sitometri cihazı kullanılmıştır. Bu yöntem ile In Situ Cell Death Detection Fluorescein Kit kullanılarak Flow Sitometri cihazı ile yaklaşık 50000 hücre analiz edilerek hasarlı DNA içeren sperm hücrelerinin miktarını belirledik. Testin spesifitesi

%91,6 olarak bildirilmiştir. Test, sperm DNA fragmentasyonu'nu DNA'nın dUTP ucundan işaretleyerek Flow Sitometrik olarak ölçümlendirilir (Donald, 2022).

3. METOT

3.1 Medyumun Ana Bileşimi

Dünya Sağlık örgütü'nün hazırlamış olduğu *Androloji Laboratuvar* kitabında ve *Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği'nin (ESHRE)* belirttiği kriterler ve miktarlar doğrultusunda, sperm yıkama medyumu için üç farklı medyum (Earle, HAM F-10, BWW) hazırlandı. Proje önerisinde Nidacon marka sperm yıkama medyumu yerine Origio ® markası yurt dışında daha yaygın olarak kullanıldığı ve daha etkili olduğu için kontrol gruplarında kullanılmıştır. Hazırlanan medyumlar, Irvine ® Scientific ve Origio ® markaları ile yıkanan spermelerin hız ve sayıları değerlendirilmiştir. (WHO, 2010)

3.1.1. Earle Medyumu

750 ml saf suya 6,8 gram NaCl, 2,2 gram NaHCO₃ ve 0,14 gram NaH₂PO₄ eklenir. H₂O'da 0,4 g KCl, 0,20 g MgSO₄.7H₂O ve 1,0 g D-glukoz ilâve edildi. 0,20 g CaCl₂ çözelti içinde yavaş olarak karıştırılarak çözüldü. 1 mol/l HCl veya 1 mol/l NaOH pH'ı 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Saf suyla 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.2. Biggers, Whitten ve Whittingham (BWW) Medyumu

BWW Stok Çözeltisi: 1000 mililitre saf suya 5,54 gram sodyum klorür, 0,356 gram kalsiyum klorür ve 0,294 gram magnezyum sülfat dahildir. 7H₂O ve 0,250 gram CaCl₂.2H₂O ve 0,162 g KH₂PO₄ eklenmiştir. 1 mol/L NaOH'un pH'ı 7,4 oldu. Her litreye 1,0 ml (%0,04, 0,4 g/L) fenol kırmızısı ilâve edildi Tüm yıkama medyumları kullanımdan önce insan serum albümin eklenerek, etüvde 37°C'de ısıtıldı.

3.1.3. HAM F-10 Medyumu

Dünya Sağlık örgütü'nün hazırlamış olduğu *Androloji Laboratuvar* kitabında ve *Avrupa Üreme ve Embriyoloji D'rneği'nin* belirttiği kriterler ve miktarlar doğrultusunda; 750 ml saf suya 7,4 g NaCl, 1,2 g NaHCO₃, 0,285 g KCl, 0,154 g Na₂HPO₄, 0,153 g MgSO₄.7H₂O, 0,083 g KH₂PO₄, 0,044 g CaCl₂.2H₂O ve 1,1 g D-

glukoz ilâve edildi. 1 mol/ (NaOH) ile pH'ı 7,4'e getirildi. Saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Hazırlanan medyumlar, Irvine ® ve Origio ® markaları ile yıkanan spermlerin hız ve sayıları değerlendirildi. İthal sperm yıkama medyumlarının bileşimindeki ürünlerin miktarlarının ICP-MS metodu ile tayin edilip, kullandığımız medyumun içeriğiyle mukayese edilmiştir. Origio ® markasına ait yıkama medyumunda Na, Mg, K ve Ca miktarları, ICP-MS ile analiz edilerek kontrol olarak HAM F-10 ile kıyaslanmıştır. ICP-MS, bir tür kütle spektrometresidir. Medyumun ana bileşenini tespit etmek için 32 hasta ile çalışılmıştır.

3.2. Sperm Hücrelerinin Toplanıp Yıkaması

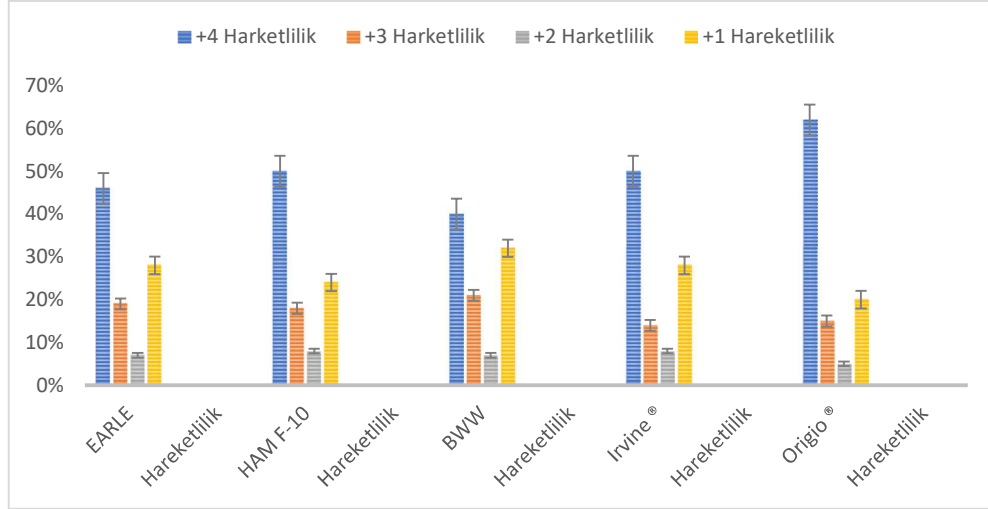
Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tüp Bebek Bölümünde 28-40 yaş aralığındaki erkeklere ait meniler (semen) kullanılmıştır. Azoospermia, şiddetli oligospermia, astenozoospermia, testiküler atrofi ve varikosel olan hasta örnekleri çalışmaya dahil edilmemiştir. Sperm örnekleri, üç ila dört günlük cinsel perhizden sonra elde edilmiştir. Tüm semen numuneleri steril kaba toplanmış, daha sonra numunelerin 37°C'de 30 dakika süre ile sıvılaşması sağlanmıştır (likefikasyon). Numunenin 10 µL'si makler sayma kamarasına alınmış ve spermin konsantrasyonu, hareketliliği, canlılığı, morfolojisi ve lökosit varlığı değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Sperm hızı belirtilirken +4, +3, +2 ve +1 denilen hız terimleri kullanılır. +4 çok hızlı hareket eden, +3 anormal hareketli, +2 genelde kendi yerinde aktif olan ve +1 ölü spermleri tanımlamak için kullanılır (+4, +3, +2); genel (total hareketlilik), (+4 ve +3); progresif (+2); non-progresif, (+1); hareketsiz sperm olarak ifade edilir.

İlk olarak, 5-HT eklenmeden önce ana medyum seçimi için; *Earle (Essential Medium Eagle With Earle's salts, L-glutamine and sodium bicarbonate)*, *Ham F-10 (Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham)* ve *BWW (Biggers, Whitten and Whittingham medium)* medyumları karşılaştırılmıştır ve hareketliliği en iyi olan ana medyum olarak kullanılmıştır. (Tablo 3.1, Şekil 3.1.)

Tablo 3.1. Earle, HAM F-10, BWW medyumlarında sperm hızı yüzdesi. Çalışılan hasta sayısı: 32.Kontrol medyum: Irvine ®, Origio ®, Test Medyum: Earle , HAM F-10, BWW

Genel Hız	+4 Harketlilik	+3 Harketlilik	+2 Harketlilik	+1 Harketlilik
EARLE Harketlilik	46%	19%	7%	28%
HAM F-10 Harketlilik	50%	18%	8%	24%
BWW Harketlilik	40%	21%	7%	32%
Irvine ® Harketlilik	50%	14%	8%	28%
Origio ® Harketlilik	62%	15%	5%	20%



Şekil 3.1 Earle, HAM F-10, BWW test medyumlarında sperm hızlarının karşılaştırılması.

Kontrol grubunda *Origio*® +4 sperm hareketi oranı daha yüksek (%62) ve +1 sperm hareketi oranı *Irvine*® medyuma göre daha düşük (%20) olduğunu göstermektedir.

Hazırlanmış medyumlar arasında da *HAM F-10* medyum grubunda +4 sperm hareketi ortalaması %50 ve +1 sperm hareketi ortalaması %24 olarak değerlendirilmiştir. *HAM F-10* sonuçları *Origio*® ve *Irvine*® değerlerine yakın olduğu için *HAM F-10* adlı medyumunu ana medyum olarak seçilmiştir.

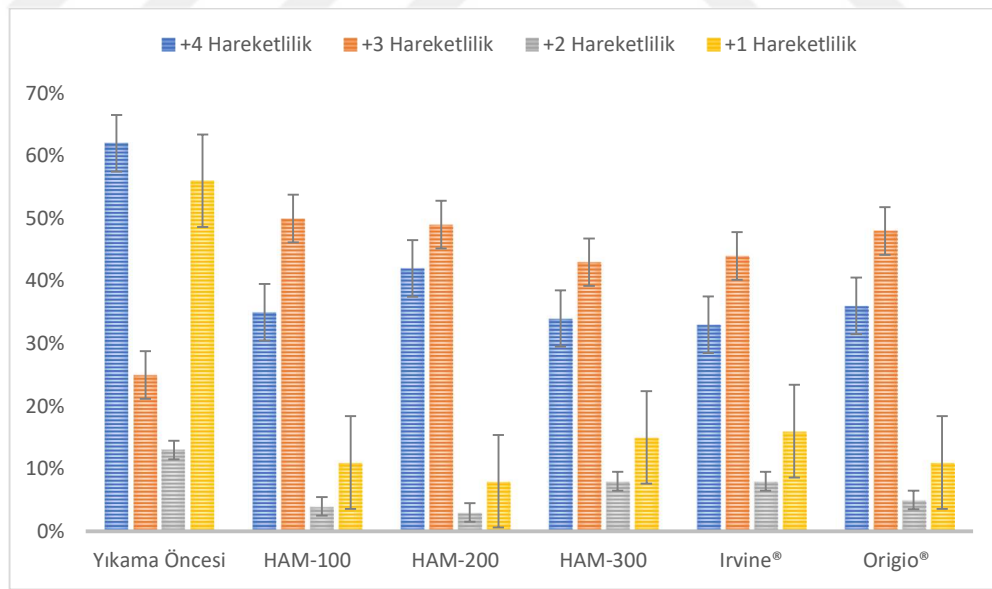
3.3. Serotonin Dozunun Belirlenmesi

5-HT dozunu belirlemek için 40 hasta ile çalışılmıştır. 100, 200 ve 300 µM dozlarda 10 ml'lik hepes tamponu içeren HTF tabanlı sperm yıkama medyumunu ile çözelti hazırlanmıştır, 75 dakika inkübe sonrasında hız kontrolleri yapılmıştır. Kontrol grubunda +4 sperm hareketi ortalaması %62 iken 100 µM 5-HT içeren çözeltide %89, 200 µM 5-HT içeren çözeltide %91 ve 300 µM 5-HT içeren çözeltide %85 olarak gözlenmiştir. +4 sperm hareketinin %62 'lerden %91 oranına çıkması çok önemli bir gelişmedir. Eylül 2018'de Türk Patent Enstitüsü'ne (Patent No: 2018-14102), Eylül 2019'da Uluslararası PCT başvurusu yapılmıştır ((PCT/TR2019/050796).

HAM F-10 medyumuna 100, 200 ve 300 µM/10ml 5-HT eklenerek sperm hızları karşılaştırılmıştır. (HAM-100, HAM-200 ve HAM-300). (Tablo 3.2, Şekil 3,2.)

Tablo 3.2. HAM-100, HAM-200, HAM-300 medyumlarında sperm hızı yüzdesi, Çalışılan Hasta sayısı: 40, Kontrol Medyum: Irvine®, Origio®, Test Medyum: HAM-100, HAM-200, HAM-300

	+4 Hareketlilik	+3 Hareketlilik	+2 Hareketlilik	+1 Hareketlilik
Yıkama Öncesi Hareketlilik	62%	25%	13%	56%
HAM-100 Hareketlilik	35%	50%	4%	11%
HAM-200 Hareketlilik	42%	49%	3%	8%
HAM-300 Hareketlilik	34%	43%	8%	15%
Irvine® Hareketlilik	33%	44%	8%	16%
Origio® Hareketlilik	36%	48%	5%	11%



Şekil 3.2 HAM-100, HAM-200, HAM-300 test medyumlarında sperm hızlarının karşılaştırılması.

Kontrol grubunda Origio® +4 sperm hareketi oranı (%36) ve +1 sperm hareketi oranı (%11) olduğu göstermektedir. Hazırlanmış olunan medyumlar arasında da HAM-200 medyum grubunda +4 sperm hareketi ortalaması %42 ve +1 sperm hareketi ortalaması %8 olarak değerlendirildi. HAM-200 sonuçları Origio® ve Irvine® değerlerinden daha iyi olduğundan dolayı bu aşamada **HAM-200** adlı medyum devam edilen medyum olarak seçildi.

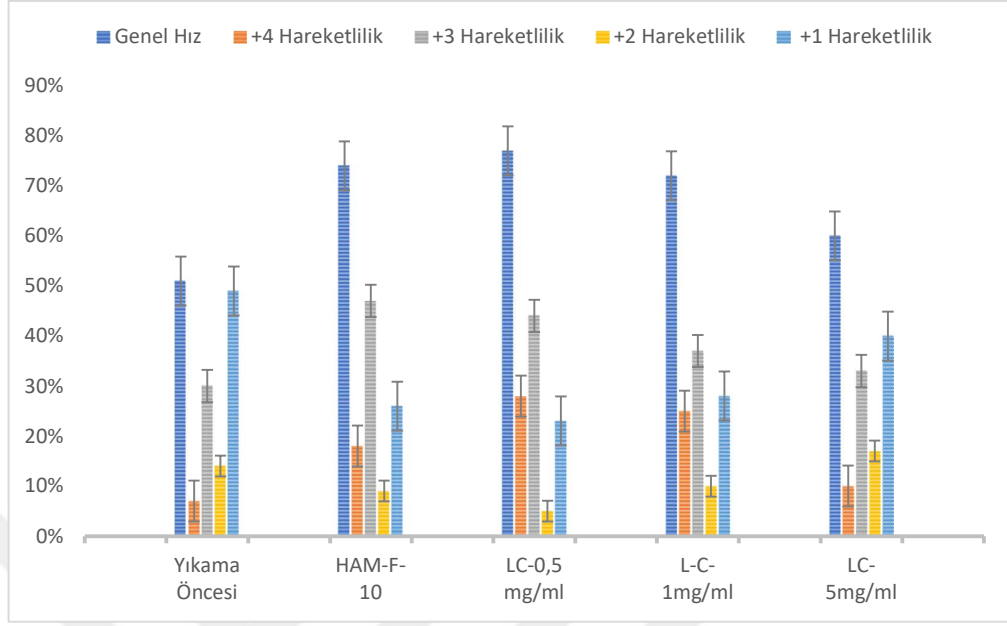
Tamamlanan TEYDEB 1512 proje sonuçları, yapılan literatür taraması ve ön çalışmalar sonucu farklı oranlarda Serotonin (5-HT 3-(2-Aminoethyl)- SC-298707 1 g) ile yıkanan sperm yıkama medyumu ile ana bileşen geliştirildikten sonra L-C (L-Carnitine SA-840092 25 g) ve CoQ10 (Coenzyme Q10 SAC9538 1 g) içeren yıkama solüsyonları hazırlanıp, sperm üzerindeki sayı, hız ve morfolojik değişiklikleri incelenmiştir. Kendi geliştirdiğimiz medyumla daha önce etkin dozları bilinen 5HT 3-(2-Aminoethyl)- SC-298707 1 g) ve L-C (L-Carnitine SA-840092 25 g) ve CoQ10 (Coenzyme Q10 SAC9538 1 g) ilave edilerek zenginleştirilmiştir.

3.4. L-Karnitin (L-C) Dozunun Belirlenmesi

HAM F-10 ana medyumuna L-C etken maddesi eklenerek sperm hareketliliği incelenmiştir. 0,5, 1 ve 5mg/ml dozlarında etken madde eklenmiştir. (Tablo3.3, Şekil 3.3)

Tablo 3.3. L-C-0,5 mg/ml, L-C-1 mg/ml, L-C-5mg/ml medyumlarında sperm hızı yüzdesi. Çalışılan hasta sayısı: 43, Kontrol medyum: HAM-F10

	Genel Hız	+4 Hareketlilik	+3 Hareketlilik	+2 Hareketlilik	+1 Hareketlilik
Yıkama Öncesi Hareketlilik	51%	7%	30%	14%	49%
HAM-F-10 Hareketlilik	74%	18%	47%	9%	26%
L-C-0,5 mg/ml Hareketlilik	77%	28%	44%	5%	23%
L-C-1mg/ml Hareketlilik	72%	25%	37%	10%	28%
L-C-5mg/ml Hareketlilik	60%	10%	33%	17%	40%



Şekil 3.3. L-C-0,5 mg/ml, L-C-1mg/ml, L-C-5mg/ml test medyumlarında sperm hızlarının karşılaştırılması.

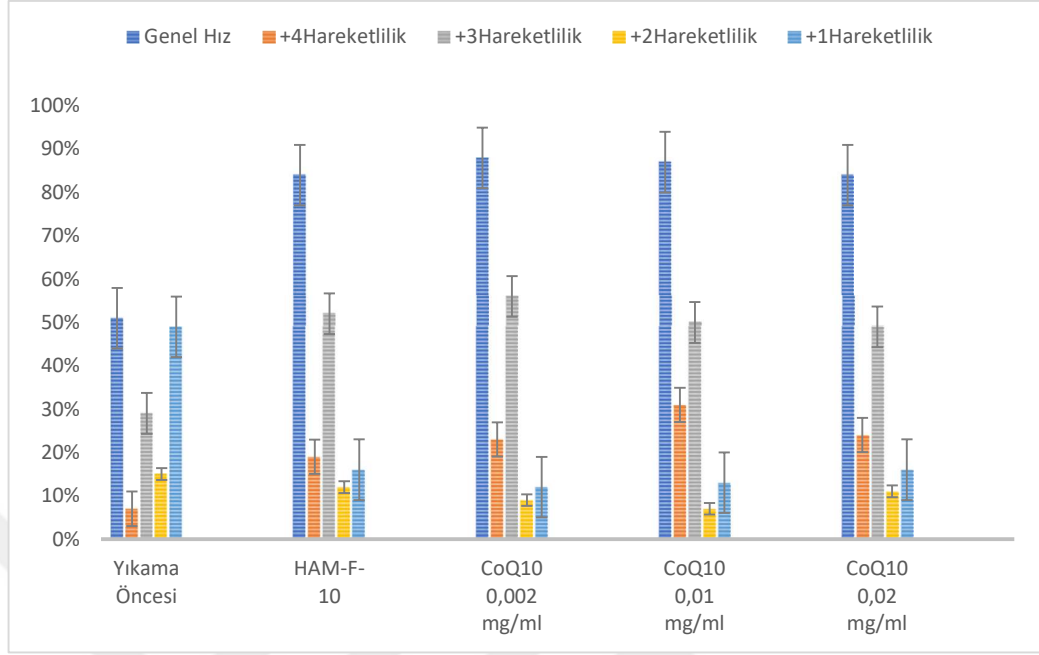
L-C; 0,5, 1 ve 5 mg/ml dozlar ile dendiğinde **L-Karnitin 0,5 mg/ml** değerlerinde sperm hızının daha iyi olduğu gözlemlendi.

3.5. Koenzim (CoQ10) Dozunun Belirlenmesi

HAM F-10 ana medyumuna CoQ10 etken maddesi eklenerek sperm hareketliliği incelenmiştir (0,02, 0,01 ve 0,02 mg/ml dozlarında). (Tablo3.4, Şekil 3.4)

Tablo 3.4. CoQ10 0,02 mg/ml, CoQ10 0,01 mg/ml, CoQ10 0,02 mg/ml medyumlarında sperm hızı yüzdesi. Çalışılan hasta sayısı: 23, Kontrol medyum: HAM-F-10, Yıkama Öncesi Test

	Genel Hız	+4Hareketlilik	+3Hareketlilik	+2Hareketlilik	+1Hareketlilik
Yıkama Öncesi Hareketlilik	51%	7%	29%	15%	49%
HAM-F-10 Hareketlilik	84%	19%	52%	12%	16%
CoQ10 0,002 mg/ml Hareketlilik	88%	23%	56%	9%	12%
CoQ10 0,01 mg/ml Hareketlilik	87%	31%	50%	7%	13%
CoQ10 0,02 mg/ml Hareketlilik	84%	24%	49%	11%	16%



Şekil 3.4. CoQ10-0,002 mg/ml, CoQ10-0,01 mg/ml, CoQ10-0,02 mg/ml test medyumlarında sperm hızlarının karşılaştırılması.

Koenzim Q10-0,002 mg/ml dozlar ile dendiğinde sperm hızının daha iyi olduğu gözlemlendi.

3.6. L-Karnitin, CoQ10 ve Serotonin Etken Maddeli Sperm Yıkama Medyumunun Değerlendirilmesi

Hazırlanmış olan L-C, CoQ10 ve 5-HT katkılı sperm prototip yıkama medyumu (5-HT/L-C/CoQ10) ile Origio® ve Irvine® sperm yıkama medyumlarının karşılaştırılması yapılmıştır (Tablo 4.10, Tablo 4.11 ve Tablo 4.12).

Hazırlanan farklı kombinasyonlar ile aynı hasta grubuna ait spermler yıkanarak, medyumların sperm hızına ve morfolojisine olan etkisi incelenip en etkin kombinasyon belirlenerek, kontrol grubu olarak hazır olarak satın alınan; Irvine®Sperm Washing (9983-100 ml) ve Origio® Sperm Washing (84055060, 5 x 60 ml) medyumları kullanılmıştır. Yıkanan sperm örneklerindeki sperm hareketlilik farklılığı değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışma kapsamında 98 hasta değerlendirilmiştir. Bir hastadan alınan semen örneği bazalde üçe bölünerek; L-C ve CoQ10 katkılı 5-HT HAM-200 içeren sperm yıkama medyumu, Origio® ve Irvine® olmak üzere 3 farklı grup yıkama medyumu ile yıkanarak değerlendirilmiştir. Örnekler, swim-up sperm yıkama yöntemi ile çalışılmıştır.

3.7. Sperm Hücre Sayım Yöntemi

Makler'e (Irvine Scientific 2511 Daimler ST. Santa Ana, CA, USA) (Şekil 3.5) 10 µL sperm örneği koyulduktan sonra ışık mikroskopunda ve (Şekil 3.6) X20 objektif büyütmede sperm konsantrasyon ve hareketliği ölçüldü. Hareketlilik, genel bilgilerde açıklandığı gibi, progresif, nonprogresif hareketli ve hareketsiz olmak üzere üç farklı şekilde gruplandırıldı. Makler kamerasında görülen tek karedeki ortalama sperm konsantrasyonu milyon/ml olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.5. Makler sayım kamerası. Mehmet Ali Aydınlar Acıbadem Atakent Hastanesi



Şekil 3.6. Işık mikroskobu. Mehmet Ali Aydınlar Acıbadem Atakent Hastanesi

Bir hastadan alınan semen örneği hücre sayım işlemi sonrası; Origio® (Group1), Irvine® (Group2), 5-HT/L-C/CoQ10 (Group3) olacak şekilde ayrılmıştır. Örnekler, swim-up sperm yıkama yöntemi ile yıkandıktan sonra her bir örnek için hücre sayım yöntemi belirlenmiştir. Spermeler, geliştirilen medyumda yıkandıktan (Swim-up yöntemi) sonra iyice karıştırılmış ve kontrol grubu olarak Origio® ve Irvine® markalarına ait medyumlarla yıkanan spermeler sayılmıştır. Kontrol ve deney grubunda bulunan spermelerin hareketlerine bakılmıştır (WHO, 2021).

3.8. Swim-up Yıkama Yöntemi

Bir hastanın semen örneği 3 eşit volüme ayrılarak, 3 farklı tüpe ayrıldı. Likefiye olmuş semen örnekleri üzerine 1'er mL, L-C ve CoQ10 katkılı 5-HT-HAM-200 prototip (5-HT/L-C/CoQ10), Origio® ve Irvine® sperm yıkama solüsyonları eklendikten ve falcon tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra santrifüj edildi ve 10 dk 500xg hızda santrifüj işlemi sonrası üst kısım atıldı. Her tüp için 0,5 ml 5-HT/L-C/CoQ10, Origio® ve Irvine® sperm yıkama medyumu eklenmiştir. Medyumlar eğik tutulan tüpe ve pellete değmeden konulmuştur. Sperm örneğinin bulunduğu konik mavi kapaklı tüpler 45 derece olacak şekilde spora yerleştirilir ve en az 30 dak. %6 CO₂ ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. Her tüpte konulan solüsyona göre 0,2-0,5 ml arası medyum, falcon pipet ile pellete değmeden alınmıştır. Hazırlanan sperm örnekleri sayı ve hareketlilik bakımından değerlendirilmiştir. Tablo 4.10, Tablo 4.11 ve Tabl' 4.12'de gösterildiği gibi.

3.9. Sperm Morfoloji Testi

Sperm yıkama işlemi sonrası alınan örneklerden birer damla lam-lamele damlatılarak kurumaya bırakıldıktan sonra Diff-Quick boyası ile boyanmıştır.

3.10. Hazırlanan Prototip ile Yıkanan Sperm Örneklerinin DNA Hasarı ve ROS Değerlerinin İncelenmesi

3.10.1. Sperm DNA Testi

L-C ve CoQ10 miktarı belirlenen sperm yıkama medyumu geliştirildikten sonra oluşturulan prototip yıkama medyumu ile yıkanan sperm örneklerinde DNA hasar testi için flow sitometri cihazı kullanılmıştır. Yaklaşık olarak 50000 hücre analiz edilmiştir ve hasarlı DNA içeren sperm hücrelerinin miktarı belirlenmiştir. Testin spesifitesi %91,6 olarak bildirilmiştir. Test, sperm DNA fragmantasyonu'nu DNA'nın dUTP ucunu işaretleyerek flow sitometrik olarak ölçmüştür. DNA bağlayan boya eklenmiş elektroforetik gradiente maruz bırakılıp görüntülenmiştir. TUNEL boyama ile DNA hasarı tespiti Sperm hücrelerindeki DNA hasarı oranlarını belirlemek amacıyla In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) ile TUNEL boyama yapılmıştır.

Sperm hücreleri PBS ile dilüsyon yapılarak 5 milyon/ml konsantrasyonda 300xg 10 dk santrifüj edildi.

Üst kısım atıldıktan sonra spermlerin fiksasyonunu için 100 µl %4'lük PFA ilave edilir. 60 dk oda sıcaklığı ve karanlık ortamda bekletildi.

Yaklaşık 60 dk sonra 500 µl PBS eklendi. 300xg 10 dk santrifüj edilir süpernatant alındıktan sonra 100 µl %0,1 Triton X-100 ve %0,1 Sodyum Sitrat eklendi. 5 dk buz üzerine konuldu.

Tekrar PBS ile 300 xg hızda 10 dk santrifüj edildi ve üst kısım atıldı.

Negatif kontrol için 50 µl etiket (label) solüsyonu ve TUNEL için 50 µl enzim solüsyonu ve 450 µl etiket (label) solüsyonu eklenmiştir. 37 °C'de 1 saat inkübasyonun sonrası 500 µl PBS ile yıkandı. 300 xg 10 dk Santrifüj edildi. Üst kısım atıldı.

Eppendorf tüpüne aktarıldıktan sonra flow cihazından geçirilmiş ve FL1 panelinde (525/40 nanometre (nm)) aralığında 10000 hücrede floresan ışına olanlar değerlendirilmiştir (Sharma v. d., 2019).

3.10.2. Semende Apoptoz Tayini (Annexin V)

Apoptoz değerlendirilmesi için Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Biolegend) kullanılmıştır. 2 milyon/mL 500 µl sperm örneğine 500 µl binding buffer eklendi. Tüplere 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI (propidyum iyodür) eklenerek karanlıkta oda da 5 dk bekletildi. 500 µL PBS ilave edilerek 300xg 10 dk santrifüj edildi. Pellet üzerine 300 µl PBS eklendi. Eppendorf tüpe alınan sperm örnekleri flow sitometri cihazına yerleştirildi. Toplam 30000 hücrede floresan ışına değerlendirmesi yapıldı. Annexin V-FITC; FL1 paneli ve PI; FL2 paneli kullanıldı. Apoptoz bulguları, canlı, erken ve geç apoptoz, nekroz, ölü olarak değerlendirildi.

3.10.3. Semende Akış Sitometrik ROS Analizi

Bu yöntem, hücre içindeki hidroksil, peroksil ve diğer ROS aktivitesini ölçmek için florojenik bir boya kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrik yöntemle yapıldı. Klinik validasyon çalışmalarında Flow Sitometrik ROS ölçümü fertilitenin bilinen faktörler38örotrkorele olarak bulunmuştur. ROS pozitif referans değeri %17,8 olarak alınmıştır. Sperm hücreleri 20,70-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) hücre içi H₂O₂'yi algılar ve dihidroetidyum (DHE) hücre içi O₂'yi algılar. ROS ölçümü spermatozoadaki hücre içi H₂O₂ seviyesini ölçmek için floresan boya 2',7'-diklorofloresin diasetat (H₂DCF-DA (H₂-DCF, DCF) Kat No. D399, Invitrogen) flow sitometri yöntemi kullanıldı.

Sperm örnekleri test ve negatif kontrol gruplarına ayrıldı ve her biri doğrudan flow sitometri analizine yerleştirildi (kontrol grubu: 25×10^5 ml/spermatozoa); kontrol grubuna herhangi bir boya eklenmedi). DCFDA, test gruplarında sperm solüsyonuna (25×10^5 spermatozoa/ml) 10 uM nihai konsantrasyonda eklendi.

Kombinasyon 25°C 'de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi ve işaretli spermatozoayı incelemek için flow sitometrisi kullanıldı. Sperm hücrelerindeki ROS seviyeleri, tedavi edilmemiş grubun aksine floresan yoğunluğunun yüzdesi olarak belirlendi.

Yaklaşık 20 hasta değerlendirildi. Kontrol grubu Irvine® ve Origio® için 20'şer, prototip medyum için 20 hasta değerlendirilmiştir.

Bu iş paketinde amaç, ROS'un sebep olduğu DNA hasarını minimum seviyeye indirmek için medyuma eklenmesi düşünülen ve çalışmalarına başlanmış olunan L-C ve CoQ10 miktarlarını belirlemektir (Majzoub v. d., 2009).

3.11. İstatistiksel Analiz

Bulunan değişkenler arasındaki istatistiksel farklılıkları değerlendirmek için varyans analizi ANOVA kullanılarak analiz yapılmış ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. SAS istatistiksel yazılım paketi kullanılarak ortamın sperm hareketliliği üzerindeki etkisini değerlendirmek için tekrarlanan ölçümler varyans analizleri kullanılmıştır. Kontrol grubu için farklılıklar $p < 0.05$ 'te önemli olarak kabul edildi ve tüm değerler ortalama \pm SD olarak rapor edildi. Semen numuneleri, numunelerin havuzda toplanmasından kaynaklanan herhangi bir olası etkileşimi önlemek için ayrı ayrı çalışılmıştır.

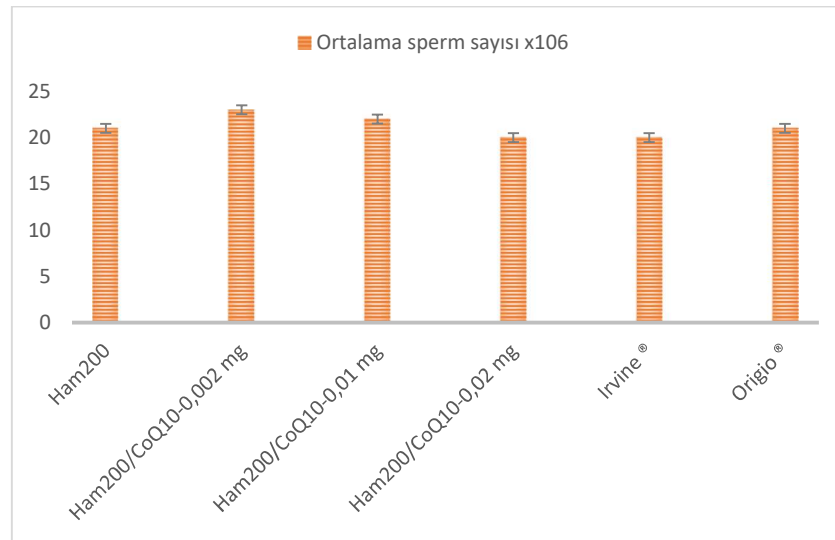
4. BULGULAR

4.1. CoQ10 Doz Belirlenmesi

1507 proje kapsamında; 1512 projesinde geliştirilen 5-HT katkılı sperm yıkama medyumuna (HAM-200), CoQ10 etken maddesi eklenmiştir. 23 hasta için sperm yıkama işlemi (swim-up) uygulanmıştır. Doz belirlenmesi; yıkama işlemi sonrası sayı, genel hareketlilik ve progresif hareketliliğe bakılarak uygulanmıştır (0,002 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml.) (Tablo 4.1, Tablo 4,2 ve Şekil 4.1 Şekil 4,2).

Tablo 4.1.'CoQ10'un doz ayarlaması, 0,02 mg/ml, 0,01 mg/ml ve 0,02' mg/ml'ye kadar değişebilir. Sperm yıkama sonrası genel hareketlik ve sperm sayısı. SS (standart sapma \pm).

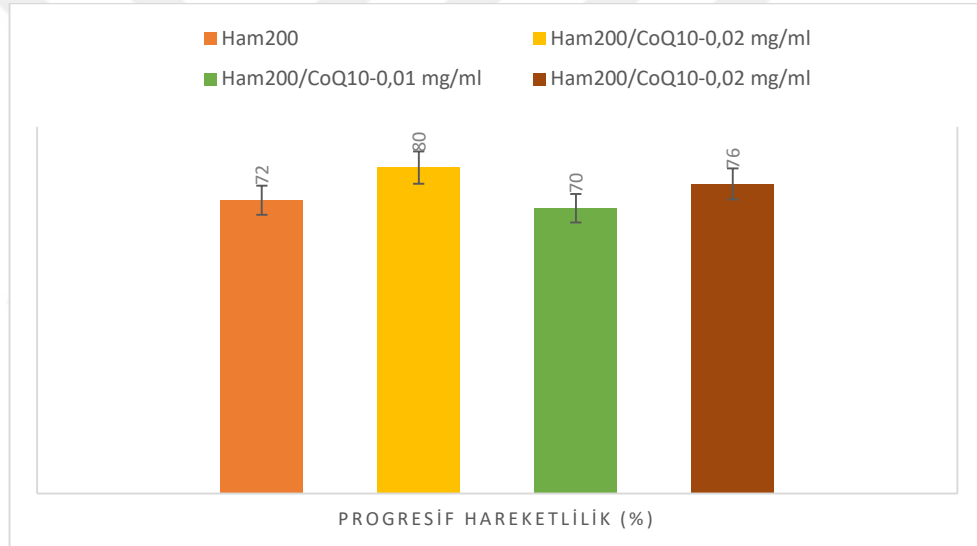
Sperm Yıkama İşlemi Sonrası	Ortalama Sperm Hareketlilik (%)	Ortalama Sperm Sayısı x10 ⁶
Ham200	84 \pm 10,9	21 \pm 26,3
Ham200/CoQ10-0,002 mg	88 \pm 15	23 \pm 14
Ham200/CoQ10-0,01 mg	87 \pm 12	22 \pm 17
Ham200/CoQ10-0,02 mg	84 \pm 17	20 \pm 17
Irvine ®	80 \pm 10,5	20 \pm 16,5
Origio ®	83 \pm 16	21 \pm 26,2



Şekil 4. CoQ10 (0,002 mg, 0,01 mg, 0,02 mg). Sperm yıkama işlemi sonrası sperm sayısı.

Tablo 4.2.'CoQ10'un doz ayarlaması, 0,02 mg/ml, 0,01 mg/ml ve 0,02' mg/ml'ye kadar değişebilir. Sperm yıkama sonrası progresif hareketlilik. SS(standart sapma ±)

Sperm Örneği Yıkama Sonrası	Progresif Hareketlilik (%)
Ham200	72±9,5
Ham200/CoQ10-0,02 mg/ml	80±10
Ham200/CoQ10-0,01 mg/ml	70±8,5
Ham200/CoQ10-0,02 mg/ml	76±73



Şekil 4.2. CoQ10 Doz Ayarlanması (0,002 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml). Sperm yıkama sonrası progresif hareketlilik.

En uygun doz **0,002mg/ml CoQ10** olarak belirlenmiştir.

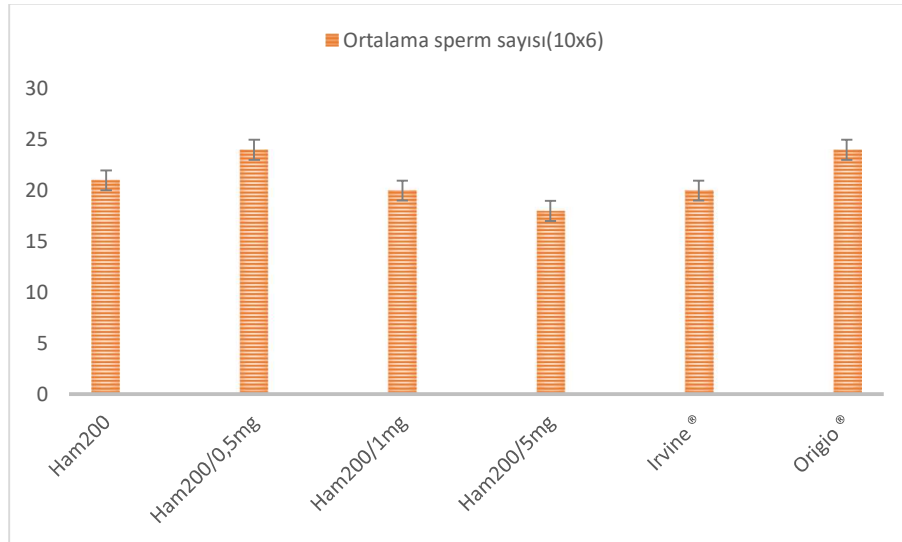
4.2. L-Karnitin (L-C) Doz Belirlenmesi

1507 proje kapsamında; 1512 projesinde geliştirilen 5-HT katkılı sperm yıkama medyumuna (HAM-200), L-C etken maddesi eklenmiştir. 43 hasta örneği ile sperm yıkama işlemi (swim-up) uygulanmıştır. Doz belirlenmesi; yıkama işlemi sonrası sayı, genel hareketlilik ve progresif hareketlilik bakılarak uygulanmıştır. (Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Şekil 4.3, Şekil 4.4).

Tablo 4.3 L-C'nin 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 5 mg/ml'lik doz ayarlamaları vardır.

Sperm yıkama işlemi sonrası genel hareketlilik ve sperm sayısı.

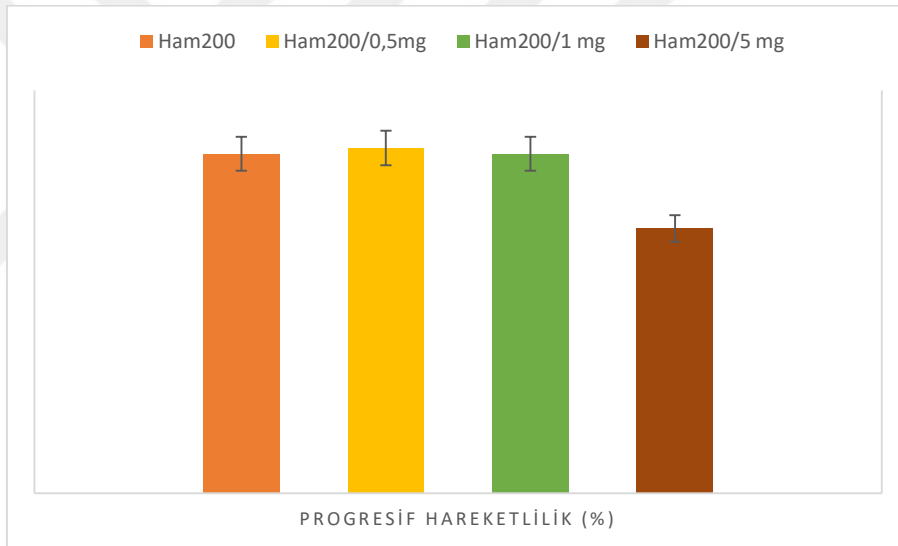
Sperm Yıkama İşlemi Sonrası	Ortalama Sperm Hareketlilik (%)	Ortalama Sperm Sayısı(10x6)
Ham200	74±17	21±25
Ham200/0,5 mg/ml	77±18	24±25
Ham200/1 mg/ml	72±20	20±25
Ham200/5 mg/ml	60±21	18±23
Irvine ®	65±20	20±24
Origio ®	70±19	24±23



Şekil 13 L-C doz ayarlamaları (0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 5 mg/ml) yıkama sonrası ortalama sperm miktarı

Tablo 4.4. L-C Doz Kontrolü 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 5 mg/ml'ye kadar.Sperm yıkama sonrası progresif hareketlilik.

Sperm Yıkama İşlemi Sonrası	Progresif Hareketlilik (%)
Ham200	59±8,5
Ham200/0,5mg	60±12
Ham200/1 mg	59±10
Ham200/5 mg	46±11



Şekil 4.4. L-C Doz Ayarlanması (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml). Sperm yıkama sonrası progresif hareketlilik.

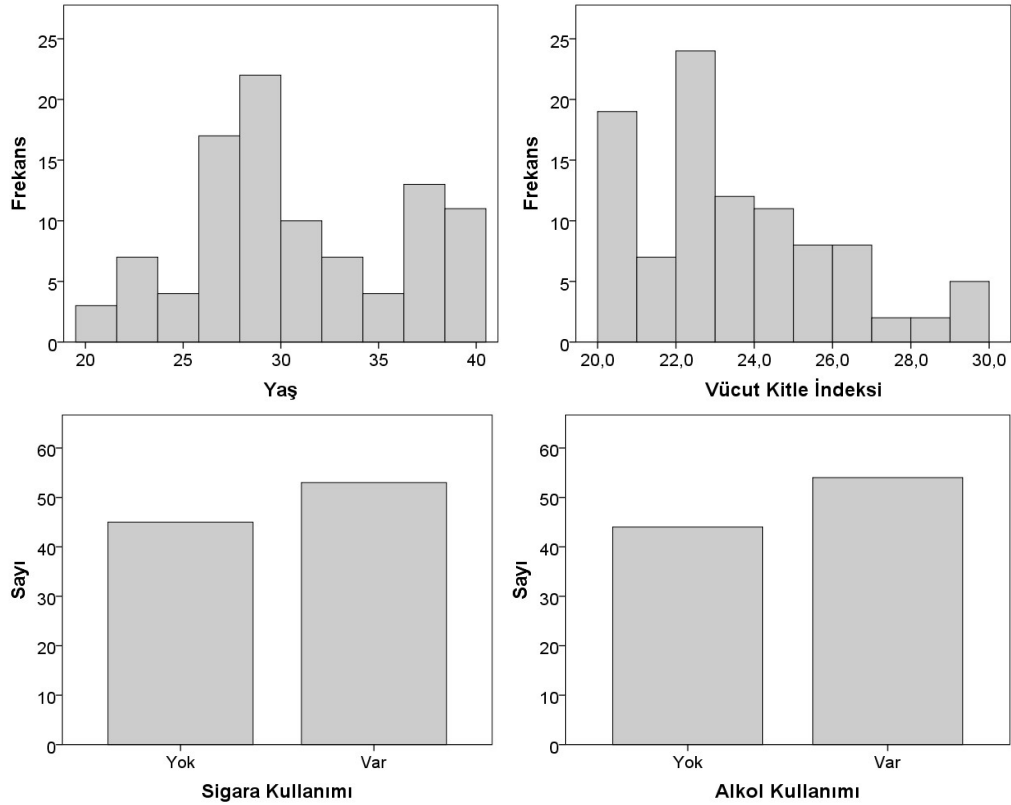
En uygun doz *L-C/0,5mg/ml* olarak belirlenmiştir.

4.3. 5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama Medyumunun Diğer Ticari Medyumlarla Karşılaştırılması

5-HT/L-C/CoQ10 prototip doz belirlenmesi için 98 hasta örneği ile sperm yıkama işlemi (swim-up) uygulanmıştır. Ortalama yaş 30,9 (SS 5,5, min-maks: 20-40), ve ortalama VKİ 23,4 (SS2,4, min-maks:20,0-29,4) olarak bulundu. Olguların 53'ü (%54,1) sigara kullanırken 54'ü (%55,1) alkol kullandığını belirtti (Tablo 4.5, Şekil 4.5)

Tablo 4.5. Sperm örnekleri alınan hastaların genel özellikleri

		Ortalama (SS, min-maks) / Sayı (Yüzde)
Yaş		30,9 (5,5, 20-40)
VKİ		23,4 (2,4, 20,0-29,4)
Sigara Kullanımı	Var	53 (%54,1)
	Yok	45 (%45,9)
Alkol Kullanımı	Var	54 (%55,1)
	Yok	44 (%44,9)



Şekil 4.5. Sperm örnekleri alınan hastaların genel özelliklerinin dağılımı

Tablo 4.6. Yıkama öncesi örneklerde genel hız, sperm sayısı ve yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri

	Ortalama	SS (min-maks)
Genel Hız	40,9	14,9 (10-70)
Sperm Sayısı (Milyon)	35,6	2,7 (1-120)
Progresif Hareketlilik	27,3	13,6 (5-63)
Yıkama Sonrası +1	59,0	14,8 (30-90)
Yıkama Sonrası +2	13,7	8,1 (1-43)
Yıkama Sonrası +3	22,0	12,4 (4-54)
Yıkama Sonrası +4	5,3	4,9 (1-20)

Yıkama öncesi örneklemede genel hız, sperm sayısı, progresif hareketlilik, yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri incelendiğinde ortalama genel hız 40,9 (SS 14,9, min-maks:10-70), sperm sayısı ortalama 35,6 milyon (SS 2,7 milyon, min-maks:1-120 milyon), ortalama progresif hareketlilik 27,3 (SS 13,6, min-maks:5-63), ortalama yıkama sonrası +1; 59,0 (SS 14,8, min-maks:30-90), ortalama yıkama sonrası +2; 13,7 (SS 8,1, min-maks:1-43), ortalama yıkama sonrası +3 ;22,0 (SS 12,4, min-maks 4-54) ve ortalama yıkama sonrası +4 ;5,3 (SS 4,9, SS 1-20) olarak bulundu.

Tablo 4.7. Irvine ® kullanılan örneklemede genel hız, sperm sayısı ve yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri

	Ortalama	SS (min-maks)
Genel Hız (%)	67,7	23,2 (5-97)
Sperm Sayısı (Milyon/ml)	10,4	9,7 (0,2-50)
Progresif Hareketlilik (%)	59,5	23,6 (3-96)
Yıkama Sonrası +1 (%)	13,1	22,2 (3-95)
Yıkama Sonrası +2 (%)	8,4	8,7 (1-60)
Yıkama Sonrası +3 (%)	36,9	19,3 (2-75)
Yıkama Sonrası +4 (%)	22,3	18,3 (0-80)

Irvine ® kullanılan örneklemede ortalama genel hız 67,7 (SS 23,2, min-maks:5-97), sperm sayısı ortalama 10,4 milyon (SS 9,7 milyon, min-maks:0,2-50 milyon), ortalama progresif hareketlilik 59,5 (SS 23,6, min-maks:3-96), ortalama yıkama sonrası +1; 31,1 (SS 22,2, min-maks:3-95), ortalama yıkama sonrası +2; 8,4 (SS 8,7, min-maks:1-60), ortalama yıkama sonrası +3; 36,9 (SS 19,3, min-maks 2-75) ve ortalama yıkama sonrası +4; 22,6 (SS 18,3, SS 0-80) olarak bulundu.

Tablo 4.8. Origio® kullanılan örneklemede genel hız, sperm sayısı ve yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri

	Ortalama	SS (min-maks)
Genel Hız (%)	71,4	22,0 (9-99)
Sperm Sayısı (Milyon/ml)	10,7	10 (0,2-50)
Progresif Hareketlilik (%)	64,7	23,7 (2-93)
Yıkama Sonrası +1 (%)	28,8	21,9 (1-91)
Yıkama Sonrası +2 (%)	6,2	8,4 (0-70)
Yıkama Sonrası +3 (%)	40,4	19,7 (1-80)
Yıkama Sonrası +4 (%)	24,3	19,0 (0-80)

Origio® kullanılan örneklemede ortalama genel hız 71,4 (SS 22,0, min-maks:9-99), sperm sayısı ortalama 10,7 milyon (SS 10,0 milyon, min-maks:0,2-50 milyon), ortalama progresif hareketlilik 64,7 (SS 23,7, min-maks:2-93), ortalama yıkama sonrası +1 ;28,8 (SS 21,9, min-maks:1-91), ortalama yıkama sonrası +2; 6,2 (SS 8,4, min-maks:0-70), ortalama yıkama sonrası +3; 40,4 (SS 19,7, min-maks 1-80) ve ortalama yıkama sonrası +4 ;24,3 (SS 19,0, SS 0-80) olarak bulundu.

Tablo 4.9. 5-HT/L-C/CoQ10 kullanılan örneklemede genel hız sperm sayısı, yıkama sonrası +1, +2, +3 ve +4 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri

	Ortalama	SS (min-maks)
Genel Hız (%)	74,6	20,8 (10-98)
Sperm Sayısı (Milyon/ml)	13,9	12,2 (0,2-55)
Progresif Hareketlilik (%)	66,3	24,4 (2-98)
Yıkama Sonrası +1 (%)	24,5	20,7 (2-90)
Yıkama Sonrası +2 (%)	8,4	10,0 (0-50)
Yıkama Sonrası +3 (%)	40,0	21,4 (1-84)
Yıkama Sonrası +4 (%)	26,8	20,3 (0-85)

5-HT/L-C/CoQ10 kullanılan örneklemede ortalama genel hız 74,6 (SS 20,8, min-maks:10-98), sperm sayısı ortalama 13,9 milyon (SS 12,2 milyon, min-maks: 0,2-55 milyon), ortalama progresif hareketlilik 66,3 (SS 24,4, min-maks:2-98), ortalama yıkama sonrası +1; 24,5 (SS 20,7, min-maks:2-90), ortalama yıkama sonrası +2; 8,4 (SS 10,0, min-maks:0-50), ortalama yıkama sonrası +3; 40,0 (SS 21,4, min-maks 1-84) ve ortalama yıkama sonrası +4; 26,8 (SS 20,3, SS 0-85) olarak bulundu.

4.4. Gruplar Arası Hareketliliğin İstatistiksel Karşılaştırılması

3 farklı yıkama solüsyonu genel hız değişkeni üzerinde yıkama öncesi ve sonrası değerlerine etkisi tekrarlayan ANOVA testi ile değerlendirildi. Mauchy testi ile küresellik varsayımı ihlal edilmediği için küresellik varsayımı ile devam edildiğinde yıkama öncesi ve sonrası değerler arasında anlamlı bir fark bulunmuşken yıkama türleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($F(1,388)=1,968$, $F(3,388)=0,763$, $p=0,515$). Post-hoc testlerinden Tukey HSD ile gruplar arasında yıkama sonrası genel hız değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.10. Sperm Yıkama öncesi ve 3 solüsyon ile yıkama sonrası *genel hız* değerleri. SS:standart sapma(\pm)

	Ortalama (%)	SS (min-maks)
Yıkama Öncesi Hareketlilik	40,9	14,9
Irvine ® Yıkama Sonrası Hareketlilik	67,7	23,2
Origio ® Yıkama Sonrası Hareketlilik	71,4	22,0
5-HT/L-C/CoQ10 Yıkama Sonrası Hareketlilik	74,6	20,8

3 farklı yıkama solüsyonu *sperm sayısı* değişkeni üzerinde yıkama öncesi ve sonrası değerleri üzerine etkisi tekrarlayan ANOVA testi ile değerlendirildi. Mauchy testi ile küresellik varsayımı ihlal edilmediği için küresellik varsayımı ile devam edildiğinde yıkama öncesi ve sonrası değerler arasında anlamlı bir fark bulunmuşken yıkama türleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($F(1,388)=406,4$, $F(3,388)=0,545$, $p=0,652$). Post-hoc testlerinden Tukey HSD ile gruplar arasında yıkama sonrası sperm sayısı değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.11. Sperm Yıkama öncesi ve 3 solüsyon ile yıkama sonrası *sperm sayısı* değerleri. SS:standart sapma(\pm)

	Ortalama (milyon/ml)	SS
Yıkama Öncesi	36,6	2,7
Irvine ® Yıkama Sonrası	10,3	9,8
Origio ® Yıkama Sonrası	10,7	1,0
5-HT/L-C/CoQ10 Yıkama Sonrası	13,9	1,2

3 farklı yıkama solüsyonu *progresif hareketlilik* değişkeni üzerinde yıkama öncesi ve sonrası değerlerine etkisi tekrarlayan ANOVA testi ile değerlendirildi. Mauchy testi ile küresellik varsayımı ihlal edilmediği için küresellik varsayımı ile devam edildiğinde yıkama öncesi ve sonrası değerler arasında anlamlı bir fark bulunmuşken yıkama türleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($F(1,388)=994,7$, $F(3,388)=1,791$, $p=1,791$). Post-hoc testlerinden Tukey HSD ile gruplar arasında yıkama sonrası sperm sayısı değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.12. Sperm Yıkama öncesi ve 3 solüsyon ile yıkama sonrası *progresif hareketlilik* değerleri. SS:standart sapma(\pm)

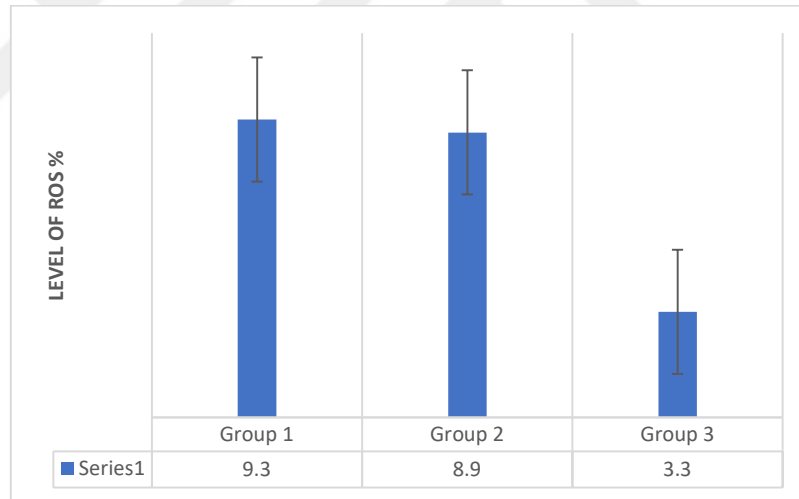
	Ortalama (%)	SS
Yıkama Öncesi (+4 ve +3) Hareketlilik	27,3	13,6
Irvine ® (+4 ve +3) Yıkama Sonrası Hareketlilik	59,5	23,6
Origio ® (+4 ve +3) Yıkama Sonrası Hareketlilik	64,7	23,7
5-HT/L-C/CoQ10 (+4 ve +3) Yıkama Sonrası Hareketlilik	66,3	24,3

4.5. 5-HT/L-C/CoQ10 Sperm Yıkama Medyumu ROS Analizi

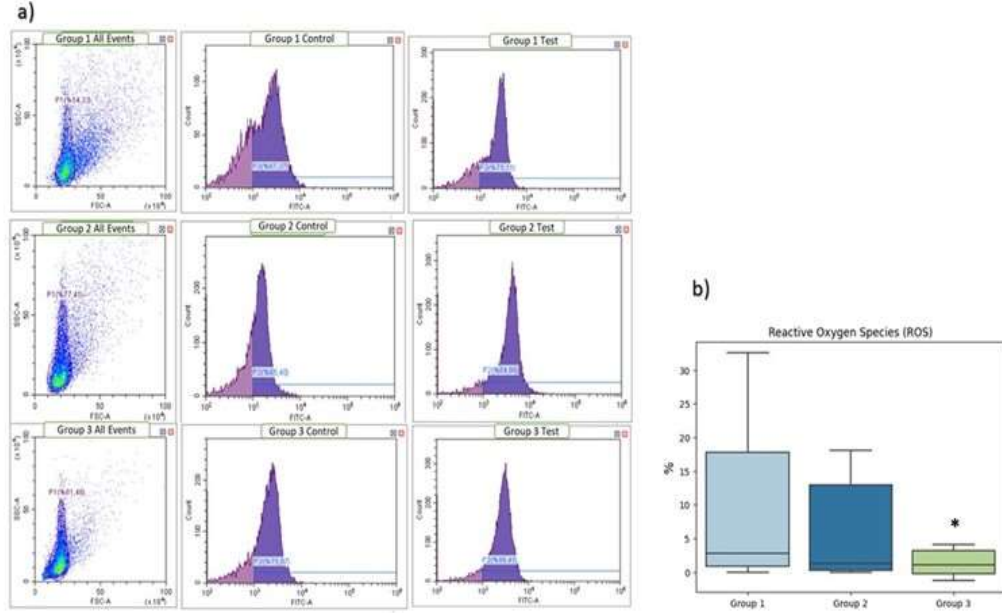
Invitrogen markasına ait H2DCFDA (H2-DCF, DCF) D-399 numaralı ROS kiti kullanılmıştır. Kit flourosent boya içerdiğinden FITC değerlerinin toplamına bakılır. 22 hasta çalışılmıştır. Şekil 4.7’de bir hastanın üç medyumuyla yıkanmış spermilerin ROS değeri flow sitometri cihazında görülmektedir.

Origio ® ile yıkanan spermelerde ROS değeri $9,33\% \pm 0,3$, Irvine ® ile yıkanan spermelerde $8,98\% \pm 0,29$, 5-HT/L-C/CoQ10 ile yıkanan spermelerde $3,39\% \pm 0,27$ bulundu.

Origio ® ve Irvine ® ile karşılaştırıldığında, yıkama sonrası sperm örneklerinin ROS değerinin ortalaması $9,1\% \pm 0,3$ iken 5-HT/L-C/CoQ10 ile yıkanan spermelerde ROS değerlerinin yüzdesi $3,39\% \pm 0,27$ olarak daha düşüktü (*p < 0,05).



Şekil 4.6. 5-HT/L-C/CoQ10 prototip sperm yıkama medyumu ROS analizi. Origio ®, Group2: Irvine ®, Group3: 5-HT/L-C/CoQ10 Gruplar arasında ROS değerlerinin karşılaştırılması.

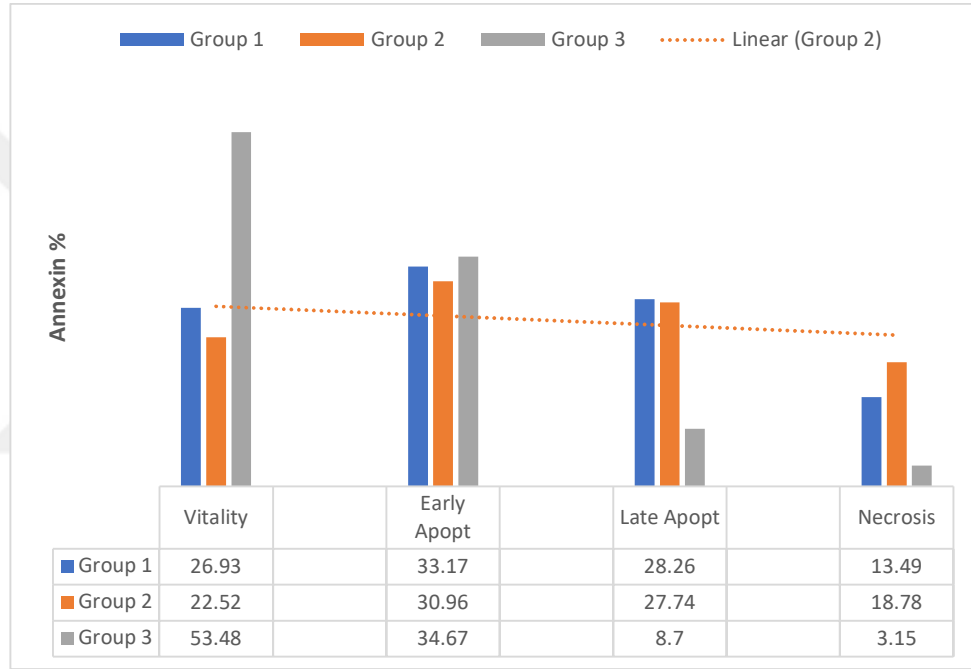


Şekil 4.7. a) Flow sitometri cihazından uygun popülasyon seçilerek alınan temsili bir bir numunenin ROS deneyi. Group1: Origio®, Group2: Irvine®, Group3: b) 5-HT/L-C/CoQ10 Gruplar arasında ROS değerlerinin dot-plot grafiği ile karşılaştırılması. Ortalama \pm SD. * $p < 0,05$

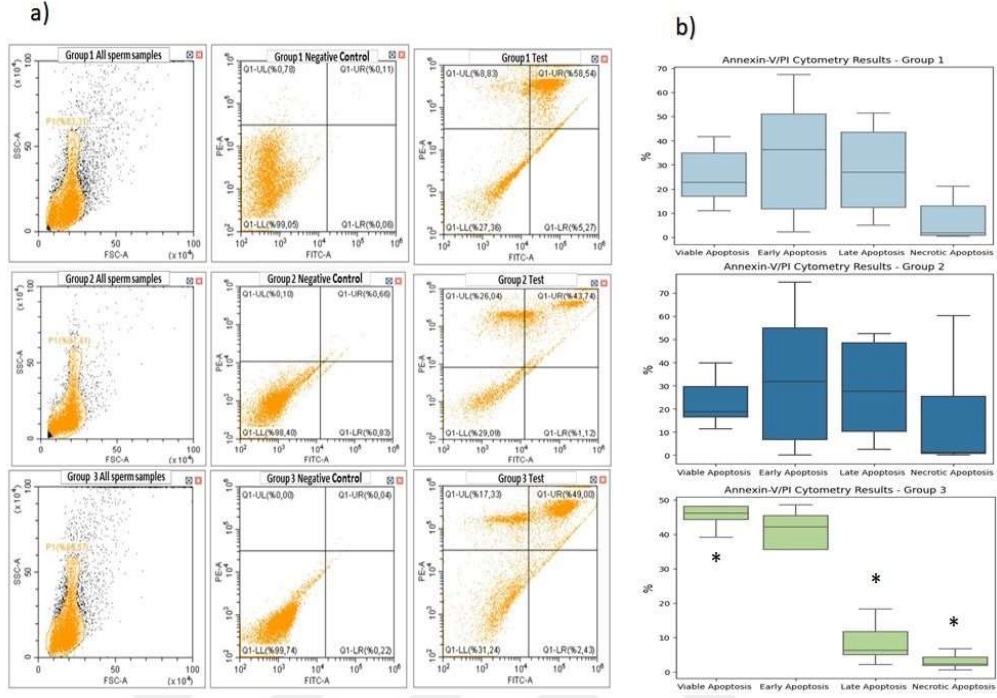
4.6. 5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama Medyumu Apoptoz Analizi

Biologend markasına ait FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI kiti kullanılmıştır. 5-HT/L-C/CoQ10 kombinasyonunun, Origio® ve Irvine® medyumu ile yıkanan spermelerin canlılık, nekrotik, erken ve geç apoptoza giden sperm sayıları değerlendirilmiştir. Toplam 15 hasta değerlendirilmiştir. Kombinasyon ile yıkanan spermelerde canlılık oranı $53,48\% \pm 0,2$ iken Irvine® ile yıkanan spermelerde canlılık oranı $22,52\% \pm 0,09$, Origio® ile yıkanan spermelerde ise canlılık oranı $26,93\% \pm 1,4$ olarak belirlenmiştir. Kombinasyon ile yıkanan spermelerde erken apoptoz oranı $34,67\% \pm 0,19$ iken Irvine® ile yıkanan spermelerde erken apoptoz oranı $30,96\% \pm 0,26$, Origio® ile yıkanan spermelerde ise erken apoptoz oranı $33,17\% \pm 2,1$ olarak belirlenmiştir. Kombinasyon ile yıkanan spermelerde geç apoptoz oranı $8,7\% \pm 0,06$ iken Irvine® ile yıkanan spermelerde geç apoptoz oranı $27,74\% \pm 0,2$, Origio® ile yıkanan spermelerde ise geç apoptoz oranı $28,26\% \pm 1,5$ olarak belirlenmiştir. Kombinasyon ile yıkanan spermelerde nekroz oranı $3,15\% \pm 0,02$ iken Irvine® ile yıkanan spermelerde nekroz oranı $18,78\% \pm 0,3$, Origio® ile yıkanan spermelerde ise

nekroz oranı $13.49 \pm 2,1$ olarak belirlenmiştir. Üç farklı yıkama sonrası sperm örneğiyle karşılaştırıldığında, canlılık (%53,48), apoptotik olmayan, sperm yüzdesi kombinasyonda anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0,01$) ve erken apoptoz yüzdeleri anlamlı derecede yüksekti. Apoptoz (%8,7) boyalı geç apoptotik sperm kombinasyon medyumda anlamlı düzeyde daha düşüktü ($p < 0,01$). Kombinasyon ile karşılaştırıldığında Origio® ve Irvine®'de nekrotik spermin ortalama yüzdelerinde (%3,15) anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,01$). (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8. 5-HT/L-C/CoQ10 prototip sperm yıkama medyumunu apoptoz analizi
Group1: Origio®, Group2: Irvine®, Group3: 5-HT/L-C/CoQ10.

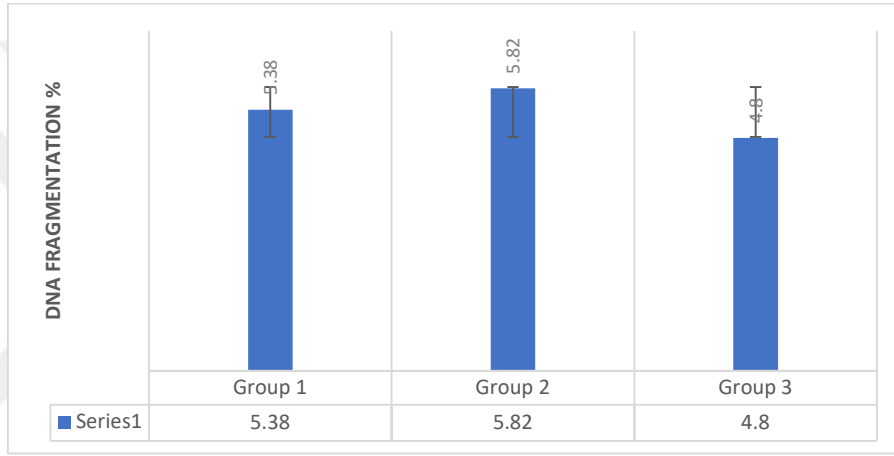


Şekil 4.9. a) Anneksin V-FITC veya propidyum iyodür (PI) ile boyandıktan sonra akış sitometrisi kullanılarak temsili bir örnek olarak bir numunenin anneksin deneyi.

Group1: Origio ®, Group2: Irvine ®, Group3: 5-HT/L-C/CoQ10. b) 5-HT/L-C/CoQ10 Gruplar arasında Anneksin değerlerinin dot-plot grafiği ile karşılaştırılması. *p <0,05

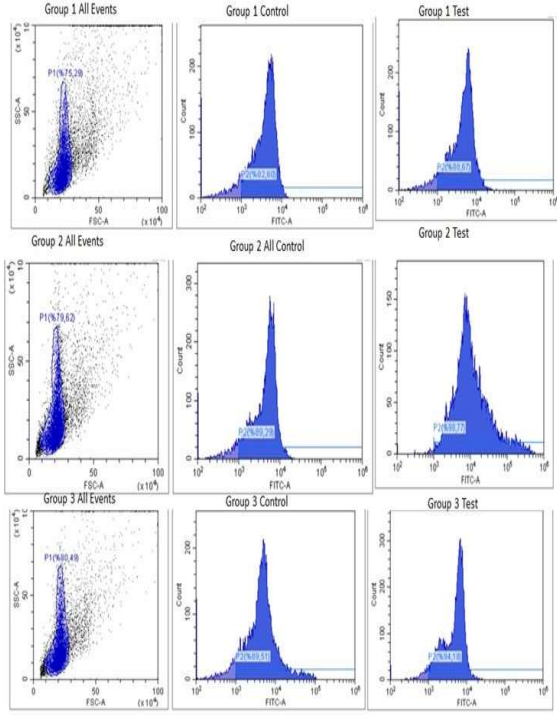
4.7. 5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama Medyumu DNA Fragmantasyon Analizi

L-C ve CoQ10 miktarı belirlenen sperm yıkama medyumu geliştirildikten sonra oluşturulan prototip yıkama medyumu ile yıkanan sperm örneklerinde DNA hasar testi için Flow Sitometri cihazı kullanılmıştır. In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) ile TUNEL boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. DNA hasarı Origio® 5,3% ± 0,14 Irvine® 5,82%±0,09 ve 5-HT/L-C/CoQ10 kombinasyon 4,8% ±0,12olarak gözlenmiştir ($p>0,05$). (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11)

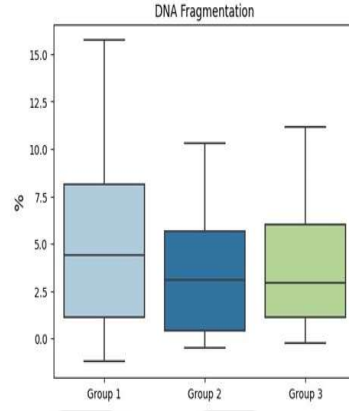


Şekil 4.10. 5-HT/L-C/CoQ10 prototip sperm yıkama medyumu DNA fragmantasyon analizi (%) Group1: Origio®, Group2: Irvine®,Group3: 5-HT/L-C/CoQ10

a)



b)

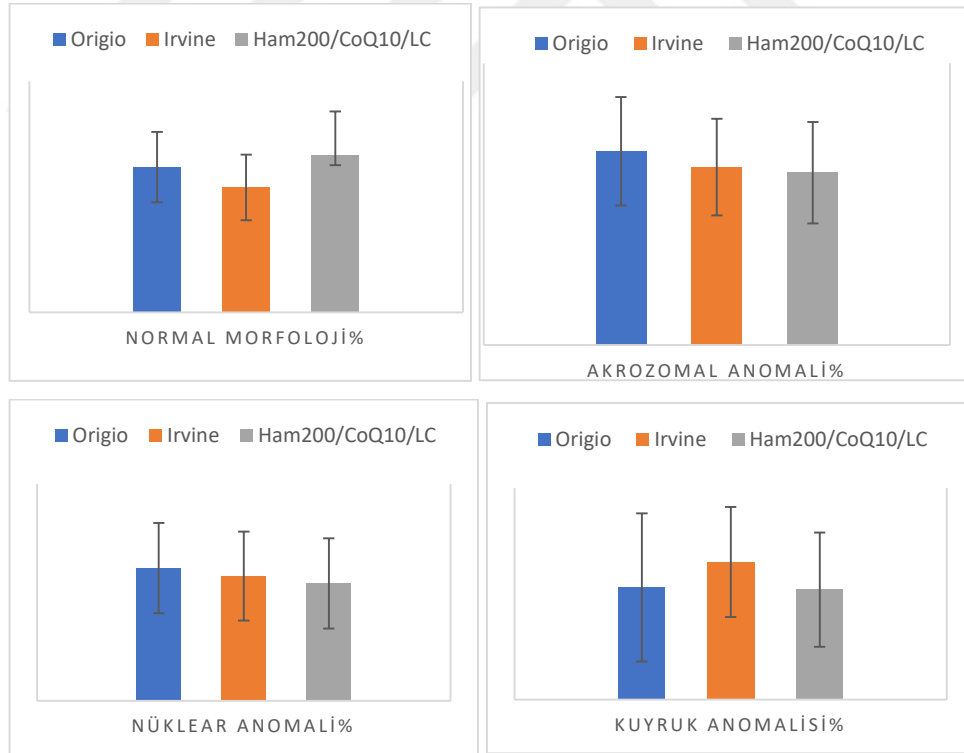


Şekil 4.11. a) Temsili bir örnek olarak bir numunenin DNA fragmentasyon analizi.

Group1: Origio®, Group2: Irvine®, Group3: 5-HT/L-C/CoQ10. b) 5-HT/L-C/CoQ10 Gruplar arasında DNA fragmentasyon değerlerinin dot-plot grafiği ile karşılaştırılması

4.8. 5-HT/L-C/CoQ10 Prototip Sperm Yıkama İşlemi Sonrası Morfolojik Değerlendirme

Sperm morfoloji testleri için 5-HT/L-C/CoQ10 kombinasyonu ve piyasada en sık kullanılan Origio® ve Irvine® medyumları kullanılmıştır. Normal morfolojiye sahip spermler tedavi için kullanılan spermelerdir. Kombinasyon ile yıkanan spermelerin normal morfolojisi $16,93 \pm 4,8$ iken, Origio® markası ile yıkanan spermelerin normal morfoloji ortalaması yüzdeleri $15,72 \pm 3,81$, Irvine® ile yıkanan spermelerin normal morfolojileri $13,5 \pm 3,55$ 'ti. Üç grupta yıkanan spermelerin akrozomal, nüklear (çekirdek) ve kuyruk anomalileri ayrı ayrı incelenmiştir Akrozomal anomali yüzdeleri; Origio® ($17,2 \pm 4,8$), Irvine® ($15,8 \pm 4,28$), 5-HT/L-C/CoQ10 ($15,3 \pm 4,6$). Nüklear anomali yüzdeleri; Origio® ($15,3 \pm 5,2$), Irvine® ($14,4 \pm 5,13$), 5-HT/L-C/CoQ10 ($13,56 \pm 3,6$). Kuyruk anomalisi yüzdeleri; Origio® ($5,3 \pm 3,5$), Irvine® ($6,5 \pm 2,61$), 5-HT/L-C/CoQ10 ($5,2 \pm 3,6$). (Şekil 4.12)



Şekil 4.12. 5-HT/L-C/CoQ10 prototip sperm yıkama işlemi sonrası morfolojik değerlendirme

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kısırlık, dünyadaki çiftlerin %15'ini etkileyen bir halk sağlığı sorunudur ve vakaların %50'si erkek faktörlerinden kaynaklanmaktadır (WHO, 2010). Semen analizi; sperm konsantrasyonu, hareketliliği ve morfolojisini değerlendirmek ve ayrıntılı incelemek için yapılan erkek kısırlığı araştırmalarının temel taşıdır ancak işlevsel potansiyellerini kesin olarak belirlemez (Chemes, 2003). Erkek faktörüne bağlı kısırlık; 1 ila 4 hafta arayla alınan iki semen analizinde düşük semen miktarı, hareketlilik ve anormal morfoloji ile tanımlanır (Patel v. d., 2017).

Sperm yıkama ortamı, sperm kapasitasyona uğraması için seminal sıvıyı ve artıkları uzaklaştırmak amacıyla yardımcı üreme teknolojilerinde (ART) (örn. intrauterin tohumlama ve in vitro fertilizasyon) kullanılan özel bir çözümdür (Lewis, 2007). Ayrıca yüksek derecede hareketli sperm yıkama yöntemi yoluyla elde edilir ve başarılı dölleme ve hamilelik şansını artırır. Sperm yıkama ortamı sadece hareketli sperm üretmekle kalmaz, aynı zamanda normal morfolojiye ve düşük DNA fragmentasyonuna sahip spermleri de seçer, bu da yüksek kaliteli embriyoların gelişimini destekler (Santiago v. d., 2017). Bu bağlamda, L-Karnitin (L-C) ve Koenzim Q10 (CoQ10) gibi aktif maddelerinin antioksidan özellikleri, sperm yıkama ortamında düşük sperm DNA fragmentasyonu, ROS ve apoptoze sahip spermlerin seçilmesi amacıyla kullanılabilir.

Semende lökositler ve anormal veya olgunlaşmamış spermatozoa, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana üreticileridir (Pacey, 2006). Glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz -SOD ve CAT üreten enzimatik sistem ve diyet veya takviye olarak tüketilen çeşitli maddelerden oluşan enzimatik olmayan sistemin her ikisi de antioksidanlar üretir (Majida v. d., 2015). ROS oluşumu ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengesizlikten kaynaklanan stres, seminal sıvıdaki ROS miktarı antioksidan kapasitesini aştığında sperm DNA'sına zarar verir. Oksidatif stres, plazma membranlarında lipit peroksidasyonuna duyarlı olan çoklu doymamış yağ asitlerinin büyük oranda olmasından kaynaklanmaktadır. CoQ10, spermatozoanın etkili enerji sistemini korumak ve membranlarında lipit peroksidasyonunu önlemek için çok önemlidir. İdiopatik erkek kısırlığı vakalarında spermatogenezini arttırmak için sıklıkla kullanılır (Balercia v. d., 2009).

Erkek kısırlığı, reaktif oksijen türlerinin ve antioksidanların miktarlarındaki dengesizlik ile bağlantılıdır. Oksidatif stres olarak da bilinen bu dengesizlik, kısırlığa neden olur. Aşırı ROS üretimiyle başa çıkmak için antioksidan sistem çok önemlidir. Antioksidanlar sperm hasarına neden olabilecek aşırı ROS'u ortadan kaldırır ve sperm yıkama medyumlarında antioksidanların kullanımı ROS'a bağlı erkek kısırlığının üstesinden gelebilir. CoQ10, vücutta doğal olarak üretilen ve enerji oluşumuna yardımcı olan bir antioksidandır. Sperm parametrelerini artırdığı kanıtlanmıştır. Sperm hareketliliği, sperm sayısı ve sperm morfolojisi, CoQ10 takviyesi alınarak geliştirilebilir. Ek olarak spermdeki oksidatif stresi de azaltabilir, bu da sperm DNA bütünlüğü için olumludur (Alahmar, 2021). L-C, aminoasit yapısına benzeyen ve enerji metabolizması için gerekli olan bir maddedir. Klinik çalışmalara göre diyetle L-C eklenmesi sperm parametrelerini, özellikle de sperm hareketliliğini iyileştirir ve ayrıca semen sıvısındaki ROS düzeylerini azaltır. Ek olarak sperm morfolojisini iyileştirebilir ve anormal sperm formlarının prevalansını azaltabilir (Majida v. d., 2015).

Bu çalışmada sperm yıkama ortamına 5-HT, L-C ve CoQ10 ekleyerek antioksidan özellikleriyle sperm parametrelerini olumlu yönde etkilemeyi amaçladık. Piyasada bulunan iki besiyerinin aksine, 5-HT/L-C/CoQ10 besiyeri ile DNA fragmentasyonunda ve ROS değerlerinde azalma gözlemledik (Liu v. d., 2023). Benzer şekilde Chavoshi Nezhad ve ark. (2021), spermatozoanın dondurulup çözülmesinden sonra kullanılan sperm ortamındaki L-C ve CoQ10'un, ROS düzeylerini düşürdüğünü ve dondurmadan kaynaklanan sperm hasarını azalttığını göstermiş ve L-karnitin takviyeli ortamda sperm motilitesinde anlamlı iyileşme gözlemlemişlerdir.

L-C ve CoQ10'un spermatozoa üzerindeki etkisi iyice belirlenmiş olsa da, erkek üreme sisteminde önemli rollere sahip olan serotoninin (5-HT) etkisi üzerine daha az çalışma bulunmaktadır. Serotonin (5-HT), bir dizi insan fizyolojik fonksiyonunu kontrol eden nörotransmitterdir. İnsanlarda ve hayvanlarda merkezi ve periferik sinir sistemini etkileyerek erkek üreme sisteminde önemli rollere sahipken, L-C ve CoQ10'un etkilerine kıyasla sperm parametreleri üzerindeki doğrudan etkileri yeterince araştırılmamıştır. *In vitro* araştırmalar, seçici 5-HT geri alım inhibitörlerinin (SSRI), sperm mitokondrisinde adenozin trifosfat (ATP) sentezini inhibe ederek sperm

öldürücü etkiler sergilediğini göstermiştir (Xu J. v.d., 2022). Spermatozoanın yüzeyindeki 5-HT reseptörleri veya 5-HT taşıyıcıları, rahim veya seminal sıvıda bulunan 5-HT'ye bağlanabilir, bu da 5-HT'nin sperm fizyolojisinde potansiyel bir fonksiyonu olduğunu düşündürür (Amenta v.d. 1992). 5-HT'nin sperm fonksiyonu üzerinde doğrudan etkisi olduğuna dair az sayıda rapor vardır ancak yakın zamanda hamster spermatozoasının akrozom tepkisini ve hiperaktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Fujinoki v. d. 2011). Omote M. ve ark. (2023) çalışması, insan spermatozoasında yedi çeşit 5-HT reseptörü bulunduğunu ve bunlardan 5-HT_{2A} reseptörlerinin sperm motilitesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Özellikle erkek faktörlü kısırlık ve açıklanamayan kısırlık durumlarında bu etkilerin tüp bebek sikluslarında fertilizasyon ve embriyo gelişimi açısından olumlu yönde kullanılabileceğini öngörüyoruz.

Bu tez kapsamında, 5-HT içeren sperm yıkama ortamına antioksidan özellikleri ile sperm parametrelerini iyileştirme potansiyelini değerlendirmek amacıyla L-C ve CoQ10 ekledik. Hipotezimizi destekleyen diğer iki ortamın aksine DNA fragmentasyonunda ve ROS değerlerinde azalma gözlemledik. Bu bağlamda L-C ve CoQ10 antioksidanları sperm yıkama ortamlarında düşük DNA fragmentasyonu, ROS ve apoptoz içeren spermatozoayı arttırmak için kullanılabileceğine dair veriler elde ettik.

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, erkek kısırlığı ve azalmış sperm dölleme potansiyeli ile ilişkili olduğundan sperm kalitesinin bir göstergesi olabilir (Shukla v.d. 2012) ve 5-HT/L-C/CoQ10 kombinasyonunun sperm canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığını gözlemledik.

Bu tez çalışmasında; Irvine®, Origio®, 5-HT/L-C/CoQ10 progresif hareketlilik; %59,5±23,6, %64,7±23,7, %66,3±24,3 olarak tespit edilirken, ROS değeri 5-HT/L-C/CoQ10, Origio®, Irvine® için %3,4± 0,27, %9,3± 0,3, %8,9± 0,29 olarak belirlenmiştir. ROS seviyesi kombinasyon ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. DNA hasarı Origio® 5,3% ± 0,14 Irvine® 5,82%±0,09 ve 5-HT/L-C/CoQ10 kombinasyon 4,8% ±0,12 olarak gözlenmiştir (p>0,05). 5-HT/L-C/CoQ10 ile yıkanan spermelerde nekroz oranı %3,15± 0,02, Irvine® %18,78±0,3 Origio® %13,49± 2,1 olarak belirlenmiştir. 5-HT/L-C/CoQ10 ile yıkanan sperm örneklerinde ki canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı çıkmış olması bizim için

ümit verici olmuştur. Normal morfolojiye sahip spermier tedavi için kullanılan spermierdir ve 5-HT/L-C/CoQ10 ile yıkanan spermierin normal morfolojisi %16,93±4,8, Origio® %15,72±3,81, Irvine® %13,5±3,55'ti. Üç grupta yıkanan spermierin akrozomal, nüklear (çekirdek) ve kuyruk anomalileri ayrı ayrı incelenmiştir. 5-HT/L-C/CoQ10 ile yıkanan spermierin akrozomal, nüklear, kuyruk anomalileri her iki gruptan daha düşük olarak gözlenmiştir.

Bu sonuçlar ümit verici görünse de bazı kısıtlılıklar da mevcuttur. Tek bir tüp bebek kliniğinden yalnızca 98 gönüllü dahil edilmiştir. Daha büyük ve daha çeşitli bir örneklem büyüklüğü, bulguların genellenebilirliğini artıracaktır. Sperm yıkama medyumunda; ROS, apoptoz ve DNA fragmentasyon değerleri hazırlanan yeni sperm yıkama medyumu üzerinden değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasında L-C ve CoQ10 etken maddelerinin kombine etkisi değerlendirilmiş olup ayrı ayrı etkinlikleri belirlenememiştir. Ayrıca yeni sperm yıkama medyumun in vitro fertilizasyon başarısını artırabileceği öne sürülse de katılımcıların hamilelik oranları, canlı doğum oranları veya embriyo kalitesi gibi gerçek IVF sonuçları hakkında verilerin eldesi için yeni çalışmaların planlanması gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu doktora tez çalışmasıyla serotonin (5-HT), L-karnitin (L-C) ve Koenzim Q10 (CoQ10) ile zenginleştirilmiş yeni sperm yıkama medyumun (SWM), 5-HT/L-C/CoQ10 SWM yaygın olarak kullanılan ticari sperm yıkama medyumlarına (SWM Origio® ve SWM Irvine Scientific®) kıyasla sperm canlılığını attırdığını ve apoptoz oranını azalttığını gösteren umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve ROS seviyelerindeki önemli azalmalar, 5-HT/L-C/CoQ10 sperm yıkama medyumunun in vitro fertilizasyon tedavileri için gelecekte faydalı olma potansiyelini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

Amenta F, Vega JA, Ricci A, Collier WL. “*Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system*”. Anat Rec. (1992) ;233(3):478-84.

Agarwal A, Said TM. “*Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach*”. BJU Int. PMID: 15705068 (2005); 95: 503-7

Agarwal, A.; Finelli, R.; Selvam, M.K.P.; Leisegang, K.; Majzoub, A.; Tadros, N.; Ko, E.; Parekh, N.; Henkel, R.; Durairajanayagam, D.; et al. ‘*A Global Survey of Reproductive Specialists to Determine the Clinical Utility of Oxidative Stress Testing and Antioxidant Use in Male Infertility*’. World J. Men’s Health PMID: 33831977; PMCID: PMC8255391.(2021): 470–488.

Aitken RJ. ‘*Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage*’. Mol Reprod Dev. PMID: 28749007. (2017):1039-1052.

Aitken RJ, Baker HW. “*Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans?*”. Hum Reprod. PMID: 8582971.(1995):1736-9.

Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. ‘*Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine*’. Mol Reprod Dev. PMID: 9211432.(1997):468-82.

Aitken RJ. “*The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function*”. Biol Reprod. PMID: 21490245.(2011):9-12.

Alahmar AT, Calogero AE, Sengupta P, Dutta S. ‘*Coenzyme Q10 Improves Sperm Parameters, Oxidative Stress Markers and Sperm DNA Fragmentation in Infertile Patients with Idiopathic Oligoasthenozoospermia*’. World J Mens Health. PMCID: PMC7994657.(2021):346-351.

Alahmar AT, Sengupta P, Dutta S, Calogero AE. ‘*Coenzyme Q10, oxidative stress markers, and sperm DNA damage in men with idiopathic*

oligoasthenoteratospermia". Clin Exp Reprod Med. PMID: 34078008; PMCID: PMC8176152.(2021):150-155.

Alvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ." *Biological variation of seminal parameters in healthy subjects*". Hum Reprod.PMID: 14507825.(2003):2082-8.

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. '*Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers*'. J Biol Chem. PMID: 2138622.(1990):4923-8.

Aoyagi M., Arvai AS., Ghosh S., Stuehr DJ., Tainer J A. and Getzoff ED. '*Structures of tetrahydrobiopterin binding-site mutants of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer and implicated roles of Trp457*'. Biochemistry, 40.(2001): 12826– 12832

Arce JC, De Souza MJ, Pescatello LS, Luciano AA. '*Subclinical alterations in hormone and semen profile in athletes*'. Fertil Steril. PMID: 8425638.(1993):398-404.

Aziz N, Novotny J, Oborna I, Fingerova H, Brezinova J, Svobodova M. '*Comparison of chemiluminescence and flow cytometry in the estimation of reactive oxygen and nitrogen species in human semen*'. Fertil Steril. PMID: 20413114.(2010):2604-8.

Azmitia EC. '*Handbook of Behavioral Neurobiology of serotonin*'. Academic Press is an imprint of Elsevier, San Diego, USA, 2010.

Azmitia EC. '*Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis*'. Int Rev Neurobiol. PMID: 17178471. (2007); 77:31-56

Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S, Ricciardo-Lamonica G, Boscaro M, Lenzi A, Littarru G. '*Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial*'. Fertil Steril. PMID: 18395716.(2009):1785-92.

- Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, Oates RD, van der Poel S, St John B, Sigman M, Sokol R, Tournaye H. ‘*The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities*’. Hum Reprod Update. (2017)1;23(6):660-680.
- Behringer RR. ‘*The müllerian inhibitor and mammalian sexual development*’. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. PMID: 8570693.(1995):285-8.
- Berezney R, Coffey DS. ‘*Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei*’. J Cell Biol. PMID: 873992; PMCID: PMC2111415.(1977):616-37.
- Bibbins PE Jr, Ward JB Jr, Lipshultz LI, Hokanson JA, Legator MS.’ *Incidence of sperm with two fluorescent bodies in men with impaired fertility*’. Fertil Steril. PMID: 1370943.(1992):402-8.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. ‘*International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care*’. Hum Reprod. PMID: 17376819 (2007):1506-12.
- Borges E Jr. ‘*Total motile sperm count: a better way to rate the severity of male factor infertility?*’ JBRA Assist Reprod. PMID: 27244760 (2016):47-8
- Burrows PJ, Schrepferman CG, Lipshultz LI. ‘*Comprehensive office evaluation in the new millennium*’. Urol Clin North Am. PMID: 12516759.(2002):873-94.
- Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis.’ *Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss*’. J Biol Chem. PMID: 9565547. (1998 May); 11401-4.
- Cecchino GN, Seli E, Alves da Motta EL, García-Velasco JA. ‘*The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights*’. Reprod Biomed Online. PMID: 29598846.(2018):686-697.

- Chavoshi Nezhad N, Vahabzadeh Z, Allahveisie A, Rahmani K, Raoofi A, Rezaie MJ, Rezaei M, Partovyan M. “*The Effect of L-Carnitine and Coenzyme Q10 on the Sperm Motility, DNA Fragmentation, Chromatin Structure and Oxygen Free Radicals During, before and after Freezing in Oligospermia Men*”. Urol J. (2021 Feb) 6;18(3):330-336.
- Chemes H.E., ‘*Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men*’. Hum Reprod Update 2003; 9: 405–28
- Christensen AK. ‘*Leydig cells. In: Hamilton DW, Greep RO, editors. Handbook of physiology*’. Baltimore: Williams and Wilkins; 1975. p. 57–94.
- Çiçek M, Mollamahmutoğlu L. ‘*Yardımcı üreme teknikleri*’. Palme yayıncılık, (2009) s.1-151,283-322
- Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, Braat D, Repping S, Hamer G. ‘*Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis*’. PLoS One. PMID: PMC5104467. (2016);11(11)
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. ‘*Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules*’. Cell Tissue Res. PMID: 2076533.(1990);253-61.
- Davis RO, Gravance CG. ‘*Consistency of sperm morphology classification methods*’. J Androl. PMID: 8188540.(1994):83-91.
- De Kretser DM.” *Ultrastructural features of human spermiogenesis*”. Z Zellforsch Mikrosk Anat. (1969); 98:477–505
- DeKretser DM, Kerr JB. ‘*The cytology of the testis. In: Knobil E, Neil JD, editors. The physiology of reproduction*’. New York: Raven; 1994:1177–29

- Dickinson LA, Joh T, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. ‘*A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition*’. Cell. PMID: 1505028.(1992):631-45.
- Dogan S, Mason MC, Govindaraju A, Belser L, Kaya A, Stokes J, Rowe D, Memili E. ‘*Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm*’. J Reprod Dev. PMID: 22986927; PMCID: PMC3943226. (2013):18-26.
- Donald P. Evenson. ‘*Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) for Fertility Assessment*.’ First published: 04 August 2022. Curr Protoc. PMID: 35926128.(2022): 508.
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. ‘*Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects*’. Asian J Androl (2006); 8:11-29.
- Santiago-Moreno J, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Delgadillo JA, López-Sebastián A. ‘*Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing*’. Anim Reprod Sci. PMID: 28416376.(2017):141-150.
- Ewing LL, Keeney DS.’’ *Leydig cells: structure and function. In: Desjardins C, Ewin LL, editors. Cell and molecular biology of the testis*’. New York: Oxford University Press; 1993.
- França LR, Ghosh S, Ye SJ, Russell LD. ‘*Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat*’. Biol Reprod. PMID: 8286604.(1993):1215-28.
- Franken D.R. and Oehninger S.’’*Semen analysis and sperm function testing*’’, Asian J Androl. Published online 2011 Dec 19. (2012); 14(1): 6–13.
- Fujinoki M. ‘*Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm*’. Reproduction. MID: 21555358.(2011):255-66

Gallardo E, Simón C, Levy M, Guanes PP, Remohí J, Pellicer A. ‘*Effect of age on sperm fertility potential: oocyte donation as a model*’. Fertil Steril. PMID: 8690113.(1996):260-4.

Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. ‘*Yardımla üreme teknikleri temel kitabı*’. Nobel tıp kitabevleri. (2010). s. 5-92,625-638.

Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Agarwal A. ‘*Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation*’. Hum Reprod. PMID: 11527899.(2001):1922-30.

Gökçe A. ‘*Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Standart Semen Analizi*’, Turk Urol Sem (2011); 2: 1-7.

Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. ‘*Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function*’. J Androl. PMID: 8792218 (1996):276-87.

Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. ‘*Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function*’. Int J Androl. PMID: 9675617.(1998):81-94.

Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB. ‘*Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality*’. Fertil Steril. PMID: 1572474.(1992):1058-65.

Günel S, Aktan E, Yücel A. ‘*2002 WHO laboratuvar el kitabı: insan semeni ve sperm servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi*’. Ankara: Tıp Teknik Yayınevi, 4. baskı, s. 6-7,60-64.

- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, et al. ‘*Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*’. N Engl J Med. (2001); 345:1388–93
- Gvozdjaková A, Kucharská J, Ostatníková D, Babinská K, Nakládal D, Crane FL. ‘*Ubiquinol improves symptoms in children with autism*’. Oxid Med Cell Longev. PMID: 24707344; PMCID: PMC3953391.(2014): 798-957.
- Hafez ES. ‘*The human semen and fertility regulation in the male. International Conference in Andrology*’. J Reprod Med. PMID: 1255647.(1976):91-6.
- Hassa H.’’ *İnfertil Olgularda Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları*’. Eskişehir, Osmangazi Üniversitesi Yayınları (2003):100-230.
- Heller C, Clermont Y. ‘*Kinetics of the germinal epithelium in man*’. Recent Prog Horm Res. PMID: 14285045.(1964): 545–75
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. ‘*Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment*’. Reprod Biol Endocrinol. PMID: 14617369; PMCID: PMC293421.(2003);1:107.
- Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. ‘*Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios*’. Biol Reprod. PMID: 9096886.(1997):1020-4.
- Ilacqua A. et al.’’ *The Physiology of the Testis*’, Antonino B. and Derek L. Researchgate Chapter. Springer International Publishing, January,2017.
- Jiménez-Trejo F., Tapia-Rodríguez M., Cerbón M., M Kuhn D., Manjarrez-Gutiérrez G., C Adriana Mendoza-Rodríguez, Picazo O.’’*Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility*’. PMID: 23028123; PMCID: PMC4779048. (2012) :677-85.

Josso N, di Clemente N, Gouédard L. ‘*Anti-Müllerian hormone and its receptors*’. Mol Cell Endocrinol. PMID: 11420127.(2001):25-32.

Kalla NR. ‘*Demonstration of direct effect of serotonin on rat Leydig cells*’. Andrologia. PMID: 496032.(1979):259-62.

Kandil, H.; Agarwal, A.; Saleh, R.; Boitrelle, F.; Arafa, M.; Vogiatzi, P.; Henkel, R.; Zini, A.; Shah, R. ‘*Editorial Commentary on Draft of World Health Organization Sixth Edition Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*’. World J. Men’s Health. PMID: 34169684; PMCID: PMC8443989.(2021):39, 577.

Kittles RA, Young D, Weinrich S, Hudson J, Argyropoulos G, Ukoli F, Adams-Campbell L, Dunston GM. ‘*Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk*’. Hum Genet. PMID: 11702204.(2001):253-61

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. ‘*Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*’. Blood. PMID: 8068938. (1994):1415-20.

Levine RI, Sjoerdsma A. ‘*Monoamine oxidase activity in human tissues and intestinal biopsy specimens*’. Proc Soc Exp Biol Med. PMID: 14464649. (1962): 109-225

Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. ‘*Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men*’. Fertil Steril. PMID: 7672165. (1995):868-70.

Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. ‘*Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates*’. Fertil Steril. PMID: 17904130.(2008):352-9.

- Lindholmer C, Eliasson R. ‘*The effects of albumin, magnesium, and zinc on human sperm survival in different fractions of split ejaculates*’. Fertil Steril. PMID: 4442614.(1974):424-31.
- Liu J, Zhu K, Xu S, Tu W, Lin X, Su Y, Huang R, Deng Y, Liu Y.’’ *Double-edged sword: effects of human sperm reactive oxygen species on embryo development in IVF cycles*’. Reprod Biol Endocrinol. (2023 Jan) 4;21(1):1.
- Manna C, Barbagallo F, Manzo R, Rahman A, Francomano D, Calogero AE.’’ *Sperm Parameters before and after Swim-Up of a Second Ejaculate after a Short Period of Abstinence*’. J Clin Med. PMID: 32260592; PMCID: PMC7231087. (2020):1029.
- Martinez F; ‘*International Society for Fertility Preservation–ESHRE–ASRM Expert Working Group. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives*’. Fertil Steril. (2017);108(3):407-415.e11
- Majida H. Mutlag Al-Shammari, Jabbar H. Yenzeel& Muhammad-Baqir M-R Fakhrildin. ‘*Effect of L- Carnitine and COQ10 Addition to SMART Pro Medium on Human Sperm Parameters during In Vitro Sperm Activation* ‘’. Journal of Pharmacy and Biological Sciences (JPBS) (Mar.- Apr.2017); 2319-7676.
- Meers P, Mealy T. ‘*Relationship between annexin V tryptophan exposure, calcium, and phospholipid binding*’. Biochemistry. PMID: 8499444. (1993):5411-8.
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. ‘*The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria*’. Hum Reprod. PMID: 2394790.(1990):586-92.
- Mirkovitch J, Mirault ME, Laemmli UK. ‘*Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold*’. Cell. PMID: 6091913.(1984):223-32.

Mladenovic I, Micic S, Papic N, et al. Sperm morphology and motility in different age populations. *Arch Androl* 1994, 32(3):197-205.

Niaraki MA, Subramanian MG, Moghissi KS. '*Effects of serotonin on reproductive hormone levels and testis morphology in adult male rats*'. *Proc Soc Exp Biol Med*. PMID: 6812062.(1982):464-70.

Omote M, Wakimoto Y, Shibahara H. '*Possible Role of 5-Hydroxytryptamine (5-HT) Receptor on Human Sperm Motility Regulation*'. *Cureus*. (2023 Nov) 27;15(11): e49530.

Oguz Y, Guler I, Erdem A, Mutlu MF, Gumuslu S, Oktem M, Bozkurt N, Erdem M. '*The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients*'. *J Assist Reprod Genet*. PMID: 29572695; PMCID: PMC6029997.(2018):1083-1089.

Pacey A. '*Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A view from the andrology laboratory*'. *Hum Reprod*. PMID: 16396933.(2006):1105-9.

Patel AS, Leong JY, Ramasamy R. '*Prediction of male infertility by the World Health Organization laboratory manual for assessment of semen analysis: A systematic review*'. *Arab J Urol*. PMID: 29713540; PMCID: PMC5922004.(2017):96-102.

Patrick J. Rowe, Frank H. Comhaire, Timothy B. Hargreave, Heather J. Mellows. '*WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple*'. Published by Cambridge University Press, 1993.

Payne AH, Wong KL, Vega MM. '*Differential effects of single and repeated administrations of gonadotropins on luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells*'. *J Biol Chem*. PMID: 6248547.(1980):7118-22.

Roosen-Runge EC, Holstein AF. '*The human rete testis*'. *Cell Tissue Res*. PMID: 657253.(1978):409-33.

- Rossi M, Gonzalez-Castro R, Falomo ME. ‘*Effect of Caffeine and Pentoxifylline Added Before or After Cooling on Sperm Characteristics of Stallion Sperm*’. J Equine Vet Sci. Epub 2019 Dec 26. PMID: 32172905. (2020);87 :1.
- Rowe PJ, Comhaire F, Hargreave TB, Mellows HJ, editors. ‘*WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple*’. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.
- Russell LD, Griswold MD, editors. ‘*The Sertoli cell*’. Clearwater. Cache Press; 1993.
- Sablin SO., Yankovskaya V., Bernard S., Cronin CN. and Singer TP. ‘*Isolation and characterization of an evolutionary precursor of human monoamine oxidases A and B*’. Eur. J. Biochem., (1998):253: 270– 279.
- Şeftalioğlu A.’ *Genel insan embriyolojisi*’. 11-17, Ankara Ü. Basımevi, Ankara, 1991.
- Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. ‘*The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility*’. Hum Reprod. PMID: 10548626.(1999):2801-7.
- Sharpe RM. ‘*Regulation of spermatogenesis*’. In: Knobill E, Neil JD, editors. The physiology of reproduction. New York: Raven; (1994):1363–434
- Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. ‘*Apoptosis, spermatogenesis and male infertility*’. Front Biosci (Elite Ed). (2012 Jan) 1;4(2):746-54.
- Sies H. ‘*Strategies of antioxidant defense*’. Eur J Biochem. PMID: 7688300.(1993):213-9.
- Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jørgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen AN, Keiding N, Skakkebaek NE, Spira A, Jouannet P. ‘*Time to pregnancy and*

semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities”. Hum Reprod. PMID: 11821304.(2002):503-15.

Slamenová D., M Dusinská, A Gábelová, E Horváthová, C Oravec, I Chalupa, E Szabová ‘‘Assessment of toxicity, clastogenicity, mutagenicity and transforming activity of pentoxifylline in mammalian cells cultured in vitro’’’. Mutat Res. (1994);275-85.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS.’’ *Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man*’’. N Engl J Med. PMID: 8090165.(1994):1056-61.

Spano M, Bonde JP, Hjolund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. ‘‘Sperm chromatin damage impairs human fertility’’. Fertil Steril (2000); 73:43- 50

Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML. ‘‘Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI’’. Hum Reprod. PMID: 16037114.(2005):3101-8.

Tapırsız ÖL, Altınbaş S, Abıke F. Göktolga Ü.’’ *Semen analysis from a point of view of gynecologist and recent developments*’’. J Turk Soc Obstet Gynecol. (2012): 25- 31.

Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR, Dufau ML. ‘‘Serotonin secretion from rat Leydig cells’’. Endocrinology. PMID: 8243331.(1993):3026-9.

Xu J, He K, Zhou Y, Zhao L, Lin Y, Huang Z, Xie N, Yue J, Tang Y. ‘‘The effect of SSRIs on Semen quality: A systematic review and meta-analysis’’. Front Pharmacol. PMID: 36188547; PMCID: PMC9519136.(2022);13:91.

Van Wolff M.’’ *The role of Natural Cycle IVF in assisted reproduction*’’. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. (2019);33(1):35-45.

Volpes A. et al. “*The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures*”, J Assist Reprod Genet. (2016); 33(6): 765– 770.

Weinbauer G.F. et al.” *Physiology of Testicular Function*”, Researchgate Chapter · January 2010:64-51

Westerman R. ‘*Biomarkers for demographic research: sperm counts and other male infertility biomarkers*’. Biodemography Soc Biol. Jan-Mar.(2020):73-87.

World Health Organization. ‘*WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition*’. Geneva: World Health Organization, , Cambridge University Press; 2021.

World Health Organization. ‘*Who Laboratory Manuel for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*’. World Health Organization, Cambridge University Press;2010

World Health Organization. ‘*World Health Organization laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge*’. World Health Organization, Cambridge University Press; 1999.

Shang XJ, Wang LL, Mo DS, Cai HC, Zheng DD, Zhou YZ. ‘*Effect and safety of L-carnitine in the treatment of idiopathic oligoasthenozoospermia: a systemic review*’. Zhonghua Nan Ke Xue. PMID: 25707144.(2015):65-73.

Yilmazer YB, Koganezawa M, Sato K, Xu J, Yamamoto D. ‘*Serotonergic neuronal death and concomitant serotonin deficiency curb copulation ability of Drosophila platonic mutants*’. Nat Commun. PMID: 27958269; PMCID: PMC5159827.(2016)13;7.

Youle RJ, Strasser A. ‘*The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*’. Nat Rev Mol Cell Biol. PMID: 18097445.(2008):47-59.

Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. '*Human sperm capacitation and the acrosome reaction*'. Hum Reprod. PMID: 1752929. (1991):12

