



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SPERMİNDE KRİYOPREZERVASYON SONRASI
OLUŞAN DNA HASARI ÜZERİNE İN VİTRO ZENCEFİL
(*Zingiber officinale*) UYGULAMASININ ETKİSİ**

Zuhal ÇANKIRI

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat AKKUŞ

DİYARBAKIR 2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SPERMİNDE KRİYOPREZERVASYON SONRASI
OLUŞAN DNA HASARI ÜZERİNE İN VİTRO ZENCEFİL
(*Zingiber officinale*) UYGULAMASININ ETKİSİ**

Zuhal ÇANKIRI

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat AKKUŞ

DİYARBAKIR 2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Zuhal ÇANKIRI'nın hazırladığı “İnsan Sperminde Kriyoprezervasyon Sonrası Oluşan DNA Hasarı Üzerine İn Vitro Zencefil (*Zingiber Officinale*) Uygulamasının Etkisi” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Murat AKKUŞ _____

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı Prof. Dr. Murat AKKUŞ _____

Üye Prof. Dr. Selçuk TUNİK _____

Üye Prof. Dr. M. Cudi TUNCER _____

Üye Prof. Dr. D. Özlem DABAK _____

Üye Prof. Dr. Tuncay KULOĞLU _____

Tarih: 26/02/2025

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

/ /

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

26/02/2025

Zuhal Çankırı

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum her an, her türlü bilgi, birikim, tecrübe ve görüşlerinden faydalandığım ve tezimin her aşamasında katkılarını eksik etmeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat AKKUŞ başta olmak üzere; eğitimim süresince her konuda desteğini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Selçuk TUNİK'e, ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı diğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Engin DEVECİ'ye, Prof. Dr. Sevda Söker'e, Prof. Dr. Ayfer AKTAŞ'a, Prof. Dr. Cenap EKİNCİ'ye ve Doç. Dr. Fırat AŞIR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez izleme komisyonunda yer alarak değerli katkılarda bulunan Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi ve bölüm başkanı Prof. Dr. M. Cudi TUNCER'e, tez çalışmamda kullandığım örneklerin temini ve her türlü desteği için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Onur DEDE'ye, yine tez çalışmamda kullandığım zencefil ekstraktının hazırlanması aşamasında engin bilgilerinden faydalandığım Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ'a, tez çalışmalarım süresince yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım doktora öğrencisi Dilara AKINCI'ya; sabrı ve hoşgörüsü ile her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşim ve özverili biricik kızıma ve bu zorlu süreçte her an yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tezimdeki sperm DNA fragmentasyonlarını, floresan mikroskopisi ile görüntülemeye yardımlarını esirgemeyen Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜBTAM), Veteriner Teşhis Analiz Laboratuvarı sorumlu ve çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
1. ÖZETLER	1
1.1. Türkçe Özet.....	1
1.2. Abstract	3
2. GİRİŞ VE AMAÇ	5
3. GENEL BİLGİLER.....	8
3.1. Erkek Üreme Sistemi	8
3.1.1. Testisler	8
3.1.2. Seminifer Tübüller	9
3.1.3. Genital Kanallar	11
3.1.4. Aksesuar Bezler	12
3.1.5. Penis	13
3.2. Spermatogenez	14
3.2.1. Spermatogonyal Evre	14
3.2.2. Spermatozoid (Mayoz) Evresi.....	15
3.2.3. Spermiyogenez	15
3.2.4. Sperm Kapasitasyonu ve Akrozom Reaksiyonu	17
3.2.5. Olgun (Matür) Sperm.....	20
3.3. Semen Yapısı	21
3.3.1. Semen Analizi	21
3.4. Sperm DNA Fragmentasyonu (DNA Hasarı)	25
3.4.1. Kromatin Paketlenme Anomalileri	26
3.4.2. Apoptozis	26
3.4.3. Oksidatif Stres.....	27
3.4.4. Kromozomal Hasarlar	27
3.5. Sperm DNA Fragmentasyonunu Belirleme Yöntemleri.....	28

3.5.1. DNA Hasarını Değerlendirmeye Yönelik Yöntemler.....	28
3.5.2. Kromatin Organizasyon Anomalilerini Belirleyen Yöntemler	30
3.6. Sperm Hücresinin Elde Edilmesi	33
3.7. Sperm Hazırlama Yöntemleri	35
3.7.1. Yıkama (Sperm Wash) Yöntemi.....	35
3.7.2. Yüzdürme (Swim-up) Yöntemi.....	36
3.7.3. Dansite Gradient Yöntemi.....	37
3.8. Kriyoprezervasyon	38
3.8.1. Kriyoprezervasyonun Tarihçesi	39
3.8.2. Kriyoprezervasyon Yöntemleri.....	40
3.8.3. Kriyoprotektanlar	42
3.8.4. Çözdürme Prosedürü.....	44
3.8.5. Kriyohasar Mekanizmaları.....	45
3.8.6. Sperm Kriyoprezervasyonu ve Çözme Prosedürü	46
3.8.7. Sperm Kriyoprezervasyonunun Endikasyonları	48
3.8.8. Türkiye’de Sperm Kriyoprezervasyonu ile İlgili Yasal Düzenlemeler.....	49
3.9. Tıbbi Bitkiler ve Fertilite Üzerine Etkileri.....	50
3.9.1. Zencefil (<i>Zingiber Officinale</i> Roscoe).....	50
3.9.2. Etkin Maddeleri ve Kullanım Alanları.....	53
3.9.3. Geleneksel Tıpta Kullanımı	54
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	56
4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	56
4.2. Semen Temini ve Analizi.....	56
4.3. Sperm Konsantrasyonu ve Motilite Tayini	57
4.4. Sperm Vitalite Değerlendirmesi.....	58
4.5. Sperm Boyama ve Morfoloji Değerlendirmesi	58
4.6. Gradient Tekniği ile Semen Hazırlanması	59
4.7. Zencefil (<i>Zingiber Officinale</i>) Ekstraktının Hazırlanması	60
4.8. Sperm Kriyoprezervasyonu ve Çözme İşlemi.....	61
4.9. Sperm DNA Fragmentasyonunun Acridine Orange ile Değerlendirilmesi	62
4.10. İstatistiksel Analiz.....	63
5. BULGULAR.....	64

5.1. Zencefilin Kriyoprezervasyon Sonrası Sperm Vitalitesi Üzerine Etkisi.....	64
5.2. Zencefilin Kriyoprezervasyon Sonrası Sperm Morfolojisi Üzerine Etkisi	66
5.3. Zencefilin Kriyoprezervasyon Sonrası Sperm Motilitesi Üzerine Etkisi.....	68
5.4. Zencefilin Kriyoprezervasyon Sonrası Sperm DNA Fragmentasyonuna Etkisi	69
6. TARTIŞMA	72
7. SONUÇ	75
8. KAYNAKLAR	76
9. ÖZGEÇMİŞ.....	94
10. EKLER.....	95
10.1. Etik kurul raporu	95
10.2. Gönüllü Hasta Onam Formu	96
10.3. Orjinallik Raporu	97
10.4. Mezuniyet Yayını.....	98

KISALTMALAR VE SİMGELER

- ART** : Assisted Reproductive Techniques
AO : Acridine Orange
DFI : DNA Fragmantasyon İndeksi
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
HOST : Hipoosmotik şişme testi
IUI : İntrauterin İnseminasyon
IVF : İn Vitro Fertilizasyon
ICSI : İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
MESA : Micro Epididymal Sperm Aspiration
PESA : Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
SD : Standart Sapma
SDF : Sperm DNA Fragmantasyonu
TESA : Testicular Sperm Aspiration
TESE : Testicular Sperm Extraction
ÜYTE : Üremeye Yardımcı Tedavi
WHO : World Health Organization
YÜT : Yardımcı Üreme Teknikleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkek üreme sistemi

Şekil 2. Testisin Yapısı

Şekil 3. Spermatogenez

Şekil 4. Olgun bir spermin yapısı

Şekil 5. Makler sayım kamerası ve mikroskop görüntüsü

Şekil 6. Anormal morfolojiye sahip sperm formları

Şekil 7. Cerrahi sperm elde etme yöntemleri

Şekil 8. Swim-up yöntemi

Şekil 9. Dansite Gradient yöntemi

Şekil 10. Camsılaşma ve buz kristali oluşumu

Şekil 11. Sperm kriyoprezervasyonu

Şekil 12. Zencefil tarlası

Şekil 13. Zencefil bitkisinin kökleri

Şekil 14. Zencefil rizomu

Şekil 15. Eozin-Nigrosin boya seti

Şekil 16. Spermac Stain sperm boyama kiti

Şekil 17. Sperm yıkama ve Dansite Gradient medyumunu

Şekil 18. PBS tampon çözeltisi

Şekil 19. Sperm dondurma medyumunu

Şekil 20. Acridine Orange toz boya

Şekil 21. Sperm vitalitesinin gruplar arasında karşılaştırılması

Şekil 22. Eozin-Nigrosin ile boyanan preparatlarda ölü ve canlı sperm

Şekil 23. Normal morfolojiye sahip sperm

Şekil 24. Normal ve anormal morfolojik yapıdaki sperm

Şekil 25. Sperm baş, boyun ve kuyruk defektleri

Şekil 26. Total hareketli ve İleri hareketli sperm

Şekil 27. Sperm DNA Fragmantasyonu

Şekil 28. AO Negatif ve AO Pozitif sperm

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Normal semen parametreleri

Tablo 2. Sperm hareketliliğinin sınıflandırılması

Tablo 3. Kriyoprezervasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Tablo 4. Çalışma grupları

Tablo 5. Yaş ve semen parametrelerine ilişkin tanımlayıcı veriler

Tablo 6. Sperm vitalite yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler

Tablo 7. Normal morfolojiye sahip sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler

Tablo 8. Sperm hareketliliğine ilişkin tanımlayıcı veriler

Tablo 9. Sperm DNA Fragmentasyonuna ilişkin tanımlayıcı veriler

1 ÖZETLER

1.1 Türkçe Özet

İnsan Sperminde Kriyoprezervasyon Sonrası Oluşan DNA Hasarı Üzerine İn Vitro Zencefil (*Zingiber Officinale*) Uygulamasının Etkisi

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Zuhal ÇANKIRI

Danışman: Prof. Dr. Murat AKKUŞ

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Amaç: Kriyoprezervasyon, biyolojik materyallerin (hücreler, dokular, embriyolar, sperm, yumurta hücreleri vb.) çok düşük sıcaklıklarda (genellikle -196°C'de sıvı azot kullanılarak) saklanması işlemidir. İnsan sperminin kriyoprezervasyonu, hem yardımcı üreme teknikleri hem de erkek üreme kapasitesinin korunması açısından büyük bir öneme sahiptir. Ancak, bu işlem sonucunda sperm kalitesinde belirgin bir düşüş meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalar, zencefilin farklı hücre türleri üzerinde antioksidan etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu araştırmanın temel amacı, in vitro uygulanan zencefil ekstraktının insan sperminde özellikle kriyoprezervasyon sonrası oluşan sperm parametrelerindeki bozulmalar ile sperm DNA hasarı üzerine olası faydalarını ortaya koymaktır.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya, Dicle Üniversitesi Hastanesi Üroloji Kliniği'ne başvuran 25-40 yaş aralığındaki 40 normozoospermik (volümü, total sperm sayısı, konsantrasyonu, motilite, vitalite ve morfoloji değerleri alt referans değerlerine eşit veya üzerinde) erkek hasta dahil edilmiştir. Hastalardan mastürbasyon yoluyla alınan ve rutin semen analizleri yapıp dondurma işlemi için hazırlanan semen örnekleri; dondurma öncesi grup, dondurma-çözme sonrası grup, dondurma medyumuna zencefil ekstraktı eklenen grup olmak üzere üçe ayrılmıştır. Tüm örneklerin, dondurma öncesi ve çözme sonrası sperm parametrelerine ve DNA fragmentasyon oranlarına bakılmış ve en az 200 sperm sayılarak ortalamaları alınmıştır. Dondurma öncesi ve çözme sonrası değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamız, dondurma-çözme işlemi sonrasında sperm canlılığı, hareketliliği ve DNA bütünlüğünde belirgin kayıpların meydana geldiğini

doğrulanmıştır. Ancak, dondurma medyumuna zencefil ekstraktı eklenen grupta bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı iyileşmeler gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Sonuç: Bu çalışma, zencefil ekstraktının kriyoprezervasyon sonrası sperm canlılık, hareketlilik ve DNA fragmentasyonları üzerindeki olumlu etkilerini ortaya koymaktadır. Elde edilen veriler, zencefilin kriyoprezervasyon sürecinde potansiyel bir antioksidan ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Sperm, Kriyoprezervasyon, Zencefil, Zingiber Officinale, DNA fragmentasyonu



1.2 Abstract

The Effect of In Vitro Ginger (*Zingiber Officinale*) Application on DNA Damage After Cryopreservation in Human Sperm

Student's Surname and Name: ÇANKIRI Zuhâl

Adviser of Thesis: AKKUŞ Murat, PhD, Professor

Department: Histology and Embriology

Aim: Cryopreservation is the process of storing biological materials (cells, tissues, embryos, sperm, oocytes, etc.) at very low temperatures (usually -196°C using liquid nitrogen). Cryopreservation of human sperm is of great importance for both assisted reproductive techniques and the preservation of male reproductive capacity. However, this process results in a significant decrease in sperm quality. Studies have shown that ginger has antioxidant effects on different cell types. The main aim of this study was to determine the possible benefits of ginger extract applied in vitro on the deterioration of sperm parameters and sperm DNA damage in human sperm, especially after cryopreservation.

Materials and methods: The study included 40 normozoospermic (volume, total sperm count, concentration, motility, vitality and morphology values equal to or above the lower reference values) male patients between the ages of 25-40 years who were admitted to the Urology Clinic of Dicle University Hospital. Semen samples obtained from the patients by masturbation and prepared for freezing after routine semen analysis were divided into three groups: pre-freezing group, post-freeze-thaw group, and the group in which ginger extract was added to the freezing medium. Sperm parameters and DNA fragmentation rates of all samples before and after freezing and thawing were analyzed and at least 200 sperms were counted and averaged. Pre-freezing and post-thawing values were compared statistically.

Results: Our study confirmed that significant losses in sperm viability, motility and DNA integrity occurred after freeze-thawing. However, statistically significant improvements in these parameters were observed in the group in which ginger extract was added to the freezing medium ($p<0.05$).

Conclusion: This study reveals the positive effects of ginger extract on sperm viability, motility and DNA fragmentation after cryopreservation. The data obtained

suggest that ginger can be evaluated as a potential antioxidant agent in the cryopreservation process.

Keywords: Sperm, Cryopreservation, Ginger, Zingiber Officinale, DNA fragmentation



2 GİRİŞ ve AMAÇ

Korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebelik elde edilememesi infertilite olarak tanımlanmakta olup, bu durum dünya genelinde evli çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen yaygın bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Dünya genelinde yapılan araştırmalar, erkek faktörünün infertiliteye katkısının yaklaşık %30-50 arasında olduğunu göstermektedir (1). Bu oran, her bölgedeki sağlık hizmetlerinin erişilebilirliği ve toplumun bilinç düzeyine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Ancak genel olarak erkek faktörlü infertilite, kadın faktörlü infertilite kadar önemli bir katkı sağlar ve çiftlerin infertilite tedavilerine yaklaşımında her iki tarafın da değerlendirilmesi gerekir.

Erkek faktörlü fertilizasyon başarısızlığının en temel nedenlerinden biri, sperm hücrelerinin morfolojisi ve hareketliliğinde meydana gelen bozulmalardır. Farklı etkenler nedeniyle sperm kalitesinde yaşanan düşüşler, bireylerin üreme sağlığını olumsuz yönde etkileyerek yardımcı üreme tekniklerine (YÜT) olan gereksinimi artırmaktadır.

Sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonu (dondurulması), infertilite tedavilerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Üreme hücrelerinin korunması amacıyla, kanser hastalarında kemoterapi ve radyoterapi öncesinde, testis hasarına yol açabilecek diyabet ve otoimmün hastalıklar gibi sağlık sorunlarında, oligospermi ve ejakülasyon bozukluklarında, sperm bankacılığı ve donasyon süreçlerinde, ayrıca ejakülatında sperm bulunmayan ancak testiküler sperm elde edilebilen (azospermi) bireylerde, ÜYTE (Üremeye Yardımcı Tedavi) kapsamında uzun süre saklanmak üzere sperm hücreleri kriyoprezervasyon yöntemiyle dondurulmaktadır (2,3).

İnfertilite tedavilerinde dondurulmuş sperm hücrelerinin kullanımı yaygın olmakla birlikte, çözme işlemi sonrası canlılık ve hareketlilik kaybı ile DNA fragmentasyonunda artış gibi olumsuz etkiler görülebilmektedir. Bunun yanı sıra, dondurulan spermelerin fizyolojik durumu, kriyohasara karşı duyarlılıklarını belirleyen önemli bir unsur olarak değerlendirilmektedir. Normozoospermik örneklerle kıyaslandığında, düşük kaliteli sperm hücrelerinin dondurulması sonrasında canlılık oranlarında daha büyük bir düşüş ve DNA fragmentasyonunda artış gözlemlendiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (4,5).

Günümüzde, sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonunda farklı yöntemler ve çeşitli kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır. Ancak kriyoprezervasyon ve çözme işlemi sonrası ortaya çıkan geri dönüşümsüz olumsuz etkileri en aza indirmek amacıyla yürütülen araştırmalar devam etmektedir. Kriyoprezervasyon işlemi, sperm akrozomu, plazma zarı ve DNA bütünlüğünde bozulmalara yol açarak çözme sonrasında sperm hareketliliğinin ve canlılığının azalmasına neden olmaktadır (6). Bu sürece bağlı olarak meydana gelen hasarlar genellikle buz kristallerinin oluşumu, termal ve osmotik şok ile oksidatif stres gibi mekanizmalarla açıklanmaktadır (7).

Kriyoprezervasyon sürecinde, sperm kalitesini olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerden birinin oksidatif stres olduğu kabul edilmektedir (7,8). Yüksek seviyelerde bulunan reaktif oksijen türleri (ROS), lipid peroksidasyonu yoluyla hem mitokondriyal membrana hem de plazma zarına zarar vererek, kromatin yoğunlaşmasını ve DNA bütünlüğünü bozmakta, bu da spermin hareketliliğinde ve canlılığında azalmaya neden olmaktadır (9). Bu olumsuz etkileri en aza indirmek amacıyla, kriyoprotektan solüsyonlara belirli oranlarda antioksidan eklenerek dondurma-çözme süreci sonrasında sperm kalitesinin iyileştirilebileceğini gösteren birçok araştırma mevcuttur (10). Ancak, standart olarak kabul edilmiş ve rutin kullanıma geçmiş belirli bir antioksidan henüz tanımlanmamıştır.

Zingiber Officinale ya da halk arasında bilinen adıyla Zencefil bitkisinin ana biyoaktif bileşenleri arasında gingerol, shogaol, zingeron ve paradol bulunmaktadır. Bu bileşikler, zencefilin farmakolojik ve terapötik etkilerinin temelini oluşturur ve özellikle antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikarsinojenik özellikleri ile sindirim sistemini destekleyici etkileriyle tanınmaktadır (11,12,13). Zencefilin (*Zingiber officinale*) üreme sistemi üzerindeki olumlu etkilerini inceleyen birçok araştırma bulunmaktadır. Nassiri ve arkadaşları (2009) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, zencefilin güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (14). Amin ve Hamza (2006) ise yaptıkları araştırmada, zencefilin erkek farelerde testiküler antioksidan enzim aktivitesini artırarak sperm motilitesinde iyileşme sağladığını rapor etmiştir (15). Bir başka araştırmada ise, 28 gün boyunca günlük 1000 mg/kg zencefil verilen farelerde, 14. günden itibaren epididimal sperm yoğunluğu ve hareketliliğinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (16).

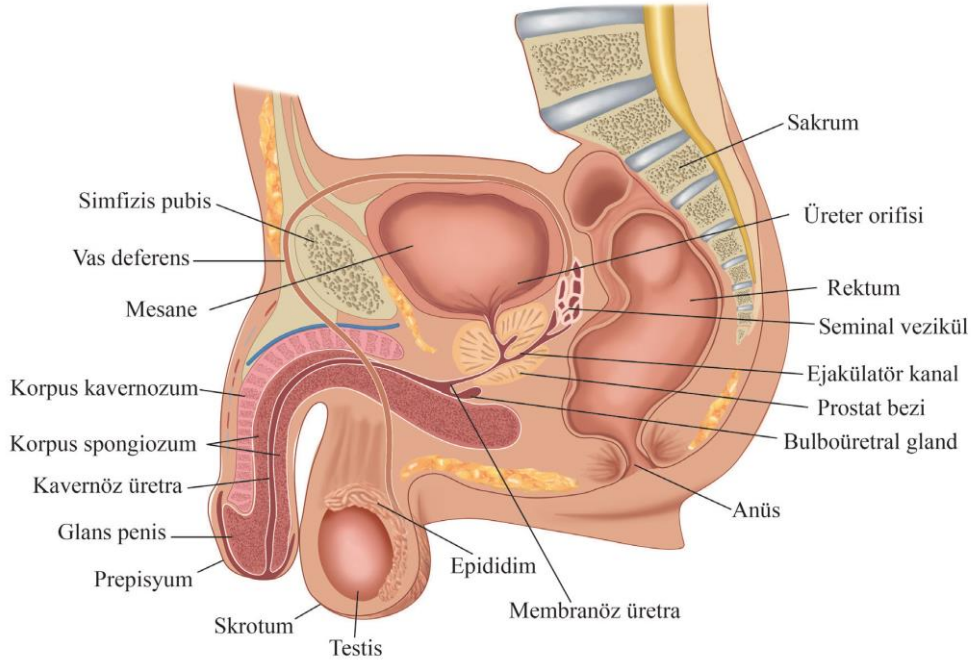
Bu doğrultuda planlanan çalışmamızda, in vitro uygulanan zencefil ekstraktının, özellikle kriyoprezervasyon sonrası sperm parametrelerinde meydana gelen bozulmalar ve sperm DNA hasarı üzerindeki olası olumlu etkilerini ortaya koymayı amaçlamaktayız.



3 GENEL BİLGİLER

3.1 Erkek Üreme Sistemi

Erkek genital sistem; testisler, genital kanallar (epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus ve erkek üretrasının bir bölümü), yardımcı bezler (seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretral bezler) ve penisten oluşur. Bu sistem, spermatogenez süreci ile haploid kromozom yapısına sahip germ hücresi olan spermatozoanın (sperm) üretilmesi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasının yanı sıra; steroidogenez yoluyla androjen hormonların sentezi ve salınımını da gerçekleştirmektedir.

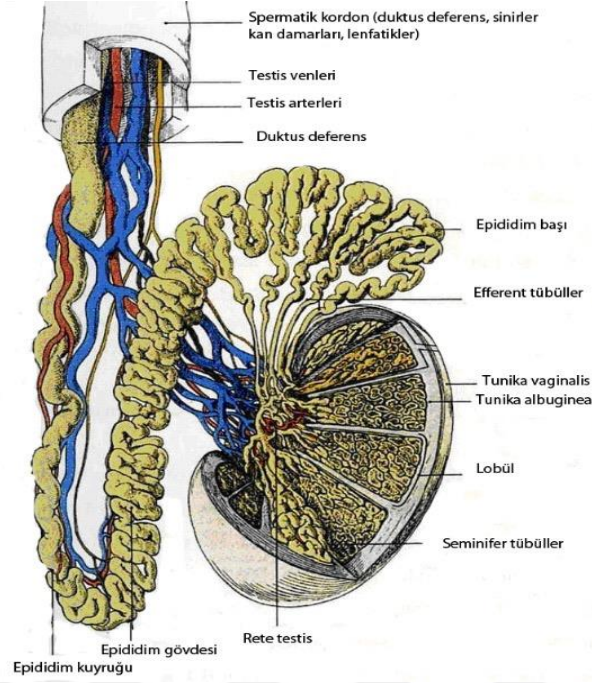


Şekil 1. Erkek üreme sistemi (18)

3.1.1 Testisler

Testisler, skrotum içinde yer alan, her biri yaklaşık 10-15 gram ağırlığında, oval yapıya sahip ve Tunika albuginea olarak adlandırılan bağ dokusu kapsülü ile çevrili çift organlardır. Tunika albuginea, testisin arka kısmında kalınlaşarak mediastinum testis yapısını oluştururken, fibröz uzantılar testis içine ilerleyerek lobüler bir düzen meydana getirir. Testislerde yaklaşık 250 civarında lobül bulunur ve her lobül,

kıvrımlı bir yapıya sahip, bağ dokusu ile çevrili 1 ila 4 seminifer tübül ile Leydig hücrelerini içermektedir (17).



Şekil 2. Testisin yapısı (21)

3.1.2 Seminifer Tübüller

Erkek üreme sisteminde, sperm hücrelerinin üretildiği seminifer tübüller, testislerin büyük bir kısmını meydana getirir. Çok katmanlı epitel ile çevrili olan bu tübüller, merkezlerinde bulunan bir lümene açılmaktadır. Her bir testiste, sayıları 250 ile 1000 arasında değişen seminifer tübüller yer almakta olup, bu tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metreyi bulmaktadır. Seminifer tübüller, uç kısımlarında daralarak tubuli rekti adı verilen yapıyı oluşturur. Tubuli rekti, epitel ile kaplı olup, ağsı ve boşluklu bir yapı sergileyen Rete testis ile bağlantılıdır. Rete testis, epididime ulaşmak amacıyla 10 ila 20 adet boşaltım kanalı içeren duktus efferentes aracılığıyla iletişim kurar.

Seminifer tübüllerin iç kısmındaki çok katmanlı epitel, Sertoli hücreleri ve spermatogonik hücre serisini barındırır. Sertoli hücreleri, spermatogenez sürecinde besleyici ve destekleyici bir işlev görürken, spermatogonik hücreler ise spermatogonia adı verilen kök hücrelerden olgun spermatozoaya dönüşen hücreleri içermektedir (18).

3.1.2.1 Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, ilk olarak Enrico Sertoli tarafından tanımlanmış olup, seminifer tübüllerin bazal laminasında prizmatik epitel hücreleri olarak yer alır. Seminifer epitelin yaklaşık %30'unu oluşturan bu hücreler, bazal laminaya bağlıdır ve lümene kadar uzanarak her biri 30 ila 50 arasında germ hücresinin gelişim sürecini destekler. Ergenlik sonrası bölünme yeteneklerini kaybeden Sertoli hücreleri, bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum (gER), Golgi kompleksi, lizozom ve mitokondri içerir. Oval ya da üçgen biçimli çekirdekleri belirgin bir yapıya sahiptir. Lateral uzantılarıyla birbirlerine bağlanan Sertoli hücreleri, aralarındaki germ hücrelerini izole eder ve destekler. Sertoli hücreleri sıkı bağlantılar yoluyla birleşerek kan-testis bariyerini oluşturur ve seminifer tübül duvarını bazal ile luminal olmak üzere iki farklı bölüme ayırır.

Bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve erken evredeki spermatositler yer alırken, spermatositlerin daha ileri aşamaları, spermatidler ve olgunlaşmış spermatozoalar luminal bölgede bulunur. Spermatositler, mayoz sürecinin ilerlemesiyle haploid hale geçerek lümene doğru ilerler. Kan-testis bariyerinin temel işlevi, gelişmekte olan spermatositleri bağışıklık sisteminin saldırısından koruyarak özel bir mikroçevre oluşturmaktır. Sertoli hücreleri arasındaki hücreler arası bağlantılar (gap junctions), iyon ve çeşitli kimyasal maddelerin hücreler arası geçişini sağlar. Aynı zamanda, izole edilen germ hücrelerinin beslenmesini ve hormonal düzenlenmesini Sertoli hücreleri üstlenir.

Spermatogenik hücreler, sitoplazmik köprülerle birbirine bağlanarak bir ağ yapısı oluştururken, Sertoli hücrelerinin sitoplazmik uzantılarıyla desteklenir. Bu hücreler tarafından salgılanan Androjen Bağlayıcı Protein (ABP), testosteron moleküllerini bağlayarak lümene ve epididime taşınmasını kolaylaştırır ve spermatogenez için gerekli olan yüksek testosteron seviyesinin korunmasına yardımcı olur. Ayrıca Sertoli hücreleri, İnhibin salgılayarak FSH salınımının düzenlenmesinde rol oynar. Bununla birlikte, sperm hücrelerinin seminifer tübüller içinde hareketini kolaylaştıran sıvıyı üretir ve spermatidlerin olgunlaşma sürecinde ortaya çıkan hücresel atıkları fagosite ederek temizleme görevini üstlenir.

3.1.2.2 Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, testis ve seminifer tübüller arasındaki interstisyel doku içerisinde yer alır. Bu yapı, fibroblastların yanı sıra lenf ve kan damarlarını içeren bağ dokusundan meydana gelir. Leydig hücreleri, büyük, yuvarlak veya çokgen şekilli olup, ergenlik dönemiyle birlikte olgunlaşmaya başlar. Eozinofilik sitoplazmalarında küçük lipid damlacıkları barındıran bu hücrelerin merkezi konumunda bir çekirdeği bulunur. Leydig hücreleri, ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimini sağlayan testosteron hormonunun üretiminden sorumludur.

Testosteron sentezi, hipotalamustan Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) salgılanmasının başladığı ergenlik sürecinde aktif hale gelir. Testosteron üretimi için gerekli olan enzimler, salgı yapan diğer hücrelerle benzer şekilde Leydig hücrelerinin granüllü endoplazmik retikulumu ve mitokondri kristallerinde bulunur. Yetişkin erkeklerde kandaki testosteron seviyesi 300-1200 ng/dl aralığında olup, intratestiküler bölgede bu değer biraz daha yüksektir. Testislerde en yüksek testosteron konsantrasyonu, bazal membran ve seminifer tübüller çevresinde bulunmaktadır (18,19).

3.1.3 Genital Kanallar

Testiste yer alan genital kanallar; tubuli rekti, rete testis ve duktuli efferentes olarak adlandırılır. Bu yapılar, seminifer tübüllerden gelen spermatozoa ile sıvıları duktus epididimise iletmekle görevlidir. Kıvrımlı bir yapıya sahip olan seminifer tübüller, tubuli rekti aracılığıyla rete testis ile bağlantı kurar. Rete testis, silindirik epitel hücreleri ile kaplı bir kanal ağı şeklinde yapılandırılmıştır. Rete testisten ayrılan yaklaşık 10 ila 20 duktuli efferentes kanalı, spermilerin epididime doğru hareket etmesini sağlar. Ayrıca, seminifer tübüllerde üretilen sıvının büyük bir kısmının geri emilimi duktuli efferentes içinde gerçekleşir (20).

Sperm hücrelerini testislerden penise yönlendiren kanallar ise epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve üretra olarak sıralanır. Epididimis, sperm hücrelerinin olgunlaşması ve depolanması açısından kritik bir yapıdır. Buradan geçen sperm hücreleri, duktus deferens yoluyla ilerler. Duktus deferens, spermileri epididimisten üretraya taşıırken, üretra ise spermin penisten dışarı atıldığı son kanaldır. Bu

kanalların uyum içinde çalışması, spermilerin etkili bir şekilde taşınmasını ve ejakülasyon sırasında vücuttan atılmasını sağlar.

3.1.3.1 Epididimis

Epididimis, testislerin arka üst bölümünde yer alan, ay şeklinde ve yaklaşık 5-6 cm uzunluğunda bir yapıdır. Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç ana bölüme ayrılır. Baş kısmı duktuli efferentesten, gövde ve kuyruk bölümleri ise duktus epididimisten oluşur. Spermatozoanın hareket yeteneği kazanarak döllenme kapasitesine ulaştığı bölge duktus epididimis olarak bilinir.

Duktus epididimis içerisinde bulunan temel hücreler, glikoprotein, glikofosfokolin ve siyalik asit salgılamakla birlikte, Sertoli hücreleri tarafından yok edilemeyen rezidüel cisimleri ve fazla sıvıyı da emer. Epididimisin baş ve gövde kısımlarındaki düz kasların peristaltik kasılmaları, sperm hücrelerini ileri doğru hareket ettirir. Güçlü kasılmalar sonucunda, olgunlaşmış sperm hücreleri vas deferense taşınır (18,21).

3.1.3.2 Vas deferens

Vas deferens, epididimis ile üretra arasında yer alan, kalın kas tabakasına sahip ve çok katmanlı prizmatik epitel ile kaplı bir kanaldır. Bu kas yapısının peristaltik kasılmaları, ejakülasyon esnasında spermilerin hızla taşınmasına yardımcı olur. Vas deferensin ampulla bölümü, veziküla seminalis ile birleşerek, prostat bezi içinde duktus ejakulatorius adıyla üretraya doğru ilerler (19,22).

3.1.4 Aksesuar Bezler

Aksesuar bezler, seminal veziküllerden, prostat bezinden ve bulboüretral (Cowper) bezlerden oluşur. Bu bezler, semenin sıvı içeriğini salgılar.

3.1.4.1 Seminal Vezikül (Veziküla Seminalis)

Seminal veziküller çift halinde bulunur ve boşaltım kanalları, duktus deferensin ampulla bölümüyle birleşerek ejakülatuar kanalı oluşturur. Seminal veziküllerin duvarı; mukozal tabaka, ince düz kas tabakası ve fibröz kılıf olmak üzere üç katmandan meydana gelir. Mukozal tabaka, yüzey alanını artırmak ve salgının lümenine akışını kolaylaştırmak amacıyla çok sayıda kıvrımlar oluşturur. Beyazımsı sarı renkte ve visköz yapıda olan bu salgı, prostaglandinler, aminoasitler, basit

şekerler, fruktoz ve askorbik asit gibi bileşenler içerir. Fruktoz, metabolize edilerek sperm hareketi için gerekli olan enerjiyi sağlar. Düz kasların kasılmasıyla birlikte salgı, üretraya yönlendirilerek dışarı atılır.

3.1.4.2 Prostat Bezi

Mesanein hemen altında, rektumun ön kısmında yer alan ve üretrayı çevreleyen, ceviz büyüklüğünde bir bezdir. Yaklaşık 30-50 tübüloalveolar bezden oluşan bu yapı, hafif alkali özellikte bir sıvı salgılar. Prostat bezi, mukozal tabaka, submukozal tabaka ve periferik tabakada bulunan prostatik bezlerden meydana gelir. Epitel hücreleri, prostat spesifik antijen (PSA), prostatik asit fosfataz, fibrinolizin ve sitrik asit enzimlerinin salgılanmasını gerçekleştirir. Fibrinolizin, ejakülasyon sonrası semen sıvısının likefiye olmasını sağlar.

3.1.4.3 Bulboüretal (Cowper) Bezleri

Bulbouretral bezler, salgı üretme işlevine sahip, bezelye boyutunda ve tübüloalveolar yapıda bulunan bir çift bezdir. Bu bezler, bağ dokusundan meydana gelen fibroelastik kapsül ile interlobüler bağ doku septumunda düz kas ve iskelet kası liflerini barındırır. Asiner veya tübüler salgı ünitelerine sahiptir. Salgı hücreleri genellikle silindirik, küboidal veya yassı epitelden oluşur. Küçük salgı kanalları sekretuar hücrelerle kaplıyken, daha büyük kanallar tabakalı silindirik epitel ile çevrilidir. Bu bezlerin salgıladığı mukus benzeri preseminal sıvı, laktoz, galaktozamin, galakturonik asit, sialik asit ve metil pentoz gibi bileşenler içerir. Şeffaf renkte olup kayganlaştırıcı özelliğe sahip bir sıvıdır (22).

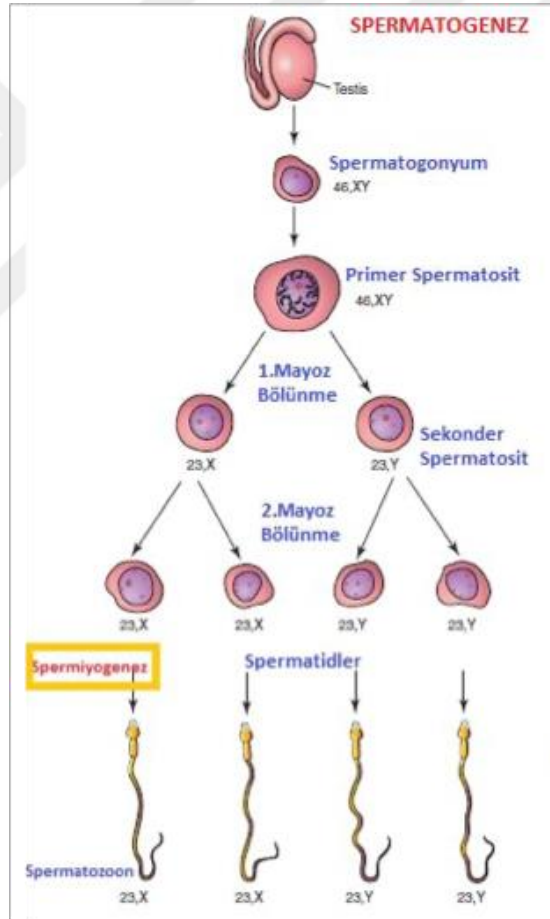
3.1.5 Penis

Penis, dış yüzeyi deriyle kaplı olup, iki ana erektile doku tabakasından meydana gelir. Bunlardan ilki, dorsal bölgede bulunan iki adet korpus kavernozum, diğeri ise ventral tarafta yer alan korpus spongiozumdur. Korpus kavernozum, endotel hücreleriyle çevrili olup, düz kas hücreleri ve bağ doku liflerini içerir. Üretrayı saran korpus spongiozum ise penisin uç kısmında genişleyerek, çok katmanlı yassı epitel hücrelerinden oluşan glans penisi oluşturur. Penil üretranın büyük bir bölümü çok katmanlı silindirik epitel ile kaplanmıştır.

Ereksiyon, penisteki vasküler boşlukların çevresindeki düz kasların ve arteriyel kas dokusunun uyarılması sonucu ortaya çıkar. Parasempatik sinirlerin gönderdiği uyarılar, vazodilatasyona yol açarak kavernoöz boşlukların ve penil arterlerin genişlemesini sağlar. Bu genişleme, kan akışının artmasına neden olur ve boşluklar kanla dolarak ereksiyon meydana gelir. Korpus kavernozumun kasılma ve gevşeme sürecinde hücre içi cGMP ve Ca^{+2} seviyeleri kritik bir rol oynar (19).

3.2 Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücrelerin mitoz ve mayoz bölünmelerden geçerek spermatozoon olarak adlandırılan olgun sperm hücrelerini oluşturduğu biyolojik süreçtir.



Şekil 3. Spermatogenez (25)

3.2.1 Spermatogonyal Evre

Seminifer tübüllerin bazal lamina tabakasının hemen üzerinde, çapı yaklaşık 12 μm olan spermatogonyum hücreleri bulunur. Puberte öncesinde hipofizden salgılanan

gonadotropinler, bu hücrelerin mitoz bölünme yoluyla çoğalmasını sağlar. Oluşan yeni hücreler ya bölünmeye devam ederek A tipi spermatogonyumları meydana getirir ya da mitoz sürecinin tamamlanmasının ardından farklılaşarak B tipi spermatogonyumlara dönüşür.

İnsanlarda iki farklı A tipi spermatogonyal kök hücre bulunmaktadır: Tip A koyu ve Tip A açık. Tip A koyu spermatogonyumlar, seminifer tübüllerin kök hücreleri olup, oval şekilli çekirdeğe ve bazofilik yapıya sahiptir; bu hücreler bölünerek Tip A açık spermatogonyumları oluşturur. Tip A açık spermatogonyumlar ise soluk boyanan çekirdeklere ve bol miktarda ribozoma sahiptir. Bu hücreler mitoz bölünme ile aynı tip hücreleri üretmeye devam edebilir veya kromatin yapısı yoğun ve çekirdeği yuvarlak olan B tipi spermatogonyumları meydana getirebilir. B tipi spermatogonyumlar ise primer spermatositlere dönüşerek spermatogenez sürecinin bir sonraki aşamasına ilerleyen öncül hücrelerdir (18,23).

3.2.2 Spermatosit (Mayoz) Evresi

Primer spermatositler, birinci mayoz bölünme başlamadan önce DNA replikasyonunu gerçekleştirerek 46 kromozom (44+XY) ve 4n DNA içeriğine ulaşır. Bu hücreler, spermatogenez sürecinin en büyük hücreleri olarak kabul edilir. Birinci mayoz bölünme tamamlandığında, haploid kromozom sayısına (22+X veya 22+Y) ve 2n DNA miktarına sahip sekonder spermatositler meydana gelir. Sekonder spermatositler, interfaz evresinde çok kısa bir süre kaldıktan sonra ikinci mayoz bölünmeye girerek haploid spermatidlere dönüşür (24).

3.2.3 Spermiyogenez

Spermiyogenezis, spermatogenez sürecinin son aşamasını oluşturur ve erkek DNA'sının oosite aktarılmasını sağlayan özelleşmiş hücreler olan spermatozoalara dönüşümünü ifade eder. Bu süreç boyunca hücre bölünmesi gerçekleşmeden, haploid spermatidler yaklaşık 7-8 µm çapında olup seminifer tübül lümenine yakın bölgede konumlanır. Spermiyogenezis; akrozom gelişimi, çekirdeğin yoğunlaşp uzaması, flagellum oluşumu ve sitoplazmanın büyük bir kısmının kaybedilmesi gibi önemli aşamaları içerir (25). Olgun sperm hücresi, Sertoli hücre yüzeyinden ayrılarak tübül lümenine doğru ilerler.

Spermiyogenezis süreci dört temel aşamada incelenmektedir;

Golgi Evresi: Bu aşamada, spermatid sitoplazmasında çekirdeğe yakın bölgede belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriol, endoplazmik retikulum ve serbest ribozomlar bulunur. Golgi kompleksinden kaynaklanan küçük proakrozomal veziküller birleşerek, çekirdeğin bir ucuna yakın konumda tek katmanlı bir zar ile çevrili akrozomal başlığı oluşturur. Sentriyoller, akrozomal başlığa en uzak noktaya doğru hareket eder ve bunlardan biri bazal cisimciğe dönüşür. Bu yapı, silyum ile benzer özellikler gösteren bir yapı oluşturarak flagella aksonemini meydana getirir (26).

Kep Evresi: Bu süreçte, akrozom yoğunlaşan çekirdeğin yarısını kapsayacak şekilde genişler. Akrozom içerisinde hiyaluronidaz, nöroaminidaz ve akrozin gibi hidrolitik enzimler bulunur. Bu enzimler, spermatozoa oosit ile temas ettiğinde salgılanarak, akrozomal dış zarın sperm hücre zarı ile birleşmesini sağlar. Enzimlerin etkisiyle, oositi çevreleyen corona radiata hücreleri birbirinden ayrılır ve zona pellusida tabakası parçalanır. Bu olay, döllenmenin ilk aşamalarından biri olan akrozomal reaksiyon olarak adlandırılır (25).

Akrozom Evresi: Bu evrede, gelişen spermin akrozomu, yoğunlaşmış çekirdeğe sahip başı ile Sertoli hücresinin apikal sitoplazmasında gömülü halde bulunur. Aynı zamanda gelişen aksonem, seminifer tübül lümenine doğru uzanarak hücre çekirdeğinin yoğunlaşmasını ve uzamasını sağlar. Bu süreçte, nükleozomlarda bulunan histon proteinleri, küçük bazik peptidler olan protaminlerle yer değiştirir. Flagellumun kuyruk yapısı gelişimini sürdürürken, proksimal bölgede iyonların birikmesiyle oluşan orta parçada, flagellum hareketi için gerekli ATP üretilir (26).

Matürasyon (Olgunlaşma) Evresi: Spermiyogenezisin olgunlaşma aşamasında, geç dönem spermatitlerden geriye kalan sitoplazma ve hücreler arası bağlantılar ortadan kaldırılır. Olgunlaşan sperm hücresi tübül lümenine bırakılır ancak bu aşamada henüz tam olarak işlevsel değildir.

Olgunlaşma sürecini tamamlayan sperm, seminifer tübüllerden ayrıldıktan sonra testis sıvısı ile birleşerek kaput epididimise ulaşır. Burada testis sıvısı ve proteinler spermlerden uzaklaştırılır. Spermler, korpus epididimise geçiş yaparken işlevsel hale gelir ve hareket yetisi ile döllenme kapasitesi kazanmaya başlar. Epididim içinde ilerledikçe gelişimleri devam eder ve ejakülasyondan hemen önce depo edildikleri kauda epididimise ulaştıklarında maksimum olgunluk seviyesine erişirler. İnsanlarda

bu sürecin genellikle 2 ila 6 gün arasında tamamlandığı gözlemlenmiştir. Spermin uzun süreli depolanması ve hareket yeteneğini sürdürebilmesi için, düşük sıcaklık, androjen hormonuna bağlı çevresel faktörler ve epididim içindeki spesifik moleküler bileşenlerin varlığı büyük önem taşımaktadır (25).

3.2.4 Sperm Kapasitasyonu ve Akrozom Reaksiyonu

Spermatogenez süreci tamamlandıktan sonra, seminifer tübüllerin lümenine geçen sperm hücreleri, kontraktil yapılar yardımıyla epididime taşınarak burada depolanır. Epididimde hareket yeteneğini kazanan spermatozoalar, yaklaşık yedi saat süren kapasitasyon süreci sonrasında oositi dölleyebilme kapasitesine ulaşır (24).

Kapasitasyon, spermin dölleme yeteneğini kazanabilmesi için dişi üreme kanallarında gerçekleşen önemli bir biyokimyasal süreç olup, insanlarda yaklaşık yedi saat sürmektedir. Bu sürecin büyük bir kısmı fallop tüplerinde meydana gelir (27). Serin-treonin fosforilasyonunun kapasitasyondaki rolü tam olarak aydınlatılamamış olsa da tirozin fosforilasyonunun artışı ile kapasitasyon süreci arasında belirgin bir ilişki olduğu bilinmektedir. Ayrıca, kapasitasyon sürecinin, spermin kolesterol kaybı ile bağlantılı olduğu ve prolin tarafından düzenlenen fosforilasyon artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Prolin kontrollü fosforilasyon, hücresel çoğalma ve farklılaşma gibi birçok biyolojik sürecin önemli düzenleyicilerinden biridir (28).

Kapasitasyon sırasında, endometriyal hücreler tarafından salgılanan interlökin-6 (IL-6), spermin dölleme kapasitesini artırarak süreci olumlu yönde etkiler. IL-6'nın bu etkisinin, büyük ölçüde spermde bulunan IL-6R α reseptörüne bağlanması yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (29). Erkek ve dişi üreme kanallarında bulunan bazı kapasitasyon önleyici faktörler, spermin erken kapasitasyon yetisi kazanmasını engeller. Bu faktörler, kapasitasyon sürecinde sperm hücresinden uzaklaştırılır ve sperm ampullaya ulaştığında tam anlamıyla dölleme yeteneğine sahip hale gelir (30). Kolesterol, sperm hareketliliğini baskılayarak kapasitasyon sürecinin başlamasını geciktirir. Bu nedenle, kapasitasyonun başlatılmasında en önemli faktörlerden biri, sperm membranındaki kolesterolün bağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır (30,31).

Kapasitasyon süreci, kalsiyum, kinaz, cAMP, G-protein ve redoks mekanizmalarına bağılı olarak gerçekleşen biyokimyasal değişimlerden oluşur ve spermin zona pellusida ile etkileşime girmesi için gereklidir. Bu süreçte, ortamda kalsiyum, bikarbonat, serum albumin, glikoz ve enerji kaynaklarının bulunması gereklidir. Kapasitasyonda, cAMP ikinci mesajcı olarak kritik bir rol oynar. cAMP seviyesindeki artış, protein kinaz A (PKA) aktivasyonunu tetikler ve bu enzim, kapasitasyon sürecini düzenleyen temel mekanizmalardan biridir. PKA aktivitesinin inhibe edilmesi, kapasitasyon sürecini engeller (30,32).

Kapasitasyon sırasında meydana gelen bir diğer önemli biyokimyasal değişiklik, tirozin fosforilasyonundaki artıştır. cAMP, bu fosforilasyonda önemli bir enzim olarak görev yapar. cAMP-bağımlı sinyal iletimi ve reaktif oksijen türleri (ROS), tirozin fosforilasyon sürecini başlatır (33,34). Ayrıca, kapasitasyon sürecinde hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) seviyesinde artış gözlemlenir (30,33). Tirozin ile fosforile edilen proteinler, insan sperminde ZP3 için reseptör işlevi görür. Bu proteinler akrozomda bulunur ve tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Zona pellusida ile etkileşime giren bu proteinler, tirozin kinaz aktivasyonunu başlatır ve fosfotirozin oluşumuna neden olur (35). Sperm hücresinde bulunan AKAP (A-kinase anchor protein), kinaz aktivitesi göstererek zona pellusida proteinleri için bir reseptör işlevi görür (30,34).

Sperm, dişi üreme kanalındaki epitel hücreleriyle etkileşime girdiğinde, spermin akrozomal bölgesini kaplayan plazma membranındaki glikoprotein tabaka ve seminal plazma proteinleri ortadan kaldırılır. Bu değişiklikler, kapasitasyonunu tamamlayan sperm hücresinin korona radiata hücreleri arasından geçerek akrozom reaksiyonuna girmesine olanak sağlar (27).

Akrozom reaksiyonu; zona pellusidanın oosit ve folikül hücreleri arasındaki ilişkileri düzenlemesinin yanı sıra, gelişim sürecinde oositleri, yumurtaları ve embriyoları koruma görevini üstlenir. Zona pellusida, ayrıca ovulasyonla serbest bırakılan yumurta ve sperm arasındaki etkileşimi düzenleyerek döllenme sürecinde kritik bir rol oynar. Zona pellusidası bulunmayan dişilerde infertilite gözlemlenmektedir. Fertilizasyon sürecinde, zona pellusidanın işlevleri, üzerindeki glikoproteinler aracılığıyla yürütülür (36).

Bu glikoproteinler, post-translasyonel modifikasyonlarla heterojenlik gösteren ZP1, ZP2 ve ZP3'tür (37). Bu moleküller, sperm hücresi için reseptör görevi görür. ZP3,

sperm reseptörü olarak işlev görerek fertilizasyon sürecinin ilk aşamasında anahtar rol oynar. Sperm hücresinin oosite bağlanmasının ardından, ZP3 akrozom reaksiyonunu tetikler (38). Akrozom reaksiyonu tamamlandıktan sonra, ZP2 sekonder sperm reseptörü olarak işlev görerek spermin bağlanmasını sağlar (37,39). Spermin baş kısmının yaklaşık üçte ikisini kaplayan akrozom, akrozin ve hyaluronidaz gibi enzimler içerir. Kapasitasyonunu tamamlayan sperm, zona pellusidayı geçebilmek için akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmek zorundadır. Sperm, zona pellusidaya bağlandığında, baş kısmında bulunan spesifik reseptörler aktive olur ve ekzositoz süreci başlar. Bu aşamada, sperm plazma membranı ile dış akrozomal membran birleşerek akrozom içeriğinin serbest kalmasını sağlar. Akrozom reaksiyonunu gerçekleştiremeyen sperm, zona pellusida veya oolemma ile bağlanamaz (40).

Fosfoinozitol-3 kinaz (phosphoinositide 3-kinase-PI 3-kinase), somatik hücrelerde hem reseptör tirozin kinazlar (RTK) hem de G-proteinleri ile etkileşime girerek aktive olur. İnsan sperminde, akrozom reaksiyonu sırasında G-proteinler, RTK, inozitol fosfolipidler ve fosfoinozitol 3-kinazın önemli roller üstlendiği gösterilmiştir. Ayrıca, fosfoinozitol 3-kinazın spesifik inhibitörlerinden biri olan Wortmannin'in, insan sperm akrozom reaksiyonunu büyük ölçüde engellediği tespit edilmiştir (41).

Spermin yumurta ile kaynaşmasını mümkün kılan akrozom reaksiyonu, akrozomal veziküllerin ekzositozunu ve akrozomal aktinin polimerizasyonunu içerir. Deniz kestaneleriyle yapılan çalışmalarda, yumurta jelinde bulunan fukoz sülfat polimerinin (FSP), Ca^{2+} 'un iki farklı kanal yoluyla hücre içine girmesini teşvik ettiği ve akrozom reaksiyonunun tamamlanmasına katkı sağladığı belirlenmiştir. Bu kanallardan biri, depo kontrollü (store-operated) bir kanal olup, akrozomal vezikül ekzositozunun başlamasına neden olur (42).

Akrozom reaksiyonu sırasında, tripsin benzeri enzimler ve akrozin salgılanarak zona pellusida geçirgen hale gelir (27). Akrozom reaksiyonunu tamamlayan sperm, zona pellusidayı geçebilir (43). Ayrıca, spermin akrozomunda bulunan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), fertilizasyon sürecinde akrozom reaksiyonunun tetiklenmesine katkıda bulunur (44).

3.2.5 Olgun (Matür) Sperm

Sperm hücresi, baş ve kuyruk olmak üzere iki ana bölümden meydana gelir. Toplam uzunluğu yaklaşık 60 µm olan sperm hücresinin baş kısmı, yaklaşık 4-5 µm uzunluğunda ve 3 µm genişliğindedir. Baş bölgesi, genetik bilgiyi içeren çekirdeği barındırırken, kuyruk (flagellum) spermin hareket yeteneğini sağlar. Bu yapı, spermin yumurta hücresine ulaşarak döllenme sürecini gerçekleştirmesi açısından kritik bir rol oynar.



Şekil 4. Olgun bir sperm yapısı (45).

3.2.5.1 Baş Yapısı

Bir sperm hücresinin baş kısmının büyük bir bölümünü, babadan gelen genetik bilgiyi içeren yoğunlaştırılmış bir çekirdek oluşturur. Çekirdeğin ön yüzeyi, hidrolitik enzimler içeren akrozom adı verilen bir yapı ile çevrilidir. Golgi aygıtı kökenli olan akrozom, spermin yumurta hücresini döllemesine yardımcı olur. Akrozomda bulunan başlıca enzimler arasında akrozin ve hyaluronidaz yer alır. Bu enzimler, oositin dış katmanlarını parçalayarak spermin yumurta hücresine ulaşmasını sağlar. Bunun yanı sıra, akrozomda asit fosfataz, aril sülfataz, kollajenaz, fosfolipaz C, β-galaktozidaz ve nöraminidaz gibi çeşitli enzimler de bulunur. Bu enzimler, fertilizasyon sürecinde, sperm akrozom zarı ile oosit plazma membranının birleşmesi sırasında serbest hale gelerek döllenmeye katkıda bulunur (46).

3.2.5.2 Kuyruk Yapısı

İnsan spermlerinin kuyruk kısmı, dört temel bölüme ayrılır: boyun, orta parça, esas parça ve son parça.

Boyun bölgesi; sperm başı ile kuyruğu arasındaki bağlantıyı sağlar. Proksimal sentriyolden oluşan bu yapı, yoğun fibröz bileşenler içerir. Bu özellik, spermin hareketi sırasında boyun kısmının esnek şekilde bükülmesine olanak tanıyarak hareket kabiliyetini artırır.

Orta parça; yaklaşık 7 μm uzunluğundadır ve mitokondrilerin helikal dizilim halinde bulunduğu bölgedir. Bu mitokondriler, spermin kuyruk hareketi için gereken enerjiyi üretmekle sorumludur (18).

Esas parça; spermin en uzun bölümü olup yaklaşık 40 μm uzunluğunda ve 0,5 μm çapındadır. İç yapısı dört katmandan meydana gelir: aksonem, kalın dış fibriller, fibröz kılıf ve plazma membranı. Aksonem, spermin kuyruk hareketini sağlayan temel yapıyı oluşturur. Dynein kolları, ATP enerjisini mekanik harekete çevirerek spermin ileri hareketini sağlar. Dış fibröz kılıf sayesinde oldukça sağlam bir yapı sunarak spermin hareket yeteneğini destekler (47,48).

Son parça; fibröz kılıfın distal ucundan başlayan yaklaşık 5 μm uzunluğundaki bölgedir. Bu kısımda mikrotübüller giderek azalarak sona erer. Dynein kollarının kaybolmasıyla birlikte merkezi mikrotübüller de yok olur ve kuyruk ucuna doğru tamamen kaybolur (18).

3.3 Semen Yapısı

Semen (meni), hipotalamo-testiküler aksın kontrolünde testislerin fonksiyonu ile posttestiküler boşaltım kanalları ve yardımcı bezlerin salgılarından oluşan nihai bir üründür (49). Semen hacminin yaklaşık %90'ı, ağırlıklı olarak prostat bezi, seminal veziküller ve epididimis tarafından üretilen salgılardan meydana gelir (50).

Bu bezlerin salgıladığı sıvılar, spermelerin korunmasını ve taşınmasını sağlarken, aynı zamanda döllenme için uygun bir mikroçevre oluşturur.

3.3.1 Semen Analizi

Semen kalitesi; cinsel perhiz süresi, sıcaklık değişimleri, günün farklı saatleri, mevsimsel faktörler, duygusal durum, çalışma koşulları ve örneğin alındığı ortam ile yöntemle bağlı olarak farklılık gösterebilir. Bu nedenle, güvenilir sonuçlara ulaşabilmek için semen analizi 3-4 hafta arayla en az iki kez tekrarlanmalı ve sperm parametrelerinde %20'den fazla değişim gözlemlenirse analiz yeniden yapılmalıdır (49).

Semen, öncelikli olarak hacim, renk, pH, likefaksiyon (semenin çözünmesi) ve viskozite gibi fiziksel özellikler açısından Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO-2021) kriterlerine göre değerlendirilir (Tablo 1). Bu kriterlere göre normal bir semen örneği homojen yapıda ve gri-opalesan görünümde ve hacmi en az 1,4 ml olmalıdır (50). Sperm konsantrasyonu düşük olduğunda, semen daha az opak görünebilir ve belirli durumlara bağlı olarak rengi değişebilir. Örneğin, eritrositlerin varlığında kırmızı-kahverengi, ikterli hastalarda veya belirli ilaçlar ve vitaminlerin kullanımında ise sarı renkte olabilir. Semen normal pH seviyesi en az 7,2 olmalıdır.

Ejakülasyonun ardından, seminal veziküllerden salgılanan protein kinaz enzimi, semeni koagüle eder. Bu pıhtılaşmış semen, prostat salgılarının etkisiyle 15-20 dakika içinde çözünmelidir. Likefaksiyon sürecinin tamamlanması için maksimum süre 1 saat olarak kabul edilir. Viskozite değerlendirmesi, numuneye bir cam çubuk batırılıp çıkarılarak oluşan iplikçik ölçülerek yapılır. Oluşan iplikçiğin uzunluğu 2 cm'yi aşmamalıdır (50).

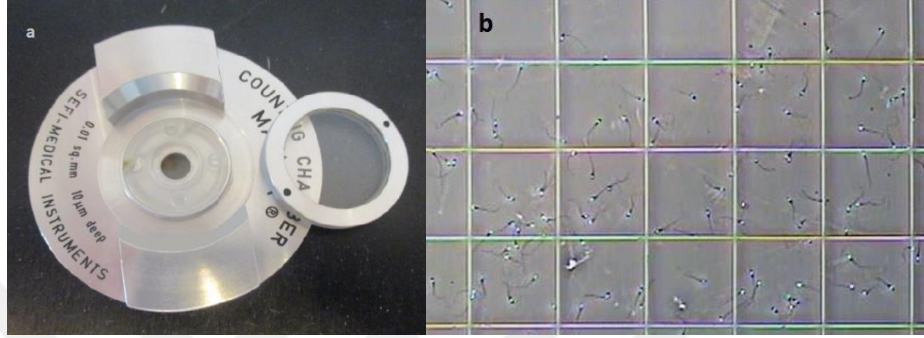
Tablo 1. Normal semen parametreleri (WHO-2021).

Parametre	En Düşük Referans Değer
Volüm (ml)	1,4
pH	>7,2
Total sperm sayısı (milyon/ejakulat)	39
Konsantrasyon (milyon/ml)	16
Total motilite (%)	42
Progresif motilite (%)	30
Nonprogresif motilite (%)	1
İmmotilite (%)	20
Canlılık (%)	54
Morfoloji (%)	>4

Semen analizinde mikroskopik inceleme, öncelikli olarak 100x büyütme altında gerçekleştirilir. Bu aşamada, semen örneğinde mukus iplikçiklerinin varlığı, sperm agregasyonu ya da aglütinasyon gibi olası durumlar değerlendirilir. Ayrıca, spermatozoa haricindeki hücreler incelenerek epitel hücreleri, lökositler, olgunlaşmamış germ hücreleri ile izole halde bulunan sperm başları veya kuyruklarının varlığı tespit edilir.

3.3.1.1 Sperm Sayısı ve Hareketliliği

Likefiye olmuş semen örneğinde, sperm sayısı ve hareketliliğini tespit etmek amacıyla Makler sayım kamerası veya Neubauer hemositometresi tercih edilmektedir. 200x veya 400x büyütme seviyelerinde gerçekleştirilen incelemelerde, sperm konsantrasyonu belirlenirken aynı anda sperm motilitesi de analiz edilmektedir (50).



Şekil 5. a).Makler sayım kamerası b).Mikroskop görüntüsü

Sperm hareketliliği (motilite) şu şekilde derecelendirilir:

- İleri hareketli sperm (Progresif Motilite; PR): Hızdan bağımsız olarak doğrusal ya da geniş daireler içinde aktif hareket eder.
- Yerde hareketli sperm (Nonprogresif Motilite; NP): Sperm, küçük daireler halinde yüzme, başı sabit tutarak kuyruğunu hareket ettirme gibi yerinde hareketler sergiler.
- Hareketsiz sperm (İmmotilite; IM): Sperm hiçbir hareket göstermez.

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, sperm hareketlilik sınıflandırması Tablo 2'de belirtildiği gibidir.

Tablo 2. Sperm hareketliliğinin sınıflandırması (WHO-2021)

Hızlı ileri hareketli sperm	(+4)
Yavaş ileri hareketli sperm	(+3)
Yerde hareketli sperm	(+2)
Hareketsiz (immotil) sperm	(+1)

3.3.1.2 Sperm Canlılığı

Semen analizinde hareketsiz spermlerin oranı önemli bir kriterdir, ancak tüm hareketsiz spermler ölü değildir. Bu nedenle, spermin canlılığını (vitalitesini) değerlendirmek için çeşitli testler uygulanmaktadır. Vitalite tespiti, eozin, eozin-

nigrozin ve tripan mavisi gibi supravital boyalar veya hipoozmotik şişme testi (HOS) kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Ölü sperm hücreleri zar bütünlüklerini kaybettikleri için supravital boyaları içlerine alır ve böylece boyanarak ölü oldukları belirlenir. Hipoozmotik şişme testi ise sperm zarının bütünlüğünü değerlendiren önemli bir canlılık analizidir. Bu test, yalnızca zar yapısı sağlam (canlı) olan hücrelerin hipotonik çözeltilerde şişmesi prensibine dayanır. Canlı hücreler bu ortamda şişerek kuyruk bölgelerinde karakteristik kıvrımlar oluşturur (50).

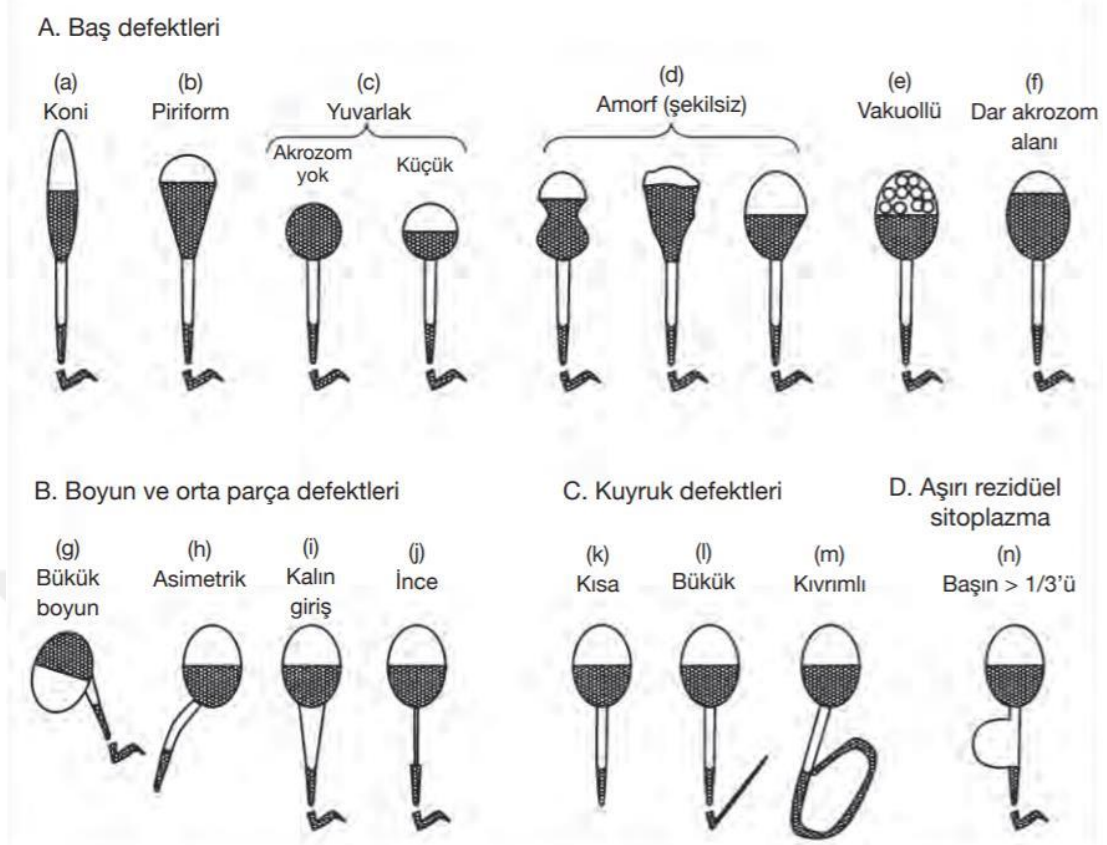
3.3.1.3 Sperm Morfolojisi

Morfolojik incelemeler için genellikle Giemsa, Papanicolaou, Bryan Leishman ve Shorr gibi boyama yöntemleri ile Diff-Quick ve Spermac Stain gibi ticari kitler kullanılmaktadır. Bu boyama teknikleri, sperm hücrelerinin yapısal özelliklerini daha belirgin hale getirerek değerlendirme sürecine katkıda bulunur.

Sperm morfolojisi, Kruger Kriterleri ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarına göre değerlendirilir. Bu kriterlere göre, sperm başının düzgün konturlu ve oval bir yapıya sahip olması beklenir. Akrozom bölgesi, başın %40 ila %70'ini kaplamalıdır ve büyük vakuoller veya iki ya da daha fazla küçük vakuol içermemelidir. Vakuollerin kapladığı alan, baş hacminin %20'sini aşmamalıdır ve postakrozomal bölgede vakuol bulunmamalıdır. Orta parça, ince, düzgün sınırlara sahip olmalı ve baş uzunluğuna yakın bir ölçüde olmalıdır. Ayrıca, orta parçanın eksen, baş eksenine aynı hizada bulunmalıdır. Eğer orta bölümdeki artık sitoplazma, baş hacminin üçte birinden fazla alanı kaplıyorsa, bu durum anormal kabul edilir.

Kuyruk yapısı boyunca genişlik sabit olmalı, orta parçadan daha ince bir formda olup yaklaşık 45 µm uzunluğunda (baş uzunluğunun yaklaşık 10 katı) olmalıdır. Kuyruk, keskin bir açı oluşturmadan geriye doğru kıvrılabilir. Ayrıca, rezidüel sitoplazma oranı sperm başının üçte birini aşmamalıdır (50).

Bu standartlara uymayan sperm hücreleri, anormal morfolojili spermiler olarak kabul edilir. Bu tür yapısal bozukluklar, spermin döllenme yetisini azaltarak embriyo gelişimi ve olgunlaşma süreçlerinde aksamalara yol açabilir.



Şekil 6. Anormal morfolojiye sahip sperm formları (WHO-2021)

Anormal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde, genetik materyalde bozukluklar da görülebilir. Bu tür spermler, anormal DNA içeriği taşıyabilir. Morfolojik anomalilerin nedenleri arasında artmış DNA fragmentasyonu, kromozomal yapısal bozukluklar ve anomaliler, anöplöidi oranındaki artış ve immatür kromatin yapısı yer almaktadır.

3.4 Sperm DNA Fragmentasyonu (DNA Hasarı)

Spermin temel fonksiyonu, babadan gelen genetik bilgiyi yumurtaya iletmektir. Ancak, spermatozoanın taşıdığı 23 kromozomun DNA yapısında meydana gelebilecek olası genetik bozulmaların nedenleri ve mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Morfolojik olarak normal görünüme ve ideal hareket kabiliyetine sahip spermler dahi DNA hasarı içerebilir. DNA fragmentasyonu, sperm DNA'sında oluşan yapısal bozukluklar ve genomik istikrarsızlık nedeniyle ortaya çıkar ve infertil erkeklerin ejakülatında sıklıkla tek ve çift zincirli DNA kırıkları ile karakterizedir.

Sperm kromatin anomalileri arasında en sık karşılaşılanlar; tek veya çift sarmal DNA kırıkları, histonların protaminlere dönüşümündeki bozuklukların yol açtığı DNA paketlenme kusurları ve kromatin yapısındaki tersiyer konfigürasyon değişiklikleridir (51).

Sperm DNA fragmantasyonu ve kromatin bütünlüğündeki bozulmaya neden olan birçok farklı etiyolojik faktör bulunmaktadır. Bu faktörler geniş bir yelpazeye sahiptir ve sigara tüketimi (52), radyasyon maruziyeti (53) ve kemoterapi (54) gibi çevresel etkenlerden; lökospermi (55), varikosel (56) ve kanser gibi patofizyolojik durumlardan kaynaklanabilir (57). Ayrıca, sperm dondurma gibi bazı tıbbi müdahalelerin bile sperm DNA hasarı ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (58).

Sperm DNA hasarı ve kromatin anomalilerine neden olan moleküler mekanizmalar tam olarak netleştirilememiş olsa da, dört ana başlık altında sınıflandırılabilir:

1. Kromatin paketlenme anomalileri
2. Apoptozis
3. Oksidatif stres veya radyasyona bağlı DNA zinciri kırıkları
4. Kromozomal hasarlar

3.4.1 Kromatin Paketlenme Anomalileri

Spermatogenez sırasında kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi sürecinde, histonların protaminlerle yer değiştirmesi hayati bir aşamadır. Bu dönüşüm esnasında, histonların hiperasetilasyonu kromatini daha açık hale getirirken, DNA topoizomeraz II (Topo II) enzimi, süpersarmal yapı nedeniyle oluşan burulma stresini azaltmak amacıyla sperm DNA'sında geçici kesikler oluşturur. Normal şartlarda, bu kırılmalar spermatogenez süreci ve ejakülasyon öncesinde Topo II enzimi tarafından onarılır. Ancak, eğer onarım mekanizması eksik ya da yetersiz kalırsa, ejakülatta DNA hasarı içeren spermiler bulunabilir (59).

3.4.2 Apoptozis

Sperm DNA hasarının bir diğer sebebi, tamamlanmamış veya eksik kalan apoptoz sürecidir. Testislerde, germ hücrelerinin aşırı çoğalmasını dengelemek ve hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak amacıyla apoptoz mekanizması devreye girer (60). Bu süreç, Sertoli hücreleri tarafından salgılanan Fas ligandı (FasL) ile germ hücrelerinin yüzeyindeki Fas reseptörlerinin etkileşimi sonucu tetiklenir. Semen parametreleri

düşük olan erkeklerde Fas ekspresyon seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum, bazı sperm hücrelerinde DNA hasarının Fas ekspresyonuyla başladığını, ancak bu hücrelerin apoptoz sürecini tamamlamadan hayatta kaldığını öne süren "abortif apoptozis" (tamamlanmamış apoptoz) hipoteziyle uyumludur (61). Ayrıca yapılan genetik çalışmalar, spermatogenez sırasında DNA hasarını onaran mekanizmalarda eksizyon onarım genleri, uyumsuzluk onarım genleri ve p53'ün kritik bir rol oynadığını göstermiştir (62).

3.4.3 Oksidatif Stres

Sperm DNA hasarının, artmış reaktif oksijen türleri (ROS) ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir (63). Seminal plazma, sperm DNA'sını koruma işlevi gören çeşitli antioksidan bileşenler içermektedir (64). Düşük seviyelerde ROS, sperm olgunlaşması, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda önemli roller üstlenirken, aşırı ROS üretimi hücresel ve genetik düzeyde ciddi zararlara yol açabilir.

Semendeki en büyük ROS kaynakları arasında lökositler ve spermler bulunur. Özellikle olgunlaşmamış veya morfolojik bozukluklara sahip sperm hücreleri, aşırı ROS üretimine neden olabilir. Ayrıca, sperm hareketliliğinin sağlanması için enerji üreten mitokondrilerin fazla olması, ortamda ROS seviyesinin yükselmesine katkıda bulunur (63).

Çevresel faktörler arasında semende lökosit varlığı, toksik kimyasallar, beslenme yetersizlikleri, laboratuvar işlemleri, yaşlanma, stres, sigara ve alkol kullanımı, enflamasyon, kanser ve antikanser ilaçları gibi etkenler bulunmaktadır. Ancak, içsel faktörlerin dışsal etmenlere kıyasla sperm DNA hasarına daha fazla katkı sağladığı bildirilmektedir. Sperm DNA fragmentasyonu, özellikle lökositlerin ürettiği ROS'dan çok, sperm hücrelerinin kendi içsel ROS seviyeleriyle daha yakından bağlantılıdır (63). Yapılan çalışmalara göre, infertil erkeklerin yaklaşık %25'inde spermde artmış ROS seviyeleri tespit edilmiştir (65).

3.4.4 Kromozomal Hasarlar

Erkek infertilitesinin nedenleri arasında genetik faktörlerin yaklaşık %30 oranında etkili olduğu rapor edilmiştir. Bu genetik anomaliler, sayısal ve yapısal kromozom bozukluklarını ya da her ikisinin bir arada bulunduğu durumları içerebilir. Özellikle Y kromozomundaki AZF (AZFa, AZFb, AZFc) gen bölgelerinde meydana gelen

mikrodelesyonların, azospermi veya oligospermiye sebep olarak üreme yetisini olumsuz etkilediği bilinmektedir (66).

3.5 Sperm DNA Fragmentasyonunu Belirleme Yöntemleri

Günümüzde, sperm DNA hasarını belirlemek amacıyla farklı teknikler uygulanmaktadır. Bu yöntemler, basit boyama işlemlerinden daha karmaşık analizlere kadar geniş bir yelpazede yer almakta olup, genellikle üç ana kategoriye ayrılmaktadır: DNA hasarının değerlendirilmesine yönelik testler, kromatin organizasyonundaki anomalileri saptayan yöntemler ve kromozomal bozuklukları tespit eden analizler. Sperm DNA fragmentasyon testlerinde sınır değerleri, yapılan araştırmalara bağlı olarak %27 ile %35 arasında değişkenlik göstermektedir (67).

3.5.1 DNA Hasarını Değerlendirmeye Yönelik Yöntemler

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin Analizi:

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif stres kaynaklı DNA hasarını belirlemede kullanılan en önemli biyobelirteçlerden biridir. Genomik DNA'daki 8-OHdG seviyesinin ölçümü, elektrokimyasal dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC-EC) yöntemi ile gerçekleştirilmektedir (68).

Komet (Tek Hücre Jel Elektroforezi) Testi:

Komet testi, sperm DNA kırıklarını doğrudan analiz etmek ve erkek infertilitesinin araştırılmasında kullanılan yüksek hassasiyete sahip bir yöntemdir (69). Bu test, nötral veya alkali ortamda gerçekleştirilebilir; nötral tampon çözeltiler yalnızca çift sarmallı DNA kırıklarını tespit edebilirken, alkali tamponlar hem tek hem de çift sarmallı kırıkları belirleyebilir (70).

Yöntemin temel prensibi, alkali pH ortamında farklı moleküler ağırlıklara ve elektrik yüklerine sahip DNA moleküllerinin elektrik alanı içinde farklı hızlarda hareket etmesine dayanır. Analiz esnasında yoğunlaştırılan sperm hücreleri, agaroz solüsyonu içinde ince bir tabaka halinde yayılır ve ardından deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonları ile işleme tabi tutulur. Bu süreç, DNA'nın süpersarmal halkalarını açarak protamin ve histonların uzaklaştırılmasını sağlar. Alkali ortam, çift sarmallı DNA'nın doğal sarmal yapısını bozarak kırıkların görünür hale gelmesini kolaylaştırır.

Elektroforez işlemi uygulandığında, sağlam DNA molekülleri kuyruğa benzer bir yapı oluşturmaz, hasar görmüş DNA fragmentleri moleküler ağırlık ve elektrik yükü farkı nedeniyle elektrik alanında farklı hızlarda hareket ederek "kuyruklu yıldız" benzeri bir görüntü meydana getirir. Hücreler, floresan DNA bağlayıcı boya ile boyandıktan sonra görüntüleme yazılımı aracılığıyla analiz edilir. Yazılım, kuyruğun uzunluğunu ve floresan yoğunluğunu değerlendirerek DNA iplik kırıklarının miktarını belirler. Baş ve kuyruktaki DNA oranına göre hasarın seviyesi tespit edilir. Floresan boyama yöntemi ile elde edilen DNA göçü görüntüleri analiz edilerek DNA hasarı derecelendirilir (71).

TUNEL Yöntemi:

TUNEL (Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP Nick-End Labeling) yöntemi, DNA polimeraz enzimi olan Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (TdT) kullanılarak tek veya çift sarmallı DNA'nın 3'-hidroksil uçlarına rastgele deoksiribonükleotitlerin (dUTP) eklenmesi prensibine dayanır (72). Eklenen dUTP'ler daha sonra işaretlenerek, akış sitometrisi veya floresan mikroskopi teknikleri ile analiz edilir. Ancak, çift sarmallı DNA kırıklarında her zaman 3'-OH grubu bulunmadığından, bu kırıkların tespit edilmesi her durumda mümkün olmayabilir. Sonuçlar doğrultusunda, spermiler TUNEL pozitif veya negatif olarak gruplandırılır ve total sperm popülasyonundaki yüzdesel oranları belirlenerek ifade edilir (73).

NT Testi (In Situ Nick Translasyon):

Nick Translasyon (NT) testi, temel olarak TUNEL yöntemine benzer bir prensip ile çalışmakla birlikte, yalnızca tek zincirli DNA kırıklarını tespit edebilir. Bu yöntem, DNA polimeraz I enzimi aracılığıyla gerçekleştirilen bir reaksiyon sonucunda, tek zincirli DNA'nın 3'-OH ucuna biyotin veya floresan ile işaretlenmiş dUTP eklenmesiyle ölçüm yapılmasını sağlar. NT yöntemi, DNA'daki endojen çentiklerin belirlenmesine olanak tanır (74). Ancak diğer testlerle kıyaslandığında duyarlılığının daha düşük olduğu belirtilmiştir.

Sperm Kromatin Yapı Analizi (SCSA):

Sperm kromatin yapı analizi (SCSA), anormal kromatin yapıya sahip sperm DNA'sının ısı veya asit kaynaklı denatürasyona daha duyarlı olduğu prensibine

dayanır. Bu yöntemde, akrinin turuncusu (AO) boyasının metakromatik özellikleri kullanılarak sperm DNA'sının in situ asit veya ısı ile denatüre olma eğilimi ölçülür. Akış sitometrisi yardımıyla, tek zincirli DNA'ların (≥ 630 nm'de kırmızı floresan) çift sarmallı DNA'lara (515-530 nm'de yeşil floresan) oranı belirlenir (75). Bunun yanı sıra, sperm hücrelerinde DNA kırıklarının yanı sıra histon-protamin oranında meydana gelen anormallikler de bu yöntemle tespit edilebilir (76).

Halo Sperm Yöntemi-Sperm Kromatin Dispersiyon (SCD) Testi:

Sperm Kromatin Dağılımı (SCD) testi, sperm DNA kırıklarını doğrudan tespit edebilen bir analiz yöntemidir (77). Test sürecinde, sperm örneği agaroz matriks içerisine yerleştirilir, ardından denatürasyon için bir asit çözeltisi ile işlem uygulanır ve böylece membran ve proteinler, lizis tamponu ile uzaklaştırılmış olur. Son aşamada, boyanan preparat ışık mikroskobu veya floresan mikroskop ile incelenir. DNA bütünlüğüne sahip sperm hücrelerinde, çekirdeğin merkezinde geniş bir hale (halo) oluşurken, DNA kırıkları bulunan spermelerde halo ya hiç gözlenmez ya da oldukça küçük olur (78).

Acridine Orange Testi (AOT):

Acridine Orange Testi (AOT), DNA'nın denatürasyon seviyesini belirlemek için Acridine Orange boyasının yeşilden kırmızıya doğru metakromatik kaymasını kullanır. Asit uygulaması sonrası denatüre olan DNA, yeşil floresan yerine kırmızı floresan yayar. Bu yöntem, Sperm Kromatin Yapı Analizi (SCSA) ile benzer bir prensibe dayanır ve DNA yapısındaki bozulmaları belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (79).

3.5.2 Kromatin Organizasyon Anomalilerini Belirleyen Yöntemler

Anilin Mavisi Boyama:

Asidik bir boya olan Anilin mavisi ile sperm kromatin bütünlüğü değerlendirilir. DNA hasarı bulunan spermeler, genellikle histon kalıntılarının varlığını işaret eder. Bu kalıntılar, kromatin paketlenmesinde yetersizliğe yol açarak nükleoproteinlerin bazik gruplarını daha erişilebilir hale getirir ve bu durum, anilin mavisi gibi asidik boyalara bağlanma eğilimini artırır (80,81). Bu teknik, histon bakımından zengin olgunlaşmamış spermatozoalar ile protamin açısından zengin olgun spermeleri ayırt etme prensibine dayanır. Lizin içeriği yüksek olan histon açısından zengin sperm

hücreleri mavi renkte boyanırken, arginin ve sistein bakımından zengin protamin içeren olgun sperm hücreleri boyanmaz. Lizin oranının yüksek olması, kromatin yoğunlaşmasında kusurlara neden olabilir (82-84).

Toluidin Mavisi Boyama:

Toluidin mavisi (TB) boyama yöntemi, spermlerin kromatin yapısındaki ve paketlenmesindeki anormallikleri belirlemek için uygulanan önemli bir histokimyasal boyama tekniğidir. Kromatini gevşek paketlenmiş veya DNA hasarı içeren sperm çekirdeklerindeki fosfat grupları, TB gibi bazik boyalara yüksek oranda bağlanır. TB, negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime giren katyonik bir boya olduğundan, zayıf ya da ortokromatik boyanmış hücrelerde TB bağlanma bölgelerinin azlığı, DNA'nın bütünlüğünün korunduğunu gösterir. Buna karşın, koyu veya metakromatik boyanmış hücrelerde, TB'nin fazla miktarda bağlandığı fosfat bölgelerinin varlığı, DNA bütünlüğünün bozulduğunu ve DNA kırıklarının mevcut olduğunu düşündürür (85).

Kromomisin A3 (CMA3) Yöntemi:

Kromomisin A3 (CMA3) yöntemi, protamin oranı düşük ve yetersiz paketlenmiş DNA'nın dolaylı olarak analiz edilmesini sağlar. CMA3, guanin-sitozin açısından zengin DNA bölgelerine özgü olarak bağlanır ve protaminlerle DNA'daki aynı bölgeleri hedef alır. Bu nedenle, yüksek CMA3 floresanı gösteren kısımların düşük protamin içeriğine sahip olduğu anlaşılır. Bu yöntem, spermatozoa kromatin değerlendirmesinde diğer yöntemlerle güçlü bir korelasyon göstermektedir (86).

3.5.3. Kromozomal Anomalileri Tespit Eden Yöntemler:

Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi:

Bu yöntemde, agaroz matrikse gömülmüş veya lam üzerine sabitlenmiş hücreler, DNA'nın denatüre edilmesi amacıyla alkali bir çözelti ile işleme tabi tutulur. Bu işlem, çift sarmallı DNA'nın tek sarmallı hale gelmesini sağlar. DNA kırıklarının artması, tek sarmallı DNA oluşumunu da artırmaktadır. Denatürasyonun ardından nötralizasyon uygulanarak proteinler uzaklaştırılır ve floresan işaretli probalar kullanılarak in situ hibridizasyon gerçekleştirilir. Bu probalar, DNA'nın tamamlayıcı bölgelerine bağlanarak floresan sinyal oluşturur. FISH yöntemi, DNA kırıklarının varlığını ve miktarını in situ olarak belirlemeye olanak tanır (87).

Çalışmamızda, DNA fragmantasyonunu belirlemek amacıyla Acridine Orange boyama yöntemi tercih edilmiştir. Ancak, bu yöntemin dezavantajlarından biri, floresan mikroskopta renklerin hızla solmasıdır.

AO Boyama Prosedürü

Semen süspansiyonundan hazırlanan preparatlar, Carnoy fiksatifinde (3:1'lik metanol: glasiyal asetik asit) en az 1 saat bekletildikten sonra kurumaya bırakılır. Sonrasında preparatlar, boyama işlemi için Acridine Orange (AO) boyasına aktarılır (50).

AO Stok Çözeltileri ve Diğer Çözeltiler:

- %1'lik AO çözeltisi: 1 g Acridine Orange, 100 ml distile suda çözülerek hazırlanır.
- 0,1 Molar sitrik asit: 19,212 g sitrik asit, 1 litre distile su içinde çözülerek elde edilir.
- 0,3 Molar $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 47,991 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 litre distile suda çözülerek hazırlanır.
- Carnoy fiksatif: 75 ml metanol ve 25 ml asetik asit karıştırılarak oluşturulur.

AO Boya Karışımı:

- %1 Acridine Orange: 2,5 ml
- 0,1 Mol/l sitrik asit: 10 ml
- 0,3 M Na_2HPO_4 : 400 µl

Bu çözelti her gün taze olarak hazırlanır.

AO Boyama Uygulama Adımları:

Yıkama işleminin ardından süspansiyon haline getirilmiş sperm örneğinden 20 µl alınarak temiz bir lam üzerine yayılır ve havada kurumaya bırakılır. Kuruyan preparat, 1 saat boyunca Carnoy fiksatif ile fikse edilir. Fiksasyon tamamlandıktan sonra, taze hazırlanmış AO boyası ile 5 dakika boyunca karanlık ortamda boyama işlemi gerçekleştirilir. Fazla boya, distile su ile uzaklaştırıldıktan sonra, temiz bir kurutma kağıdı yardımıyla fazla su alınır. Örnekler floresan mikroskop altında incelenir.

Floresan inceleme sırasında:

- Yeşil floresan yayan sperm hücreleri sağlam DNA içerirken,

- Sarı-turuncu floresan yayan sperm hücreleri DNA fragmentasyonu taşımaktadır.

Toplamda en az 200 hücre analiz edilerek DNA fragmentasyon yüzdesi hesaplanır.

3.6 Sperm Hücresinin Elde Edilmesi

Normal fizyolojik koşullarda, sperm hücreleri testislerde bulunan seminifer tübüllerde üretilir ve olgunlaşmak üzere epididimde depolanır. Ejakülasyon sırasında, spermler vas deferens adı verilen kanallar boyunca ilerleyerek hareket eder ve bu süreçte prostat bezi, seminal veziküller ve bulboüretral bezler tarafından salgılanan sıvılarla birleşir. Bu birleşme sonucunda ejakülasyon sırasında vücuttan atılan semen (meni) sıvısı oluşur. En yaygın sperm elde etme yöntemi, mastürbasyon yoluyla alınan ejakülatın laboratuvar ortamında değerlendirilmesi ve çeşitli tekniklerle sperm hücrelerinin ayrıştırılmasıdır. Ancak bazı durumlarda, sperm hücrelerinin doğal yollarla elde edilmesi mümkün olmayabilir. Obstrüktif (tıkayıcı) veya obstrüktif olmayan bazı vakalarda, sperm elde etmek için cerrahi müdahaleler gerekmektedir.

Cerrahi sperm elde etme yöntemleri (MESA, PESA, TESE, TESA), ejakülasyon ile meni çıkışının gerçekleşmediği veya ejakülatta sperm hücresinin çok az bulunduğu (kriptozoospermi) ya da hiç tespit edilemediği (azospermi) vakalarda, yardımcı üreme teknikleri (IVF, ICSI) kapsamında testis dokusundan sperm hücrelerinin alınması için uygulanmaktadır. Erkek infertilitesi vakalarının yaklaşık %10-15'inde azospermi görülmektedir (1). Bazı azospermik hastalarda, testislerde sperm üretimi devam etmesine rağmen, sperm hücrelerinin ejakülatta bulunmasını engelleyen bir tıkanıklık (obstrüktif azospermi) söz konusu olabilir. Bu durumun temel nedenleri arasında doğuştan sperm kanallarının gelişmemesi (konjenital bilateral vas deferens yokluğu), sperm taşıyan kanallarda tıkanıklık (epididim veya vas deferens düzeyinde) ve geçmişte gerçekleştirilen vazektomi (cerrahi sterilizasyon) operasyonları yer almaktadır (88).

Cerrahi sperm elde etme yöntemleri, obstrüktif azospermisi olan hastalarda epididim veya testis dokusundan, obstrüktif olmayan azospermi vakalarında ise doğrudan testisten sperm hücrelerinin toplanmasına olanak tanımaktadır. Elde edilen spermler, tüp bebek uygulamaları aracılığıyla kadının oositleri ile döllenerek gebelik elde

edilmesini sağlamaktadır. Cerrahi sperm elde etmek için kullanılan yöntemler şu şekilde özetlenebilir:

Perkütan Epididimal Sperm Aspirasyonu (PESA)

Bu yöntemde, skrotum cildi üzerinden epididime ince bir biyopsi iğnesi ile girilerek sperm hücreleri aspire edilir. Elde edilen sperm hücreleri, mikroenjeksiyon (ICSI) yöntemi ile oositlerin döllenmesi için kullanılabilir (89).

Testiküler Sperm Aspirasyonu (TESA)

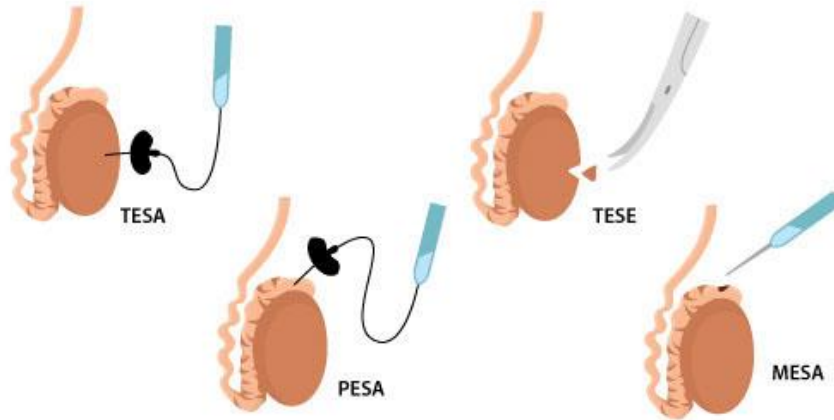
PESA tekniğinin yetersiz kaldığı ya da uygulanmasının mümkün olmadığı durumlarda tercih edilir. Vakumlu bir iğne kullanılarak testis dokusuna girilir ve küçük doku örnekleri alınır. Bu örneklerde sperm hücrelerinin bulunması durumunda, mikroenjeksiyon (ICSI) yöntemi ile döllenme işlemi gerçekleştirilir (90).

Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE)

PESA ve TESA tekniklerinin uygulanamadığı veya sperm elde edilemediği vakalarda kullanılan bir yöntemdir. Bu teknikte, skrotum açılarak testis dokusundan biyopsi yoluyla küçük doku parçaları alınır ve sperm varlığı araştırılır. Genellikle işlem sırasında genel anestezi uygulanır. Biyopsinin mikroskop altında yapılması durumunda yöntem Micro-TESE olarak adlandırılır ve sperm bulma olasılığı artırılmış olur (91).

Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu (MESA)

Açık cerrahi yöntemi ile gerçekleştirilen bu teknikte, skrotum açılarak epididimden iğne yardımıyla olgun sperm hücreleri aspire edilir. Özellikle vas deferens kanallarında tıkanıklık bulunan veya doğuştan sperm kanallarına sahip olmayan hastalar için tercih edilen bir yöntemdir. İşlem, genellikle genel anestezi altında yapılmaktadır (92).



Şekil 7. Cerrahi sperm elde etme yöntemleri

3.7 Sperm Hazırlama Yöntemleri

Yardımla üreme tekniklerinin büyük bir çoğunluğunda, semen örneği laboratuvar koşullarında belirli işlemlerden geçirilir. Doğal döllenme sürecinde, vajinaya bırakılan sperm hücreleri için servikal mukus fiziksel bir bariyer görevi görür. Bu mukus, spermilerin hiperaktivasyonunu teşvik etmenin yanı sıra, morfolojik olarak sağlıklı sperm hücrelerinin seçilmesine de yardımcı olur. Dişi üreme sisteminde ilerleme sırasında, semen içerisinde bulunan hücresel artıklar, lökositler, bakteriler ve yapısal ya da hareket bozukluğu olan spermier filtrelenerek elenir. Aynı zamanda seminal plazma proteinleri uzaklaştırılarak, sperm kapasitasyonu sağlanır.

Yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) kullanılan sperm hazırlama yöntemleri, bu doğal süreçleri laboratuvar ortamında taklit ederek, döllenme potansiyeli yüksek sperm hücrelerinin seçilmesini amaçlamaktadır. Kullanılacak sperm hazırlama tekniği, semen örneğinin özelliklerine bağlı olarak belirlenir. Tüm sperm hazırlama yöntemlerinde, vücut içi ortama benzer koşullar oluşturmak amacıyla özel olarak hazırlanmış tuz solüsyonları kullanılır. Ayrıca, uygun tamponlama ile pH dengesi korunarak sperm hücreleri için uygun kültür ortamları sağlanır (49).

3.7.1 Yıkama (Sperm Wash) Yöntemi

Bu yöntem, seminal plazmayı uzaklaştırmak sperm konsantrasyonunu artırmak amacıyla uygulanır (50).

Uygulama Prosedürü:

1. Semen örneği, steril bir pipet yardımıyla yavaşça karıştırılır.
2. Seminal plazmanın ortamdan ayrıştırılması için semen örneği, kültür medyumu ile 1:1 (veya 1:2) oranında seyreltilir.
3. Hazırlanan süspansiyon, her tüpte en fazla 3 ml olacak şekilde birkaç santrifüj tüpüne aktarılır.
4. Örnekler, 300–500 g'de 5 ila 10 dakika boyunca santrifüj edilir.
5. Santrifüj sonrası üst faz dikkatlice aspire edilerek atılır.
6. Tüpte kalan sperm pelletlerine 1 ml kültür medyumu eklenir, hafif pipetaj ile tekrar süspansiyon haline getirilir.
7. Elde edilen süspansiyon, 300–500 g'de 3-5 dakika boyunca yeniden santrifüj edilir.
8. Santrifüj sonrası üst faz aspire edilerek uzaklaştırılır, pellete zarar vermemeye özen gösterilir.
9. Uygun hacimde kültür medyumu eklenerek pellet süspansiyon haline getirilir ve analiz için hazırlanmış olur (50)

3.7.2 Yüzdürme (Swim-up) Yöntemi

Bu teknik, yüksek hareketlilik gösteren sperm hücrelerini seçmek amacıyla uygulanmaktadır (50).

Uygulama Prosedürü:

1. Semen örneği, steril bir pipet yardımıyla dikkatlice karıştırılır.
2. Semen örneğinden 1 ml alınarak 15 ml'lik konik tüpe aktarılır. Üzerine 1-2 ml kültür medyumundan ilave edilir. Alternatif olarak, semen örneğinden bir miktar pipetle çekilip, doğrudan kültür medyumunun altına dikkatlice yerleştirilebilir.
3. Semen ve kültür medyumu arasındaki temas yüzeyini artırmak için tüp, yatay düzleme 45 derecelik açıyla eğilir ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılır.
4. Inkübasyon tamamlandıktan sonra tüp hafifçe dik konuma getirilir ve üstteki 1 ml'lik kültür medyumu kısmı dikkatlice alınır. Bu bölümde, yüksek hareketlilik gösteren sperm hücrelerini bulunur.

5. Hareketli spermleri içeren bu süspansiyon, 1,5–2 ml kültür medyumunu ile sulandırılır.
6. 300–500 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Ardından üst katman, pellete zarar vermeden dikkatlice aspire edilerek uzaklaştırılır.
7. Pellete 0,5 ml kültür medyumunu eklenerek süspansiyon haline getirilir. Bu aşamada, sperm konsantrasyonu ve hareketliliği değerlendirilebilir.
8. İşlem görmemiş örnekler, tanı, tedavi veya araştırma amaçlı doğrudan kullanılabilir (50).



3.7.3 Dansite Gradient Yöntemi

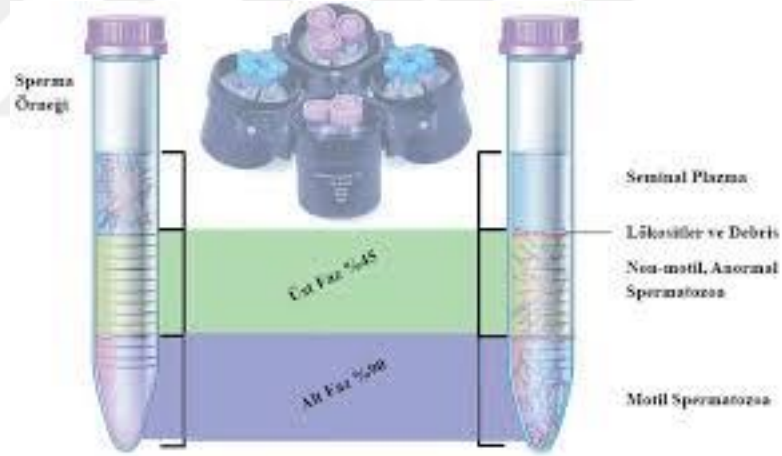
Bu teknik, sperm morfolojisini ve hareketliliğini iyileştirmek amacıyla uygulanmaktadır (50). Özellikle, şiddetli oligospermi, teratospermi veya astenospermi vakalarında, yüksek konsantrasyonda hareketli sperm elde etmek için tercih edilir. Yöntem, kaliteli sperm hücrelerini lökositler, ölü spermler ve diğer seminal plazma bileşenlerinden ayırmak için kesintisiz yoğunluk gradyanı oluşturur. Spermler, yoğunlukları ve hareketlilik seviyelerine göre ayrıştırılır. Dansite gradient tekniğinde iki farklı yoğunluk katmanı kullanılır. Gradient konsantrasyonu azaldıkça elde edilen sperm sayısı artmasına rağmen, en sağlıklı ve fonksiyonel spermler, daha yoğun olan alt katmanda yer alır. Genellikle santrifüj hızı 300 g olarak belirlenir. Ancak santrifüj süresinin uzaması ve hızın artması, sperm hücrelerinin hasar görme riskini artırabilir (49).

Uygulama Prosedürü:

1. Bir test tüpünün içine 1ml %90'lık dansite gradient medyumunu konulup üzerine 1ml %45'lik dansite gradient medyumunu dikkatlice konularak

yoğunluk gradyanı oluşturulur. (Yoğunluk tercihen %40-%80 arasında değişebilir.)

2. Semen örneği, steril bir pipet yardımıyla hafifçe karıştırılır.
3. 1 ml semen örneği, dikkatlice dansite gradient medyumunun üzerine yerleştirilir ve 300-400 g'de 15-30 dakika boyunca santrifüjlenir. Gerekli durumlarda bir semen örneği birden fazla tüpe de konulabilir.
4. Santrifüj sonrası, üst faz dikkatlice aspire edilerek uzaklaştırılır, pellete zarar verilmemesine özen gösterilir.
5. Kontaminasyonu önlemek amacıyla, pellet hafifçe pipetlenir ve 5 ml takviyeli medyum içerisine alınarak yeniden süspansiyon oluşturulur. Bu süspansiyon 200 g'de 4-10 dakika boyunca santrifüjlenir.
6. Spermin sağlığını artırmak için yıkama adımı yeniden uygulanır.
7. Elde edilen pellet, uygun kültür medyumunda pipetlenerek süspansiyon haline getirilir. Böylece sperm konsantrasyonu ve hareketliliği değerlendirilmek üzere hazır hale getirilmiş olur (50).



Şekil 9. Dansite Gradient yöntemi

3.8 Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon; hücre, doku, embriyo, sperm ve yumurta gibi biyolojik materyallerin, sıfır derecenin altındaki sıcaklıklarda dondurularak uzun süre muhafaza edilmesini sağlayan bir tekniktir (93). Bu yöntemin temel amacı, canlı hücreleri veya dokuları, son derece düşük sıcaklıklarda, minimum düzeyde hasar ve fonksiyon kaybı olmadan uzun süre saklamaktır (94). Kriyoprezervasyon süreci, biyolojik materyalin kriyoprotektanlarla dengeye getirilmesini, ardından kontrollü bir

şekilde soğutulup sıvı nitrojen içinde -196°C 'de saklanmasını içerir. Çözdürme aşamasında ise kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılmasıyla biyolojik materyaller, canlılıklarını sürdürebilecekleri uygun fizyolojik ortamlara aktarılır (95).

3.8.1 Kriyoprezervasyonun Tarihçesi

İnsan sperm kriyobiolojisinin temelleri 18. yüzyıla kadar uzanmaktadır. 1776 yılında İtalyan bilim insanı ve din adamı Lazzaro Spallanzani, farklı sıcaklıklara maruz bırakılan hayvan spermlerini inceleyerek, çözdürme sonrası bazı hücrelerin hareketliliğini koruyabildiğini keşfetmiştir. Bu çalışma, sperm kriyoprezervasyonunun ilk bilimsel adımlarından biri olarak kabul edilmektedir (96).

1886 yılında İtalyan doktor Paolo Mantegazza, insan ve kurbağa spermlerini -14°C ve -17°C sıcaklıklara maruz bırakarak kriyoprezervasyon üzerine öncü deneyler gerçekleştirmiştir. Ayrıca, savaş sırasında hayatını kaybeden erkeklerin spermlerinin dondurulup ilerleyen dönemlerde kullanılabileceği fikrini öne sürmüştür (97).

1930'da John Hammond ve Arthur Walton, kriyoprezervasyonun temel ilkelerini anlamaya yönelik önemli bir çalışma yapmışlardır. Tavşan spermi üzerinde gerçekleştirdikleri deneylerde, spermlerin 10°C 'de tutulması durumunda döllenme kapasitesini 100 saat boyunca koruyabildiğini ortaya koymuşlardır (98).

1949 yılında Polge, Smith ve Parkes, gliserolün kriyoprotektan olarak kullanılabileceğini keşfetmişlerdir. Bu buluş, hücrelerin düşük sıcaklıklarda hayatta kalabilmesini sağlayarak kriyobioloji alanında devrim niteliğinde kabul edilmiştir (96).

1952'de C. Polge ve L. Rowson, kriyoprezervasyonun tarım ve hayvancılık alanında uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Gerçekleştirdikleri çalışma ile dondurulup çözdürülen spermler kullanılarak yapay döllenme yoluyla ilk buzağı dünyaya getirilmiştir (99).

1953'te Bunge ve Sherman, kriyoprezervasyonun insan üreme biyolojisinde kullanımına yönelik önemli bir adım atmışlardır. Kuru buz kullanılarak dondurulan insan spermleriyle gerçekleştirilen ilk başarılı canlı doğum rapor edilmiştir (100).

1963 yılında Sherman ve ekibi, sperm hücrelerinin sıvı nitrojen içinde uzun süre saklanabileceğini ortaya koymuştur. Bu gelişme, sperm kriyoprezervasyonunun tıbbi uygulamalar içinde yaygınlaşmasına olanak sağlamıştır (101).

1970’li yıllarda sperm bankalarının kurulmasıyla sperm dondurma ve saklama işlemleri yaygınlaşmaya başlamıştır. 1973 yılında, bir yıldan uzun süre saklanan sperm kullanılarak sağlıklı bir bebeğin dünyaya gelmesi, bu yöntemin etkinliğini kanıtlamıştır. 1998’de ise, 20 yıldan fazla süreyle dondurulmuş sperm kullanılarak başarılı bir doğum gerçekleştirilmiştir (102).

3.8.2 Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Kriyoprezervasyon, hücrelerin, dokuların ve embrioların dondurularak çok düşük sıcaklıklarda uzun süre muhafaza edilmesini sağlayan önemli bir tekniktir. Kullanılan kriyoprezervasyon yöntemi, hücre türüne ve korunma amacına bağlı olarak belirlenir. Teknolojik ilerlemeler sayesinde, özellikle üreme tıbbı, organ nakli ve genetik araştırmalar gibi alanlarda bu yöntemlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (93).

Hücrelerin hayatta kalmasını ve işlevlerini sürdürebilmesini sağlamak amacıyla kriyoprotektan adı verilen özel koruyucu maddeler kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak tercih edilen başlıca kriyoprezervasyon teknikleri şunlardır:

- Klasik yavaş dondurma tekniği (Slow freezing)
- Ultra hızlı dondurma tekniği (Rapid freezing)
- Vitrifikasyon (Camlaştırma - Vitrification)

3.8.2.1 Klasik Yavaş Dondurma Tekniği

Klasik yavaş dondurma yöntemi, biyolojik materyalin kontrollü ve kademeli olarak soğutulması prensibine dayanır. Bu süreç uzun zaman alan bir prosedür olup (103), hücrelerin ani sıcaklık değişimlerinden zarar görmesini önlemek amacıyla düşük sıcaklıklara yavaş geçiş sağlanmaktadır (104).

Uygulama Aşamaları:

1. Hücrelerde su kaybını sağlamak için kriyoprotektan solüsyonları (gliserol, etilen glikol, DMSO vb.) kullanılır.
2. Hücreler, kriyoviyaller veya özel dondurma tüplerine yerleştirilerek soğutma cihazına aktarılır.
3. Kademeli soğutma işlemi uygulanarak sıcaklık -80°C ’ye kadar düşürülür.
4. Son aşamada, hücreler sıvı azot (-196°C) içinde uzun süre saklanır (103).

3.8.2.2 Ultra Hızlı Dondurma Tekniği

Ultra hızlı dondurma yöntemi, biyolojik materyalin sıvı azot ile temas ettirilerek çok kısa sürede dondurulmasını sağlar. Bu teknikte kriyoprotektan kullanımı daha düşük seviyede olup, hücre içindeki suyun hızlı bir şekilde dışarı çıkması teşvik edilir. Ancak, diğer kriyoprezervasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında uzun vadeli başarı oranı daha düşük olabilir (105).

Uygulama Aşamaları:

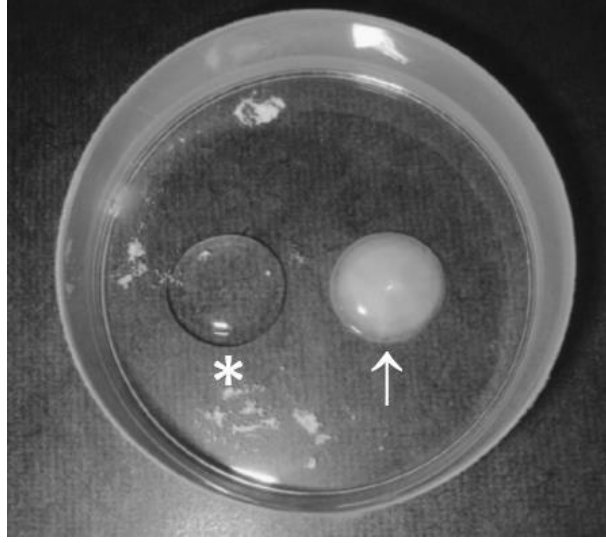
1. Hücreler, düşük konsantrasyonlu kriyoprotektan içeren solüsyonlara yerleştirilir.
2. Hızlı bir dengeleme sürecinin ardından, doğrudan sıvı azot buharına maruz bırakılır.
3. Son aşamada, hücreler sıvı azot içerisine daldırılarak -196°C’de muhafaza edilir (106).

3.8.2.3 Vitrifikasyon

Vitrifikasyon, modern kriyoprezervasyon teknikleri arasında en gelişmiş yöntemlerden biri olup, buz kristali oluşumunu tamamen önleyerek biyolojik materyalin korunmasına olanak tanır (107). Özellikle spermiler, oositler ve embriyolar gibi hassas hücrelerde yüksek başarı oranı sağlamaktadır. Çözme işlemi sonrasında hücrelerin canlılık oranları diğer yöntemlere kıyasla daha yüksektir.

Uygulama Aşamaları:

1. Biyolojik materyal, yüksek konsantrasyonlu kriyoprotektan solüsyonları ile dengelenir.
2. Ultra hızlı soğutma işlemi uygulanarak doğrudan sıvı azot içerisine daldırılır.
3. Hücre içindeki sıvının donmadan cam benzeri bir yapıya dönüşmesi sağlanır.
4. Çözme aşamasında, hızlı ısıtma uygulanarak kriyoprotektanlar ortamdan uzaklaştırılır (107).



Şekil 10. Camsılaşma (*) ve buz kristali oluşumu (↑)

Tablo 3. Kriyoprezervasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
Klasik Yavaş Dondurma	Büyük hacimli hücreler için uygundur, güvenilir bir yöntemdir.	Buz kristalleri oluşabilir, çözme sonrası hücre kaybı olabilir.
Ultra Hızlı Dondurma	İşlem süresi hızlıdır, minimal kriyoprotektan kullanımı sağlar.	Buz kristali nedeniyle hücre zarına zarar verebilir.
Vitrifikasyon	Buz kristali oluşmaz, yüksek canlılık oranı sağlar.	Yüksek kriyoprotektan toksisitesi riski taşır.

3.8.3 Kriyoprotektanlar

Kriyoprezervasyon sürecinde kullanılan kriyoprotektanlar, biyolojik materyalin donma sırasında hasar görmesini önleyen özel bileşiklerdir.

Bu koruyucu maddeler, dondurma işlemi sırasında hücrelerin hayatta kalma oranını artırarak, donmaya bağlı hücresel hasarı en aza indirir ve hücrelerin canlılığını korumalarına katkıda bulunur. Kriyoprotektanlar, hücre zarından geçebilen (permeabl) ve hücre zarından geçemeyen (non-permeabl) olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır.

3.8.3.1 Hücre İçine Nüfuz Eden (Permeabl) Kriyoprotektanlar

Bu kriyoprotektanlar, hücre zarından geçerek hücre içindeki suyun yerini alır ve buz kristallerinin oluşmasını engeller. Aynı zamanda proteinleri stabilize ederek hücredeki donma noktasını düşürmeye yardımcı olurlar. Düşük moleküler ağırlığa sahip bu bileşikler, hücrelerdeki ozmotik değişikliklerden kaynaklanan hasarı en aza indirir. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda toksisiteye neden olabilir ve üreme potansiyeli üzerinde olumsuz etkiler gösterebilir (108).

Sık kullanılan permeabl kriyoprotektanlar;

- Gliserol
- Etilen Glikol
- Propanediyol
- Propilen Glikol (PROH)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Bu bileşikler, özellikle embriyo, gamet ve gonad dondurma işlemlerinde yaygın olarak kullanılırlar ve farklı dondurma protokollerine dahil edilirler (109,110).

3.8.3.2 Hücre İçine Nüfuz Etmeyen (Non-Permeable) Kriyoprotektanlar

Hücre zarından geçemeyen kriyoprotektanlar, hücre dışı sıvının viskozitesini artırarak donma sıcaklığını düşürür. Hücre içinde suyun hızlı ozmotik dehidrasyonu ile kristal oluşumunu engelleyerek koruma sağlar. Genellikle şeker bileşikleri bu grupta yer alır ve hücre zarının stabilizasyonuna katkıda bulunurlar.

Sık kullanılan non-permeabl kriyoprotektanlar;

- Glukoz
- Sükroz
- Rafinoz

Bunlara ek olarak, Glisin, Prolin ve Trehaloz gibi amfipatik bileşikler, hücre zarındaki lipid ve proteinlerle etkileşime girerek hücre bütünlüğünü korur (110,111). Genellikle kriyoprotektan çözeltileri, permeabl ve non-permeabl bileşiklerin kombinasyonundan oluşur. Ayrıca, fosfolipid içeriğine sahip yumurta sarısı, kolesterol, lipoproteinler, albümin ve antioksidanlar da kriyohasar riskini azaltmak için dondurma ortamlarına eklenmektedir (112).

3.8.4 Çözdürme Prosedürü

Çözdürme süreci, dondurma işlemi kadar kritik bir aşama olup, biyolojik materyalin canlılığını ve işlevselliğini koruyabilmesi açısından son derece önemlidir. Dondurulmuş hücrelerin kontrollü bir şekilde çözülmesi, donma sürecinde oluşabilecek olası hasarları en aza indirmek için büyük bir özen gerektirir. Özellikle sperm, oosit ve embriyo gibi hassas hücrelerde, çözdürme aşaması en az dondurma kadar kritik bir süreçtir.

Genel olarak çözdürme işlemi aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır:

1. Dondurulmuş numuneler, sıvı azot içinde saklandıkları kaplardan dikkatlice alınmalıdır. Bu aşamada, örneklerin çevresel sıcaklığa maruz kalmadan doğrudan çözdürme işlemine geçmesi sağlanmalıdır.
2. Dondurulmuş biyolojik materyaller genellikle 37°C sıcaklığındaki su banyosunda çözülmeaktadır. Bu sıcaklık, hücresel yapıların donmuş halden sıvı faza geçişini dengeli ve kontrollü bir şekilde gerçekleştirmesine yardımcı olur. Çözme süresi, biyolojik materyalin türüne bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Sperm örnekleri için bu süre genellikle 5 ila 10 dakika arasında değişmektedir (113).
3. Dondurma aşamasında hücreleri koruyucu bir rol üstlenen kriyoprotektanlar (örneğin gliserol, etilen glikol), çözdürme sırasında uygun bir şekilde uzaklaştırılmalıdır. Çözülen biyolojik materyal, santrifüjleme işleminden geçirilerek ve taze solüsyonlarla yıkanarak bu kimyasalların olası toksik etkileri en aza indirilmektedir (114,115).
4. Çözdürme işlemi tamamlandıktan sonra, hücrelerin canlılık ve fonksiyonları mikroskopik analizlerle değerlendirilir. Bu aşamada hücrelerin hareketlilik (motilite), morfoloji ve yapısal bütünlük gibi özellikleri analiz edilir. Eğer işlem sperm hücreleri için gerçekleştirilmişse, sperm sayısı, hareket kabiliyeti ve DNA bütünlüğü gibi parametreler dikkate alınır (116).
5. Çözdürülmüş biyolojik materyaller genellikle doğrudan kullanıma uygun hale getirilir. Özellikle sperm ve embriyo gibi hücreler, yardımcı üreme teknikleri kapsamında IVF veya ICSI (intrazitoplazmik sperm enjeksiyonu) gibi prosedürlerde kullanılmaktadır. Eğer biyolojik materyal hemen kullanılmayacaksa, kısa süreliğine düşük sıcaklıklarda muhafaza edilebilir.

Ancak, çözülen hücrelerin mümkün olan en kısa sürede kullanılması önerilmektedir.

Çözdürme sürecinde karşılaşılabilecek en büyük risklerden biri, hücre içinde oluşan buz kristallerinin çözülme esnasında hücre zarına zarar verme ihtimalidir. Bu nedenle çözme işleminin hızlı ve kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, kriyoprotektanların uygun şekilde ortamdan uzaklaştırılmaması, hücreler üzerinde toksik etkilere yol açabileceğinden, sürecin dikkatle yönetilmesi büyük önem taşımaktadır (116).

3.8.5 Kriyohasar Mekanizmaları

Kriyohasar, kriyoprezervasyon süreci boyunca hücrelerde meydana gelen yapısal ve işlevsel bozulmaları tanımlayan bir kavramdır. Hücrelerin düşük sıcaklıklara maruz kalması, özellikle hücre içindeki suyun buz kristallerine dönüşmesi veya membran bütünlüğünün bozulması gibi mekanizmalarla zarar görmesine neden olabilir. Kriyohasarin oluşum mekanizmaları temel olarak aşağıdaki faktörlere bağlıdır:

Buz Kristali Oluşumu

Dondurma sürecinde hem hücre içindeki hem de hücre dışındaki suyun kristalleşmesi, hücre zarına ciddi fiziksel zararlar verebilir. Hücre içinde meydana gelen buz kristalleri, hücre zarını ve organelleri mekanik olarak tahrip ederek hücresel bütünlüğü bozabilir. Özellikle yavaş dondurma tekniklerinde, büyük buz kristallerinin oluşma ihtimali daha yüksektir ve bu durum hücresel ölüm oranını artırabilir (117, 118).

Osmotik Şok

Dondurma sırasında hücre içindeki ve dışındaki suyun donma hızları arasındaki farklılıklar, hücrelerde su kaybına (dehidrasyon) sebep olabilir. Hücre dışındaki buz kristallerinin artmasıyla hücre içindeki su dışarı çekilir ve bu da hücre içi ozmotik basıncın yükselmesine yol açar. Aşırı ozmotik stres, hücrelerin büzülmesine ve nihayetinde hücre ölümüne neden olabilir (119).

Membran Hasarı

Kriyoprezervasyon sürecinde hücre zarları donma-çözülme döngüsüne bağlı olarak yapısal değişikliklere uğrayabilir. Hücre zarında bulunan lipit çift tabakası, düşük sıcaklıklara maruz kaldığında faz değişimi geçirerek geçirgenliğini kaybedebilir. Bu

durum zarın bütünlüğünü bozarak hücrel ölümle sonuçlanabilecek ciddi hasarlara yol açabilir. Özellikle vitrifikasyon gibi hızlı dondurma tekniklerinde, membran hasarını önlemek için kontrollü çözündürme işlemi uygulanmalıdır (120,121).

Solüt Konsantrasyonu ve Toksisite

Dondurma süreci boyunca hücre içindeki suyun donması, hücre içi sıvının yoğunluğunu artırarak çözünmüş maddelerin (solütlerin) birikmesine neden olur. Bu yüksek solüt konsantrasyonu, hücre içinde toksik etkilere yol açabilir ve hücrel metabolizmayı bozabilir. Hücrelerin bu tür kimyasal streslere karşı dirençleri sınırlıdır. Bu nedenle, kriyoprotektanlar bu olumsuz etkileri en aza indirmek için kullanılır (120).

Faz Geçişleri ve Lipid Bozulması

Düşük sıcaklıklar, hücre zarındaki lipitlerin faz değişimine uğramasına neden olarak zarın geçirgenliğini ve fonksiyonunu bozabilir. Bu bozulma, hücre içi homeostazın bozulmasına ve iyon dengesizliklerine yol açarak hücrel işlevlerin aksamasına sebep olabilir. Özellikle yavaş dondurma tekniklerinde bu tür hasarların ortaya çıkma ihtimali daha yüksektir (122).

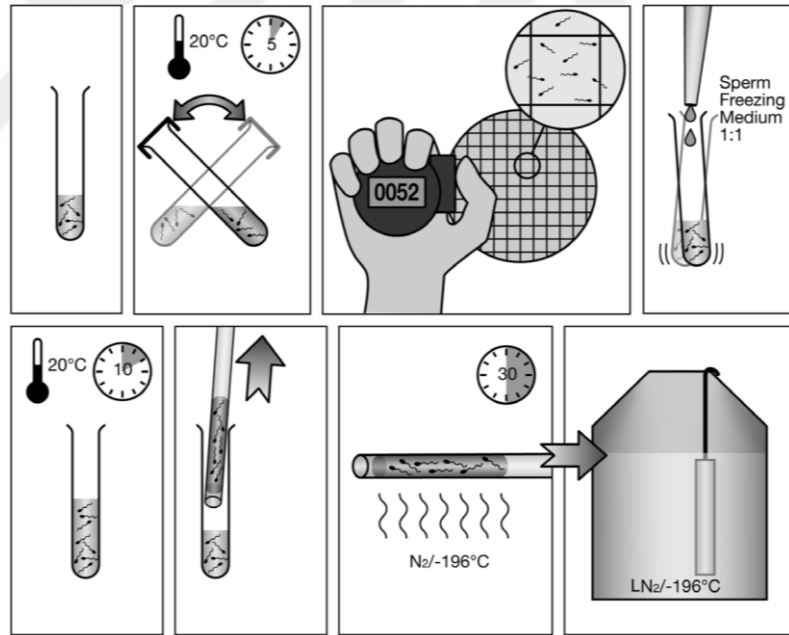
Kriyoprotektan Toksisitesi

Kriyoprotektanlar, hücre içindeki suyun donmasını önleyerek buz kristallerinin oluşmasını engeller. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında hücreler üzerinde toksik etkilere sebep olabilirler. Özellikle dimetilsülfoksit (DMSO) gibi bazı kriyoprotektanlar, yüksek dozlarda hücrel zarara yol açabilir (118). Bu nedenle, kriyoprotektanların uygun konsantrasyonlarda kullanılması ve çözündürme aşamasında dikkatli bir şekilde uzaklaştırılması büyük önem taşımaktadır (121).

3.8.6 Sperm Kriyoprezervasyonu ve Çözme Prosedürü

1. Semen numunesi, 2-3 günlük cinsel perhiz sonrası steril bir kap içerisine mastürbasyon yoluyla alınmalıdır.
2. Alınan semen, 37°C sıcaklıkta 15-30 dakika içinde tamamen likifiye olmalıdır.
3. Sıvı hale gelen semen örneği, sperm parametreleri açısından değerlendirilmelidir.

4. 5 mL'lik tüplerde bulunan sperm dondurma solüsyonu, oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37°C'ye kadar ısıtılmalıdır.
5. Gradient yöntemiyle yıkanan semen numunesi, steril 15 mL'lik konik dipli santrifüj tüpüne konularak ejakülat hacmi belirlenir. Dondurma solüsyonu, semen/dondurma solüsyonu oranı 1:1 olacak şekilde, 30 saniye boyunca yavaşça ve damla damla ilave edilir. Eklenen her damla özenle karıştırılmalı, hava kabarcıklarının oluşumundan kaçınılmalıdır.
6. Tüm dondurma solüsyonu eklendikten sonra, karışım oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika dinlendirilmelidir.
7. Sperm dondurma solüsyonu içeren karışım, vial içerisine aktarılmalıdır. Genleşmeye izin vermek için viallerin aşırı doldurulmaması gerekir ve kapakları sıkıca kapatılmalıdır.
8. Vialler, özel tutamaçlarla sıvı azot buharında yaklaşık bir saat bekletildikten sonra uygun saklama tankına yerleştirilmelidir.



Şekil 11. Sperm kriyoprezervasyonu

Sperm çözme prosedürü;

1. Çözme işlemi için, vialler sıvı azot deposundan çıkarıldıktan sonra yaklaşık bir dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilir.
2. Daha sonra, hareket ettirilmeden 37°C'lik su banyosuna yerleştirilir.
3. Vial içerisindeki sperm örneği tamamen çözünüp buz halinden sıvı forma geçtiğinde, üzerine sperm yıkama solüsyonu ilave edilir.

4. 1300 rpm hızında 10 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılır ve bu sayede kriyoprotektan ortamdan temizlenmiş olur.
5. Çözme işlemi tamamlandıktan sonra, elde edilen sperm hücreleri fonksiyonel parametreler açısından detaylı olarak analiz edilir.

3.8.7 Sperm Kriyoprezervasyonunun Endikasyonları

Günümüzde sperm dondurma işlemi, fertilitenin korunması ve yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) etkin bir şekilde uygulanabilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Gelecekte üreme potansiyelini koruma amacıyla uygulanan bu yöntem, en önemli tıbbi prosedürlerden biri olarak kabul edilmektedir. Sperm kriyoprezervasyonunun gerekli görüldüğü bazı başlıca durumlar şu şekilde sıralanabilir;

Kanser Tedavisi Öncesi; Kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavileri, sperm üretimi üzerinde geçici ya da kalıcı olumsuz etkiler yaratabilir. Testis kanseri, lenfoma, lösemi ve beyin tümörleri gibi hastalıkların tedavisinde, sperm dondurma işlemi, tedavi sonrası üreme yeteneğini korumada kritik bir rol üstlenmektedir (123).

Spermatogenezi Etkileyen İlaç Kullanımı; Nitrofurantoin, sulfasalazin ve simetidin gibi bazı ilaçların sperm üretimi üzerinde olumsuz etkileri bulunabilmektedir. Bu tür ilaçların kullanımı söz konusu olduğunda, sperm kriyoprezervasyonu önerilmektedir (124).

Ejakülasyon Problemleri; Spinal kord hasarı, cinsel işlev bozuklukları veya nörolojik hastalıklar nedeniyle doğal ejakülasyonun mümkün olmadığı durumlarda, sperm dondurma işlemi alternatif bir çözüm sunmaktadır (125).

Testiküler Cerrahi Öncesi; Varikosektomi, orşiektomi veya diğer testis ameliyatları öncesinde sperm dondurulması, operasyon sonrası meydana gelebilecek üreme fonksiyon kaybına karşı koruyucu bir önlem olarak değerlendirilmektedir (126).

Vazektomi Öncesi; Vazektomi, kalıcı bir doğum kontrol yöntemi olsa da, ilerleyen yıllarda çocuk sahibi olma isteği doğduğunda sperm dondurma işlemi gelecekteki olasılıklara karşı bir güvence sağlamaktadır (127).

İnfertilite Tedavileri; Testiküler sperm ekstraksiyonu ve aspirasyonu (TESE, TESA, MESA, PESA) gibi cerrahi tekniklerle elde edilen spermlerin ileri üreme

tedavilerinde kullanılabilmesi için kriyoprezervasyon yöntemi uygulanmaktadır (128).

Genetik Hastalıklar; Kistik fibroz ve diğer genetik hastalıklar, sperm üretimini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu tür vakalarda fertilitiyi koruma amacıyla sperm dondurma işlemi önerilmektedir (129).

Düşük Sperm Kalitesi (Oligospermi/Astenospermi); Sperm sayısı düşük olan veya motilitesi zayıf bireylerde, farklı zamanlarda toplanan sperm örneklerinin birleştirilerek yardımcı üreme tekniklerinde kullanılması için dondurulması avantaj sağlamaktadır (130).

Sağlıklı ve Fertil Erkekler; Yardımcı üreme yöntemlerinde kullanılmak üzere, sağlıklı ve fertil erkeklerden alınan sperm örnekleri gelecekteki kullanım için kriyoprezervasyon yoluyla saklanabilmektedir.

Sperm Donasyonu; Bazı ülkelerde yasal çerçevede sperm bağışı yapılmasına izin verilmekte olup, bağışlanan spermler ilerleyen süreçlerde kullanılmak üzere kriyoprezervasyon yöntemiyle saklanmaktadır (131).

Veterinerlik ve Hayvancılık; Hayvan yetiştiriciliğinde ve suni tohumlama uygulamalarında da sperm dondurma işlemi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (132).

3.8.8 Türkiye’de Sperm Kriyoprezervasyonu ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Türkiye’de sperm kriyoprezervasyonu uygulamaları, 06.03.2010 tarihinde yürürlüğe giren ve Sağlık Bakanlığı tarafından düzenlenen ‘*Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Hakkında Yönetmelik*’ kapsamında belirli yasal düzenlemelere tabidir. Bu yönetmelik çerçevesinde, yalnızca belirli tıbbi endikasyonlar mevcut olduğunda sperm ve gonad dokularının saklanması izin verilmektedir.

Yönetmelik doğrultusunda, sperm veya gonad dokularının saklanması yasal olarak kabul edildiği bazı tıbbi durumlar şu şekilde belirlenmiştir:

- TESE ve TESA gibi cerrahi prosedürlerle sperm elde edilen bireylerde, kriyoprezervasyon uygulanabilmektedir. Bu yöntemle alınan spermler, birden fazla yardımcı üreme tedavisinde kullanılabilmesi açısından saklanmaktadır (133).

- Gonadal hücrelere zarar verebilecek kanser tedavileri gibi gonadotoksik uygulamalara başlamadan önce sperm dondurma işlemi gerçekleştirilebilir. Kanser tedavisi görecektir hastalarda, tedavi sonrası üreme yetisini korumak amacıyla kriyoprezervasyon önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (133).
- Testis cerrahisi gibi üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebilecek operasyonlar öncesinde, sperm veya gonad dokuları saklanabilir. Özellikle testis tümörleri nedeniyle gerçekleştirilen cerrahi işlemler veya testis fonksiyonlarını tehlikeye atabilecek girişimler öncesinde sperm kriyoprezervasyonu önerilmektedir (133).

Bunun yanı sıra, yönetmelik kapsamında saklanan üreme hücreleri ve gonad dokularının güvenliğini sağlamak amacıyla vericiye ait DNA analizi yapılmakta ve bu bilgiler kaydedilmektedir. Bu uygulama, saklanan biyolojik materyallerin güvenliğini artırmak ve ilerleyen süreçte meydana gelebilecek olası karışıklıkları önlemek adına bir önlem olarak değerlendirilmektedir (133).

Mevcut yasal çerçeve doğrultusunda, kişisel veya sosyal gerekçelerle sperm kriyoprezervasyonu yapılmasına izin verilmemekte olup, yalnızca tıbbi endikasyonlar doğrultusunda uygulanabilmektedir.

3.9 Tıbbi Bitkiler ve Fertilite Üzerine Etkileri

Tıbbi bitkiler, geleneksel tedavi yöntemlerinde yaygın olarak kullanılan ve çeşitli sağlık problemlerinin iyileştirilmesinde etkili bileşenler içeren bitkilerdir. Bitkisel tedavi uygulamaları, binlerce yıllık bir geçmişe sahip olup günümüzde modern tıbbın tamamlayıcı bir unsuru olarak değerlendirilmektedir. Bu bitkilerin yaprakları, kökleri, tohumları, çiçekleri ve kabukları gibi farklı kısımları çeşitli tedavi amaçlarıyla kullanılmaktadır (134). Üreme sağlığı açısından tıbbi bitkiler, içerdiği biyokimyasal bileşikler sayesinde hem faydalı hem de potansiyel olarak zararlı etkilere sahip olabilir. Bazı bitkisel bileşenler erkek ve kadın fertilitelerini destekleyici özelliklere sahipken, bazıları dikkatli kullanılmadığında olumsuz sonuçlara yol açabilir (135). Bu nedenle, bitkisel ürünlerin üreme sağlığı üzerindeki etkileri bilimsel veriler ışığında titizlikle değerlendirilmelidir.

3.9.1 Zencefil (*Zingiber Officinale* Roscoe)



Şekil 12. Zencefil tarlası (*Zingiber Officinale Rosc.*)



Şekil 13. Zencefil bitkisinin kökleri (*Zingiber Officinale Rosc.*)



Şekil 14. Zencefil rizomu (*Zingiber Officinale Rosc.*)

Tropikal ve subtropikal bölgelerde yayılım gösteren Zingiberaceae familyası, 53 cins ve 1200'den fazla tür barındıran geniş bir bitki grubudur (136). Zingiberaceae, ait olduğu Zingiberales takımının en büyük familyası olup, kendine özgü aromatik özellikleriyle diğer bitkilerden kolayca ayırt edilebilmektedir. Aynı zamanda farklı kullanım alanlarına sahip olması nedeniyle en zengin bitki familyalarından biri olarak kabul edilmektedir. Bu familyaya ait türlerin büyük bir kısmı, yaklaşık 1000 türü, özellikle tropikal Asya bölgesinde yoğun olarak yayılım göstermektedir (137-139).

Bu familyanın öne çıkan üyelerinden biri olan zencefil (*Zingiber officinale* Rosc.), dünya genelinde en değerli baharat bitkileri arasında yer almaktadır (135). Çok yıllık bir otsu bitki olan zencefil, ılıman iklimlerde genellikle tek yıllık olarak yetiştirilir. Gıda ve tıbbi alanlarda en çok kullanılan kısımları, toprak altındaki rizomları ve kökleridir (138,140,141). Güneydoğu Asya kökenli olan zencefil, uzun yıllardır özellikle Asya mutfağında önemli bir baharat olarak tüketilmektedir. Zamanla Avrupa'ya ulaşarak popülerliği artmış ve günümüzde küresel ölçekte yoğun talep gören bir ürün haline gelmiştir.

Zencefil üretiminde Hindistan, dünya çapında en büyük üretici ve ihracatçı ülke konumundadır. Bunun yanı sıra Çin, Nepal, Tayvan, Filipinler, Fiji, Jamaika, Nijerya, Japonya, Tayland, Sierra Leone ve Avustralya da önemli üretici ülkeler arasında yer almaktadır (137,139).

3.9.2 Etkin Maddeleri ve Kullanım Alanları

Zingiber officinale, dünya genelinde zencefil adıyla bilinen ve uzun yıllardır hem baharat olarak hem de geleneksel tıpta tıbbi amaçlarla değerlendirilen önemli bir bitkidir (142). Taze veya kuru halde tüketilebilen zencefilin en yaygın kullanılan kısmı rizom kökleridir. Yapılan araştırmalar, zencefilin rizomlarında bulunan biyoaktif bileşenlerin coğrafi bölgeye, hasat edilen dönemdeki olgunluk seviyesine ve kullanılan ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bu bileşenler, zencefile kendine özgü aroma ve tat karakteristiğini kazandıran temel faktörlerdir (139, 143-146).

Fitokimyasal incelemeler, kuru zencefil rizomunun yaklaşık %3-6 sabit yağ, %9 protein, %60-70 karbonhidrat, %3-8 ham lif, %8 kül, %9-12 su ve %1-3 uçucu yağ içerdiğini göstermektedir. Taze zencefilde ise; %80.9 nem, %2.3 protein, %0.9 yağ, %1.2 mineral, %2.4 lif ve %12.3 karbonhidrat bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, demir, kalsiyum ve fosfor gibi minerallerin yanı sıra tiamin, riboflavin, niasin ve C vitamini gibi önemli vitaminler açısından da oldukça zengin bir bitki olduğu bildirilmiştir (147-149).

Zencefilin kendine has keskin lezzeti ve aromatik özellikleri, içeriğinde bulunan gingerol, shogaol, paradol ve zingerone gibi fitokimyasallardan kaynaklanmaktadır. Shogaol, özellikle yarı kurutulmuş zencefilde yüksek oranlarda bulunurken, taze formunda oldukça düşük seviyelerde yer almaktadır (139,149). Yarı kurutulmuş rizomların uçucu yağ içeriğinin %0,20 ile %0,32 arasında değiştiği belirlenmiştir (149).

Zencefilin uçucu yağ bileşimi incelendiğinde, en önemli aktif bileşenler arasında bisapolen, zingiberene ve zingerol öne çıkmaktadır. Bunun yanı sıra, farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağlarda monoterpen ve seskiterpen yapısına sahip çeşitli bileşikler tespit edilmiştir. Bunlar arasında camphene, β -phellandrene, curcumene, cineole, geranyl acetate, terphineol, terpenes, borneol, geraniol, limonene, β -elemene, linalool, α -zingiberene, β -sesquiphellandrene, β -bisabolene, zingiberenol ve β -farnesene gibi bileşikler yer almaktadır (139).

Yapılan bir başka araştırmada, zencefil uçucu yağının 28 ila 29 farklı bileşenden oluştuğu saptanmış olup, en baskın bileşenlerin sırasıyla zingiberene (%10.5-16.6), e-citral (%7.4-12.0), z-citral (%5.3-8.8), camphene (%4.9-7.6), ocimene (%0.9-6.5),

ar-curcumene (%2.9-9.8), β -farnesene (%5.1-8.4), β -farnesol (%3.9-5.8) ve β -sesquiphellandrene (%5.8-7.2) olduğu belirlenmiştir (149).

Zencefilin yaprak, sap ve rizomları, farmakolojik özellikler sağlayan ve doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilen polifenoller ve flavonoidler bakımından da oldukça zengin bir içeriğe sahiptir (150-152).

3.9.3 Geleneksel Tıpta Kullanımı

Zencefil (*Zingiber officinale*), içerdiği biyoaktif bileşenler sayesinde tıbbi açıdan oldukça değerli bir bitki olup, farklı kültürlerde geleneksel tıpta geniş çapta kullanılmıştır (139,145,149,153-156). Yaklaşık 2500 yıldır özellikle Çin ve Hint tıbbında önemli bir yer edinmiş ve çeşitli hastalıkların tedavisinde doğal bir destek olarak değerlendirilmiştir. Zencefilin rizomları, sindirim sistemini destekleyici etkisinin yanı sıra, kanama bozuklukları, romatizmal rahatsızlıklar, saç dökülmesi, diş ağrısı, yılan sokmaları ve solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (145,146,149,153-155,157,158).

Hindistan'da halk arasında taze zencefilin; soğuk algınlığı, mide bulantısı, astım, öksürük, karın ağrısı, kalp çarpıntısı, ödem, mide yanması, iştahsızlık ve romatizmal rahatsızlıkların giderilmesinde yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (145,146,149,153-155,157,158). Bunun yanı sıra, afrodizyak özellikleri nedeniyle cinsel sağlığı destekleyici etkileri olduğu düşünülmekte ve bazı toplumlarda bu amaçla tüketilmektedir. Bazı Afrika ülkelerinde ise, zencefilin sivrisinek kovucu özelliğinden faydalanılarak sıtma riskini azaltmak için kullanıldığına dair bilgiler bulunmaktadır (145,146,149,157).

Geleneksel tıpta zencefilin kadın sağlığı üzerindeki olumlu etkileri de dikkat çekicidir. Özellikle kadın hastalıklarının tedavisinde ve doğum sonrası iyileşme sürecinde faydalı olduğu ifade edilmektedir (156). Yapılan bazı bilimsel çalışmalar, zencefilin içeriğinde bulunan aktif bileşenler sayesinde romatizmal hastalıkların, dolaşım sistemi rahatsızlıklarının, mide ülseri dahil olmak üzere sindirim sistemi hastalıklarının, migren ağrılarının, mide bulantısı, baş dönmesi ve kusmanın önlenmesine yardımcı olabileceğini göstermektedir (139,145,146,149,153-155,157-161).

Bunun yanı sıra, zencefilin kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, soğuk algınlığı, astım, öksürük ve mide rahatsızlıkları gibi çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (152,162-164). Ayrıca, hareket hastalığına bağlı olarak gelişen baş dönmesi, mide bulantısı ve kusma gibi semptomların hafifletilmesinde de etkili olduğu bilinmektedir (165). Zencefil bitkisinin yaprakları da baharat olarak kullanılmasının yanı sıra, geleneksel tıpta farklı tedavi amaçlarıyla değerlendirilmiştir (156).



4 GEREÇ VE YÖNTEM

4.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma için öncelikli olarak, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 187 numaralı ve 14.06.2023 tarihli etik kurul onayı alındı. Çalışmaya, Dicle Üniversitesi Hastanesi Üroloji Kliniği'ne başvuran, 25-40 yaş aralığındaki 40 erkek hasta dahil edildi. Tüm katılımcılara, hasta verilerinin gizliliği ve paylaşımı konusunda detaylı bilgilendirme yapıldı ve semen örneklerinin kullanımı için gönüllü onam formları alındı.

Hastaların demografik özellikleri (sigara ve alkol kullanımı, vitamin tüketimi, son dönemde alınan hormonal veya kemoterapötik tedavi öyküsü ve varikozel varlığı) dışlandı. Çalışmaya dahil edilen bireyler, Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization) 2021 yılı laboratuvar kılavuzunda belirtilen normozoospermi kriterlerini (semen hacmi, toplam sperm sayısı, sperm konsantrasyonu, hareketlilik, canlılık ve morfoloji değerlerinin alt referans sınırlarına eşit veya üstünde olması) karşılayan erkeklerden seçildi. Çalışmada değerlendirilen semen örneklerinin analizleri yapılarak karakteristik özellikleri belirlendi ve kriterlere uygun olanlar dahil edildi. Örnekler; dondurma öncesi grup, dondurma-çözme sonrası grup ve dondurma medyumuna zencefil eklenmiş grup olmak üzere üçe ayrıldı.

Tablo 4. Çalışma grupları

1. GRUP: TAZE SEMEN	Dondurma Öncesi Sadece Gradient Yöntemi ile Yıkanmış
2. GRUP: KONTROL	Gradient + Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası
3. GRUP: ZENCEFİL	Gradient + Dondurma (Medyum+ Zencefil Ektraktı)-Çözme İşlemi Sonrası

4.2 Semen Temini ve Analizi

Semen örnekleri, 2-7 günlük cinsel perhiz sonrasında, mastürbasyon yöntemiyle steril, tek kullanımlık kapaklı plastik kaplara toplandı. Laboratuvarda spermiyogram testi için analiz edilecek kısmı ayrıldıktan sonra, kalan örnekler numaralandırılarak,

alındıkları tarih ve saat belirtilerek kaydedildi. Örnekler, 37°C’de 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılarak likefiye olmaları sağlandı.

Likefaksiyon işlemi tamamlandıktan sonra, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO 2021) laboratuvar kılavuzuna uygun şekilde rutin semen analizi gerçekleştirildi ve sperm parametreleri (konsantrasyon, hareketlilik, canlılık ve morfoloji) değerlendirildi. Tüm örnekler hem dondurma öncesinde (taze semen) hem de çözme işlemi sonrasında analiz edilerek, en az 200 sperm hücresi sayıldı ve ortalamaları hesaplandı. Elde edilen dondurma öncesi ve çözme sonrası değerler istatistiksel yöntemlerle karşılaştırılarak değerlendirildi.

4.3 Sperm Konsantrasyonu ve Motilite Tayini

Likefiye olmuş örneklerden 10 µl alınarak Makler (Sefimedical) sayım kamerasına yerleştirildi ve faz kontrast mikroskopunda x20 objektif büyütme ile incelendi. Sperm hareketliliği, ileri hareketli sperm (Progresif Motilite; PR), yerinde hareketli sperm (Nonprogresif Motilite; NP) ve hareketsiz sperm (İmmotilite; IM) kategorilerine ayrılarak değerlendirildi. Buna göre sperm dört farklı gruba sınıflandırıldı:

- (+4): Hızlı ileri hareket eden sperm,
- (+3): Yavaş ileri hareket eden sperm,
- (+2): Yerinde hareket eden sperm,
- (+1): Hareketsiz (immotil) sperm.

Her örnekte toplam 200 sperm hücresi sayılarak, hareketlilik oranları yüzdelik olarak belirlendi. Total motilite değeri, hareketsiz sperm hariç tutularak hesaplandı ve %42'nin üzerinde olan örnekler normal kabul edilerek çalışmaya dahil edildi (WHO 2021).

Ayrıca, sayım kamerasında 100 kare incelenerek, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı milyon/ml cinsinden hesaplandı. Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2021) kriterlerine göre, toplam sperm sayısı ≥ 39 milyon/ejekulat ve konsantrasyonu ≥ 16 milyon/ml olan normozoospermik örnekler çalışmaya dahil edildi.

4.4 Sperm Vitalite Değerlendirmesi

Sperm canlılığını değerlendirmek için Eozin Y boyası ile birlikte, spermilerin kontrastını artırarak daha net görünmelerini sağlayan Nigrosin boyası kullanıldı (Eozin-Nigrosin Boya Seti-GBL). Semen örneği, steril pipet yardımıyla yavaşça karıştırılarak homojen bir hale getirildi. Ardından, bir tüp içerisine 10 µl semen ve 20 µl Eozin-Y eklenerek 30 saniye bekletildi. Bu sürenin sonunda, 30 µl Nigrosin ilave edilerek hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan karışımdan bir damla lam üzerine yayılıp, yayma kurumadan lamelle kapatıldı ve x40 büyütmede mikroskop altında incelendi. Bu boyama yöntemi sayesinde, ölü hücrelerin kırmızı renkte, canlı hücrelerin ise boyanmadığı gözlemlendi. Toplamda 200 sperm sayılarak, canlılık oranı yüzdelik olarak hesaplandı. %54'ün üzerinde canlılık oranına sahip örnekler, Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2021) kriterlerine göre normal kabul edilerek çalışmaya dahil edildi.



Şekil 15. Eozin-Nigrosin boya seti

4.5 Sperm Boyama ve Morfoloji Değerlendirmesi

Spermilerin morfolojik değerlendirilmesi için preparatlar, Spermac boyama yöntemi (Spermac Stain-FertiPro) kullanılarak boyandı.

İlk olarak, temiz bir lam üzerine 10 µl semen örneği damlatıldı ve başka bir lam yardımıyla yayma işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan yayma, havada kuruyana kadar bekletildi. Tamamen kuruduktan sonra, preparatlar 15 dakika boyunca fiksatif içerisinde tutuldu. Fiksasyon süresi dolduktan sonra, preparatları fiksatiften arındırmak için su ile yıkandı. Bir kurutma kağıdı üzerinde dik bir şekilde tutmak suretiyle fazla suyu süzildükten sonra, sırasıyla Stain A ve Stain B boyama

solüsyonlarında 2 dakika, ardından Stain C solüsyonunda 30 saniye bekletilmek suretiyle boyama işlemi gerçekleştirildi.

Boyama tamamlandıktan sonra preparatlar havada kurutuldu ve x100 büyütmede immersiyon yağı kullanılarak mikroskop altında incelendi. Her örnekten 200 sperm sayılarak morfolojik değerlendirme yapıldı. Kruger kriterlerine göre, normal morfolojiye sahip sperm oranı $>4\%$ olan örnekler normal kabul edilerek çalışmaya dahil edildi (WHO 2021). Tespit edilen morfolojik anomalili spermler fotoğraflanarak kayıt altına alındı.



Şekil 16. Spermac Stain boyama kiti (A,B,C ve Fiksatif)

4.6 Gradient Tekniği ile Semen Hazırlanması

İnkübatörde likefiye olan semen örnekleri, 45% ve 90% oranında silika partikülü içeren gradient (kademeli ayırıştırma) çözeltisi kullanılarak hazırlandı (Sperm Grad-Vitrolife). Yüksek yoğunluklu 90% 'lık medyum tüpün alt kısmına yerleştirildi. Bunun üzerine, iki fazın birbirine karışmamasına dikkat edilerek, daha düşük yoğunluklu 45% 'lik medyum damla damla eklendi ve böylece kesintili dansite gradyanı oluşturuldu.

Hazırlanan dansite gradyanının üstüne semen, 1:1 oranında eklendikten sonra 1800 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra üst faz dikkatlice uzaklaştırıldı ve yerine sperm yıkama çözeltisi (SpermRinse-Vitrolife) eklendi. Ardından 1800 rpm'de 5 dakika daha santrifüj işlemi uygulandı.

İkinci santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve tekrar sperm yıkama çözeltisi ilave edildi. Elde edilen sperm süspansiyonundan 20 μ l alınarak Acridine Orange boyama işlemi için lama yayıldı. Kalan sperm süspansiyonu ise dondurma işlemi için üç ayrı kısma ayrıldı.



Şekil 17. Sperm yıkama ve Dansite Gradient medyumları (%45-%90)

4.7 Zencefil (*Zingiber Officinale*) Ekstraktının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan zencefil rizomları, farmasötik standartlara uygun ve tıbbi kullanıma elverişli, GMP (Good Manufacturing Practice) sertifikalı organik ürünler sağlayan bir tedarikçiden temin edildi. Kök zencefiller özenle yıkanıp kabukları soyulduktan sonra, ince dilimler halinde kesildi ve temiz bir kurutma kağıdı üzerine yayılıp gölge bir ortamda kurutulmaya bırakıldı. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, kurutulmuş örnekler blender ile öğütülerek ince toz haline getirildi.

Çalışmada kullanılacak zencefil dozu, literatür verileri temel alınarak belirlendi. Yapılan ön deneyler sonucunda, nihai ideal konsantrasyonun %0,01 olması uygun görüldü. Bu amaçla, 10 mg tartılan zencefil tozu, 100 ml PBS Sigma-Aldrich (fosfat tamponlu salin) içerisine eklendi ve 6-12 saat boyunca oda sıcaklığında maserasyona bırakıldı. Maserasyon süresi boyunca karışım periyodik olarak karıştırıldı. Süre sonunda, elde edilen karışım Whatman No.1 süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü ve ekstrakt çalışmada kullanılmak üzere ağzı parafilmle kapatılarak +4°C’de uygun koşullarda muhafaza edildi (166).



Şekil 18. PBS Tampon çözeltisi

4.8 Sperm Kriyoprezervasyonu ve Çözme İşlemi

Sperm dondurma işlemi için hazırlanan semen örnekleri; dondurma öncesi grup, dondurma-çözme sonrası grup, dondurma medyumuna zencefil ekstraktı eklenen grup olmak üzere üçe ayrıldı.

1. Taze semen grubuna; gradient işlemi dışında herhangi bir işlem uygulanmadı.
2. Kontrol grubuna; gradient sonrası dondurma-çözme işlemi uygulandı.
3. Zencefil grubuna; gradient sonrası dondurma medyumuna, PBS’de çözölmüş %0,01’lik zencefil ekstraktı eklendi ve çözme işlemi uygulandı.

Sperm dondurma işlemi, hazır olarak temin edilen SpermFreeze Solution (Vitrolife) kriyoprotektan solüsyonu kullanılarak uygulandı. İşlem basamakları şu şekildeydi:

1. Gradient tekniği ile hazırlanmış semen örnekleri, dondurma öncesi üç gruba ayrıldı (Taze semen, Kontrol, Zencefil).
2. Kontrol ve Zencefil gruplarındaki örneklere, kriyoprotektan solüsyonu 1:1 oranında, damla damla ilave edilerek karıştırıldı. (Zencefil grubunda, kriyoprotektan ile birlikte 1:1 oranında PBS’de çözölen %0,01’lik zencefil ekstraktı da eklendi).
3. Hazırlanan karışımlar, kriyoviyal tüplere aktarılıp 15 dakika boyunca kriyoprotektan ile dengeleme aşamasına bırakıldı.
4. Dengeleme sürecini tamamlayan örnekler, sıvı azot seviyesinden 5-10 cm yükseklikteki azot buharında 45 dakika bekletildi.
5. Daha sonra, -196°C’de sıvı azot tankına daldırılarak bir hafta boyunca muhafaza edildi.

Çözme işlemi için azot tanklarından çıkarılan kriyoviyaller;

1. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi, ardından 37°C'lik su banyosuna yerleştirilerek hafif hareketlerle 10 dakika boyunca çözülmesi sağlandı.
2. Çözölmüş numuneler santrifüj tüplerine aktarıldı ve kriyoprotektan uzaklaştırılması için 2 ml sperm yıkama medyumunu (SpermRinse) eklendi. Daha sonra 1800 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve üst faz dikkatlice aspire edilerek uzaklaştırıldı.
3. Elde edilen pellet, 0,2 ml hacimde sperm yıkama medyumunu ile yeniden süspansiyon haline getirildi.

Bütün bu işlemlerin tamamlanmasının ardından örnekler; canlılık (vitalite), motilite ve DNA fragmentasyonu açısından tekrar analiz edildi.



Şekil 19. Sperm dondurma medyumunu (kriyoprotektan solüsyon)

4.9 Sperm DNA Fragmentasyonunun Acridine Orange ile Değerlendirilmesi

Gradient işlemi sonrasında elde edilen sperm süspansiyonundan 20 µl alınarak, temiz bir lam üzerine dikkatlice yayıldı ve kurumaya bırakıldı. Kurumuş yaymalar, Carnoy fiksatif (GBL) içinde 1 saat boyunca sabitlenerek fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Fiksasyon tamamlandıktan sonra preparatlar, stok çözelti ile günlük olarak hazırlanmış Acridine Orange boyası (Invitrogen) ile karanlık ortamda 5 dakika boyunca boyandı. Boyama işlemi sonrasında fazla boya, distile su kullanılarak uzaklaştırıldı. Ardından, temiz bir kurutma kâğıdı yardımıyla preparatların üzerinde kalan su dikkatlice alındı.

Hazırlanan yaymalar, floresan mikroskop altında incelenerek ortalama 200 sperm hücresi analiz edildi. Yeşil floresan yayan spermiler normal DNA içerenler, sarı-

turuncu-kırmızı floresan yayan spermier ise fragmente DNA içerenler olarak değerlendirildi.

Örnekler, yaydıkları floresan ışığının rengine göre iki gruba ayrıldı:

- AO Negatif: Yeşil floresan yayan spermier,
- AO Pozitif: Sarı, turuncu, kırmızı floresan yayan spermier.

Son olarak, DNA fragmentasyon yüzdesi hesaplanarak veriler değerlendirildi.



Şekil 20. Acridine Orange toz boya

4.10 İstatiksel Analiz

Değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler ile birlikte rapor edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu, Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak değerlendirildi.

Normal dağılım gösteren bağımlı grupların tekrarlı ölçümleri için Tekrarlı lmler için Varyans Analizi (ANOVA) uygulandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p=0,05$ olarak belirlendi ve $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

İstatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilen durumlarda, gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla post-hoc analizler gerçekleştirildi. Tüm istatistiksel hesaplamalar, IBM SPSS Statistics Version 22.0 yazılımı kullanılarak yapıldı.

5 BULGULAR

Bu çalışmaya, Ocak-Şubat 2024 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Hastanesi Üroloji Kliniği'ne başvuran, 25-40 yaş arası, 40 gönüllü erkek hasta dahil edildi. Çalışma kriterlerine uyan bu 40 normozoospermik hastanın semen analizleri yapılarak; semen hacmi, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, hareketli sperm yüzdesi, ileri hareketli sperm yüzdesi, hareketsiz sperm yüzdesi, normal morfoloji gösteren sperm yüzdesi ve canlılık yüzdesi belirlendi. Yaş ve semen analizine ilişkin tanımlayıcı veriler Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Yaş, semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, toplam hareketli, ileri hareketli ve hareketsiz sperm yüzdeleri ile vitalite ve morfoloji yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler. Örneklem (n)=40; Anlamlılık değeri $p<0,05$.

	Ortalama± Standart sapma (Ort±SD)	Minimum (Min)	Maksimum (Max)
Yaş (yıl)	32,98±3,86	26	40
Hacim (ml)	2,18±0,44	1,5	3,0
Konsantrasyon (milyon/ml)	43,59±38,29	17,5	147,0
Total sperm sayısı (milyon/ml)	92,41±90,78	41	348,0
Total hareket (%)	65,36±14,49	43,0	92,0
İleri hareket (%)	57,01±16,85	31,0	88,0
Hareketsiz (İmmotil) (%)	31,27±15,08	8,0	59,0
Vitalite (%)	76,5±11,53	57,0	96,0
Morfoloji (%)	12,21±5,32	4,0	28,0

5.1 Zencefilin Kriyoprezervasyon Sonrası Sperm Vitalitesi Üzerine Etkisi

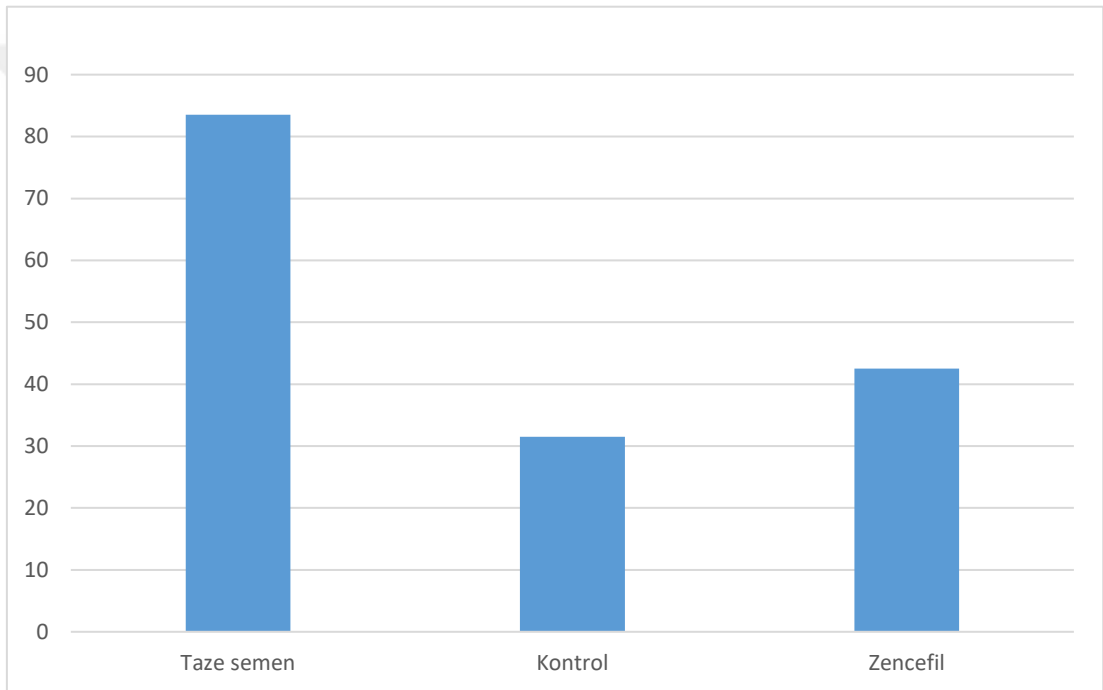
Sperm vitalite (canlılık) tayini Eosin-Nigrosin uygulaması ile yapıldı. Her örnekte 200 sperm sayılarak yüzde oranları belirlendi (Tablo 6)

Vitalite açısından; sadece gradient uygulanmış dondurma öncesi grup (Taze semen) ile dondurma sonrası grupların (Kontrol, Zencefil) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$). Kontrol ve Zencefil gruplarının

ortalaması Taze semen grubunun ortalamasından çok daha düşüktü (Şekil 21). Dondurma sonrası gruplar kıyaslandığında ise Zencefil eklenmiş grubun vitalitesinde anlamlı düzeyde bir artış olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 21).

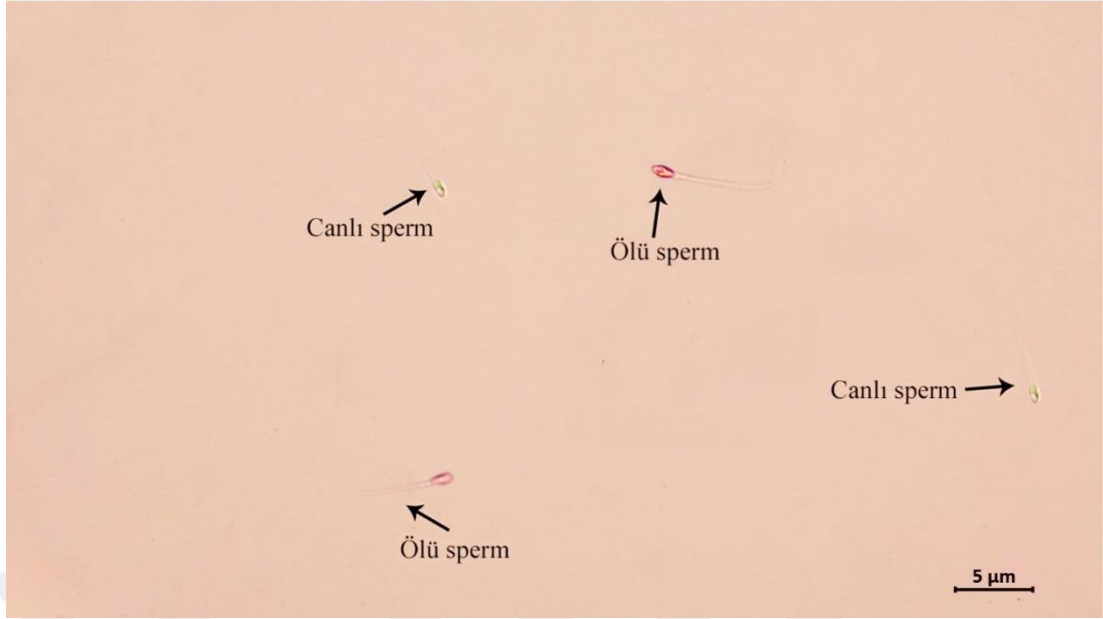
Tablo 6. Sperm vitalite (canlılık) yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler.

	Ort±SD	Min	Max
Taze semen	83,5±6,5	64	95
Kontrol	31,5±7,0	11	53
Zencefil	42,5±6,7	23	62



Şekil 21. Sperm vitalite (canlılık) yüzdelere ilişkin gruplar arasında karşılaştırılması

Spermiler; Eozin-Nigrosin yöntemi ile boyanıp canlılık açısından değerlendirildi. Ölü hücreler kırmızıya boyanırken, canlı hücrelerin boyanmadığı görüldü. Canlı ve ölü spermier x40 büyütmede görüntülendi (Şekil 22).



Şekil 22. Eozin-Nigrosin ile boyanan preparatlarda ölü ve canlı sperm (x40).

5.2 Zencefilin Kriyoprezervasyon Sonrası Sperm Morfolojisi Üzerine Etkisi

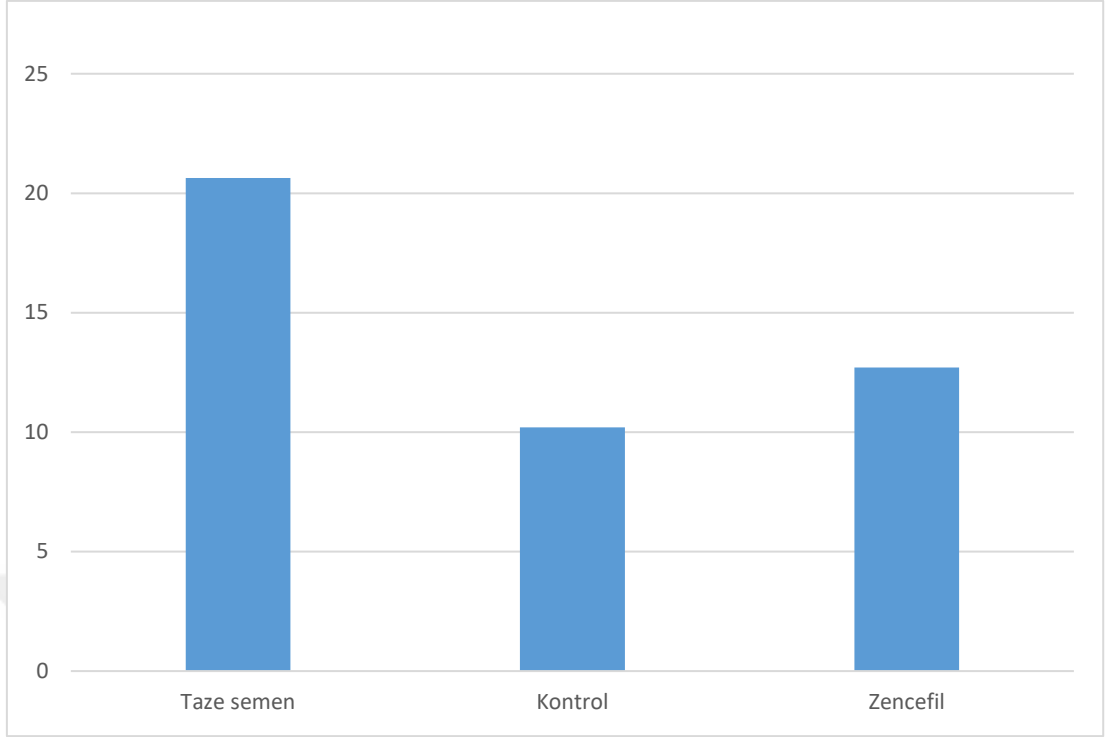
Morfolojik değerlendirmeler Spermac boyama yöntemi ile yapıldı. WHO 2021 kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdeleri, her örnekte 200 sperm sayılarak hesaplandı (Tablo 7).

Morfoloji açısından; sadece gradient uygulanmış dondurma öncesi grup (Taze semen) ile dondurma sonrası grupların (Kontrol, Zencefil) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p < 0,05$). Kontrol ve Zencefil gruplarının ortalaması Taze semen grubunun ortalamasından daha düşüktü (Şekil 23).

Dondurma sonrası gruplar kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$) (Şekil 23).

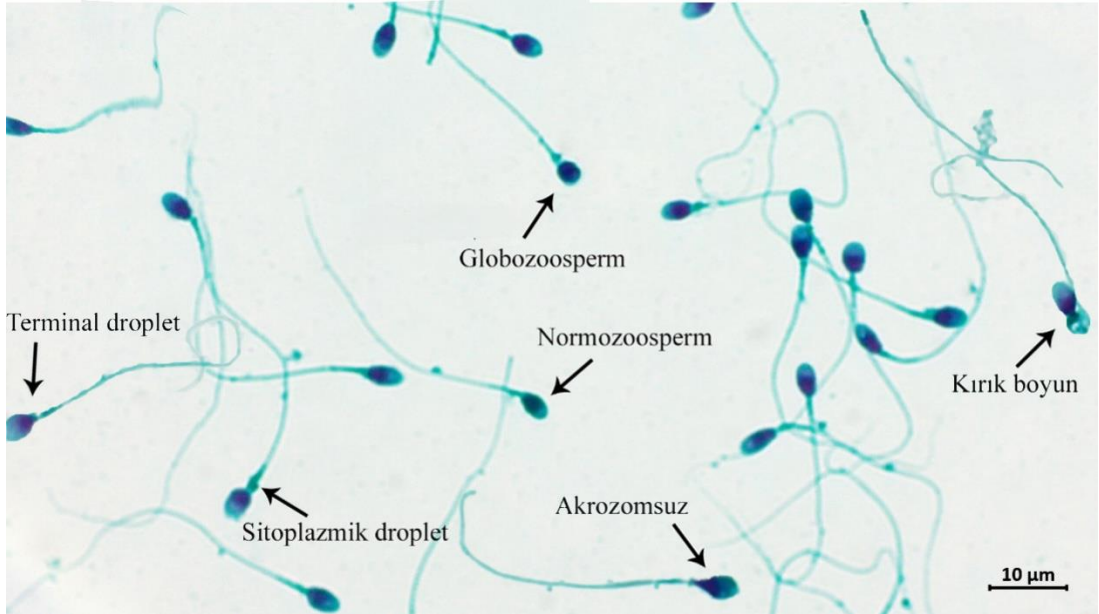
Tablo 7. Normal morfolojiye sahip sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.

	Ort±SD	Min	Max
Taze semen	20,64±5.61	4	33
Kontrol	10,2±3,8	2	18
Zencefil	12,7±4,2	3	22

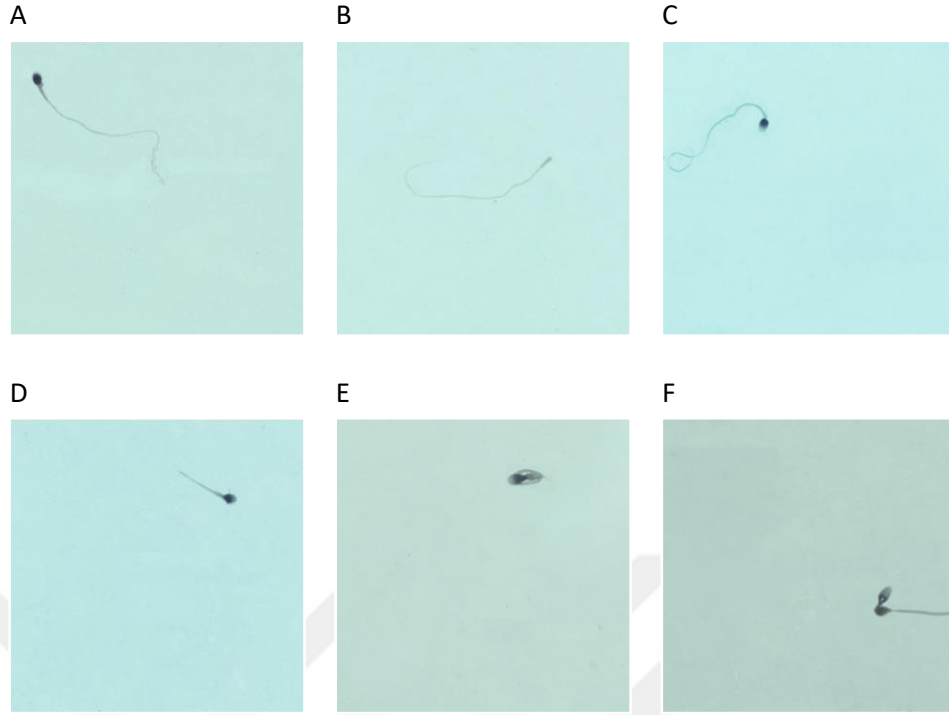


Şekil 23. Normal morfolojiye sahip sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

Spermiler, Spermac yöntemi ile boyanıp, morfolojik açıdan değerlendirildi. Normal ve anormal yapıya sahip spermiler, immersiyon yağı ile x100 büyütmede görüntülendi. Saptanan morfolojik anomalili spermilerin fotoğrafları çekildi (Şekil 24,25).



Şekil 24. Normal ve anormal morfolojik yapıdaki spermiler (Spermac stain) (x100).



Şekil 25. Sperm baş, boyun ve kuyruk defektleri (Spermac Stain) (x100). A:Globozoosperm B:İğne başlı sperm C:Terminal droplet D:Kısa kuyruk E:Sarmal kuyruk F:Bükük boyun

5.3 Zencefilin Kriyoprezervasyon Sonrası Sperm Motilitesi Üzerine Etkisi

Sperm motilitesi Makler sayma kamerası ile faz kontrast mikroskopunda x20 objektif altında incelendi. Total hareketli sperm yüzdesi ile ileri hareketli sperm yüzdeleri hesaplandı (Tablo 8).

Total hareket açısından; sadece gradient uygulanmış dondurma öncesi grup (Taze semen) ile dondurma sonrası grupların (Kontrol, Zencefil) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$). Kontrol ve Zencefil gruplarının ortalaması Taze semen grubunun ortalamasından oldukça düşüktü (Şekil 26).

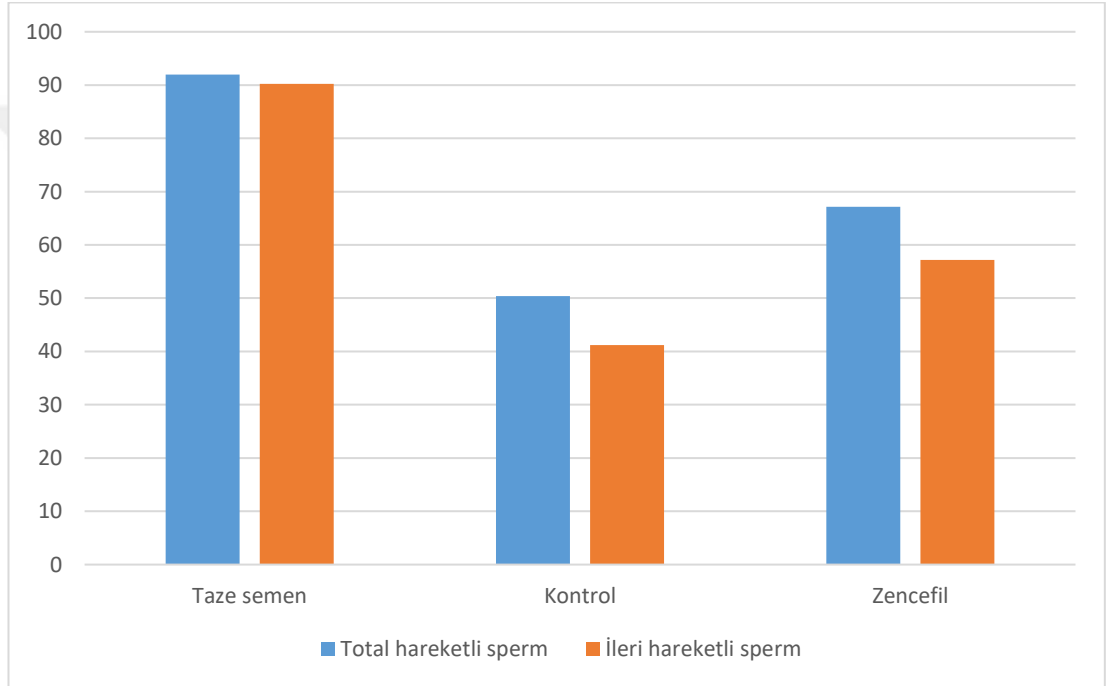
Dondurma sonrası gruplar kıyaslandığında ise Zencefil eklenmiş grubun total hareketliliğinde anlamlı düzeyde bir artış olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 26).

İleri hareket açısından; sadece gradient uygulanmış dondurma öncesi grup (Taze semen) ile dondurma sonrası grupların (Kontrol, Zencefil) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$). Kontrol ve Zencefil gruplarının ortalaması Taze semen grubunun ortalamasından daha düşüktü ($p<0,05$) (Şekil 26).

Dondurma sonrası gruplar kıyaslandığında ise Zencefil eklenmiş grubun ileri hareketliliğinde anlamlı düzeyde bir artış olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 26).

Tablo 8. Sperm motilitesine ilişkin tanımlayıcı veriler.

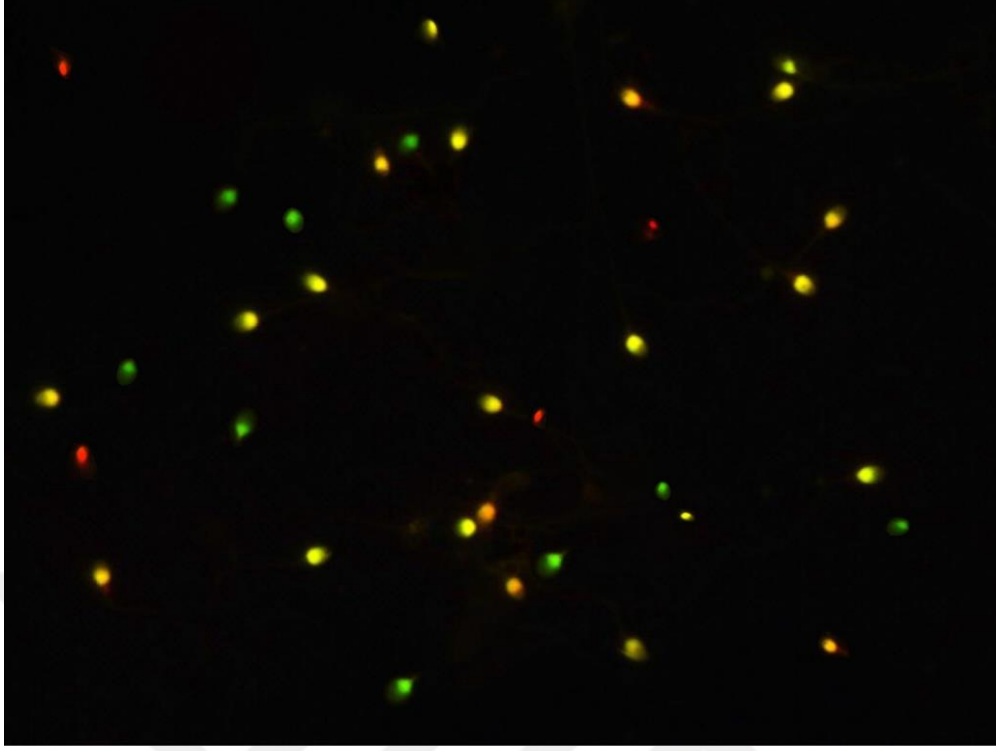
	Total hareketli sperm (%) Ort±SD	İleri hareketli sperm (%) Ort±SD
Taze semen	91,95±2,38	90,21±5,32
Kontrol	50,41±13,51	41,20±10,45
Zencefil	67,17±14,53	57,19±10,45



Şekil 26. Total hareketli sperm ve ileri hareketli sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

5.4 Zencefilin Kriyoprezervasyon Sonrası Sperm DNA Fragmentasyonuna Etkisi

Sperm DNA fragmentasyonu Acridine Orange testi ile değerlendirildi. Her preparatta ortalama 200 sperm incelenip; yeşil floresan veren spermiler sağlam DNA içerenler, sarı-turuncu-kırmızı floresan veren spermiler ise fragmente DNA içerenler olarak değerlendirildi (Şekil 27). Örnekler verdiği floresan rengine göre; AO Pozitif (kırmızı -turuncu-sarı floresan verenler), AO Negatif (yeşil floresan verenler) olmak üzere iki gruba ayrıldı ve DNA fragmentasyon yüzdeleri çıkarıldı (Tablo 9).



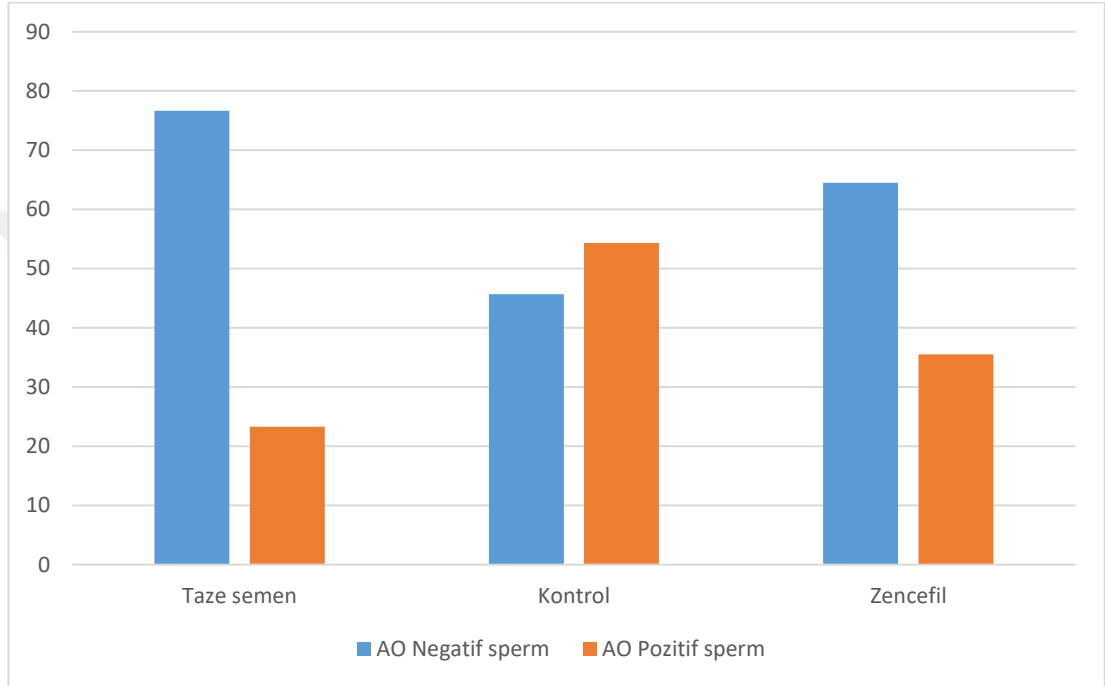
Şekil 27. Sperm DNA Fragmantasyonu (AO boyama, floresan mikroskop) (x630). Kırmızı, turuncu, sarı floresan verenler--Fragmante DNA'lı spermiler. Yeşil floresan verenler--Sağlam DNA'lı spermiler

Sperm DNA Fragmantasyonu açısından; sadece gradient uygulanmış dondurma öncesi grup (Taze semen) ile dondurma sonrası grupların (Kontrol, Zencefil) Acridin Orange ile yeşil floresan veren sağlam DNA'lı (AO Negatif) sperm yüzdeleri karşılaştırıldı. Taze semen grubu ile Kontrol ve Zencefil gruplarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$). Kontrol ve Zencefil gruplarının AO Negatif ortalaması Taze semen grubunun ortalamasından çok daha düşüktü (Şekil 28).

Dondurma sonrası gruplar kıyaslandığında ise Zencefil eklenmiş grubun AO Negatif sperm ortalaması, Kontrol grubunun ortalamasından daha yüksekti ($p<0,05$) (Şekil 28).

Tablo 9. Sperm DNA fragmentasyonuna ilişkin tanımlayıcı veriler.

	AO Negatif sperm (%) Ort±SD	AO Pozitif sperm (%) Ort±SD
Taze semen	76,68±9,86	23,32±9,77
Kontrol	45,67±12,52	54,33±12,49
Zencefil	64,48±10,47	35,52±10,53



Şekil 28. AO Negatif sperm ve AO Pozitif sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

6 TARTIŞMA

Sperm hücreleri, kriyoprezervasyon ve çözme süreçleri boyunca sıcaklık değişimleri, buz kristali oluşumu, ozmotik stres, reaktif oksijen türlerinin (ROT) artışı ve kriyoprotektan toksisitesi gibi çeşitli etkenlere maruz kalarak kriyohasara uğramaktadır. Kriyoprezervasyon sürecinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri oksidatif strestir (167). Reaktif oksijen türleri, sperm hücre zarına ve DNA bütünlüğüne zarar vererek, sperm hareketliliğinde ve canlılığında azalmaya neden olabilmektedir (168). Bu nedenle, sperm hücrelerini oksidatif hasardan korumak amacıyla dondurma medyumlarına antioksidan eklenmesi gün geçtikçe daha fazla ilgi çeken araştırmaların başında gelmektedir. Bu çalışmada da sperm kriyoprezervasyonu sonrası meydana gelen DNA hasarını değerlendirmek ve Zencefil (*Zingiber officinale*) ekstraktının potansiyel koruyucu etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

Literatürdeki çalışmalar, kriyoprezervasyon işleminin sperm hücreleri üzerinde çeşitli olumsuz etkiler yarattığını ortaya koymaktadır. Özellikle sperm canlılığı, hareketliliği ve DNA bütünlüğündeki kayıplar en dikkat çeken etkiler arasındadır (169-172). Kriyoprezervasyon sonrası, çözme işleminin ardından sperm canlılık oranlarında %30-50'ye varan azalmalar olduğu belirtilmektedir (171,173-176). Ayrıca, farklı kriyoprotektan maddeler ve çeşitli kriyoprezervasyon teknikleri kullanılmasına rağmen, bugüne kadar yapılan çalışmalar çözme işlemi sonrası sperm hareketliliğinde %30 ila %75 oranında azalma olduğunu göstermektedir (169-172).

Çalışmamızda elde edilen bulgular da benzer şekilde, dondurup çözme sonrası sperm parametrelerinden vitalite ve motilite oranlarında belirgin bir düşüş olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, zencefil ekstraktı eklenen grupta, sperm parametrelerinde kayda değer iyileşmeler gözlemlenmiştir.

Zencefilin antioksidan özellikleri üzerine yapılan araştırmalara bakıldığında, bu bitkinin testis fonksiyonları ve sperm sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu ortaya konmuştur. Amin ve Hamza (2006) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, zencefilin erkek farelerde testiküler antioksidan enzim aktivitesini artırdığı ve sperm hareketliliğini iyileştirdiği belirtilmiştir. Benzer şekilde, Morakinyo ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir araştırmada, 28 gün boyunca günlük 1000 mg/kg

dozunda zencefil verilen farelerde, 14. günden itibaren epididimal sperm konsantrasyonu ve motilitesinde belirgin bir artış tespit edildiği rapor edilmiştir (177).

Zencefilin sperm hücreleri üzerindeki koruyucu etkisini değerlendiren önceki çalışmalar, bu bitkinin antioksidan özellikleri sayesinde spermatogenez ve sperm fonksiyonları üzerinde destekleyici etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır (15,16). Zencefilin içeriğinde bulunan gingerol, shogaol ve paradol gibi biyoaktif bileşiklerin, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidatif hücresel hasarı azalttığı bilinmektedir (178).

Çalışmamızda, kriyoprezervasyon sonrası zencefil ekstraktı eklenen grupta sperm canlılık ve hareketlilik oranlarında anlamlı bir iyileşmenin gözlenmesi, bu bulgularla paralellik göstermektedir.

Kriyoprezervasyonun sperm DNA'sı üzerindeki etkileri konusunda literatürde hâlâ net bir fikir birliği bulunmamaktadır. Ancak, çalışmamızda normozoospermik semen örneklerinde, dondurma işlemi öncesi ve çözme sonrasında Acridine Orange (AO) yöntemi kullanılarak yapılan değerlendirmelerde, DNA fragmentasyonunda anlamlı bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz bulguları destekleyen araştırmalar olduğu gibi (159,160), bazı çalışmalar ise kriyoprezervasyonun sperm DNA bütünlüğü üzerinde belirgin bir olumsuz etkiye neden olmadığını ileri sürmektedir (161–163). Bu çelişkili sonuçlar, kullanılan semen hazırlama teknikleri, dondurma ve çözme protokolleri, DNA bütünlüğünü değerlendiren test yöntemleri ve çalışmalarda kullanılan semen örneklerinin alındığı türlerdeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte, kriyoprezervasyon sonrasında anormal semen örneklerinde DNA fragmentasyon oranlarının normal örneklerle kıyasla daha yüksek olduğunu bildiren araştırmalar da mevcuttur (164–166). Ayrıca, infertil bireylere ait semen örneklerinde, fertil bireylere göre daha fazla fragmente DNA içeren sperm hücresinin bulunduğu gösterilmiştir (161,167,168). Bireyler arasındaki biyolojik farklılıkların, literatürdeki farklı sonuçların ortaya çıkmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

DNA hasarının kriyoprezervasyon sonrası arttığını bildiren çalışmaların çoğu, bu durumun oksidatif stres ile doğrudan bağlantılı olduğunu vurgulamaktadır (167,169). Reaktif oksijen türleri (ROT), DNA fragmentasyonu, baz modifikasyonları, delesyonlar ve diğer moleküler mekanizmalar aracılığıyla hem nükleer hem de

mitokondriyal DNA üzerinde hasara yol açabilmektedir (170). Ayrıca, DNA bütünlüğünü bozan mekanizmalar arasında yetersiz kromatin paketlenmesi ve apoptoz da yer almaktadır (152,171,172). Tüm bu mekanizmaların eş zamanlı çalışarak DNA hasarına neden olabileceği öne sürülmektedir. Bununla birlikte, ROT'nin kaspaz aktivasyonu yoluyla apoptozu tetikleyerek DNA üzerinde ek bozulmalara neden olduğu da bildirilmiştir (167,173).

Oksidatif DNA hasarının önemli biyobelirteçlerinden biri olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyelerinin, infertil erkeklerin spermatozoalarında daha yüksek olduğu saptanmıştır. 8-OHdG seviyelerindeki artışın, sperm konsantrasyonunda, toplam sperm sayısında ve hareketlilik oranında azalmaya neden olurken, özellikle baş defektleri gibi morfolojik anormalliklerde artışa yol açtığı belirlenmiştir (174,175).

Buna ek olarak, oksidatif DNA hasarının in vitro blastokist gelişim oranlarını da olumsuz etkilediği gösterilmiştir (176,177). Literatürdeki klinik veriler, sperm DNA hasarının, özellikle gebelik oranları başta olmak üzere yardımcı üreme teknikleri (ART) ile elde edilen başarı oranlarını düşürdüğünü ortaya koymaktadır (152,170).

Zencefilin sperm DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, Jalil Hosseini ve arkadaşlarının 2016 yılında gerçekleştirdiği bir araştırma, zencefilin infertil erkeklerde sperm DNA fragmentasyon oranlarını azaltmada etkili olduğunu göstermiştir (179).

Çalışmamızda da zencefil ekstraktı eklenen grupta DNA fragmentasyon oranının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, zencefilin içeriğinde bulunan güçlü antioksidan bileşiklerin, reaktif oksijen türevlerini nötralize ederek oksidatif DNA hasarını azaltabileceğini düşündürmektedir.

Zencefil ekstraktının sperm hücreleri üzerindeki koruyucu etkisinin hangi biyokimyasal mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak ilerleyen çalışmalarda, farklı dozajlar ve uygulama süreleri test edilerek, zencefilin sperm mitokondriyal fonksiyonları üzerindeki potansiyel etkilerinin detaylı bir şekilde incelenmesi önerilmektedir. Bu çalışmanın da yapılacak olan ileri araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

7 SONUÇ

Bu çalışmada, sperm kriyoprezervasyonu sürecinde meydana gelen DNA hasarının önlenmesinde zencefil ekstraktının potansiyel etkileri araştırılmıştır. Bulgularımız, dondurma-çözme işlemi sonrasında sperm canlılığı, hareketliliği ve DNA bütünlüğünde kayıplar olduğunu doğrulamış, ancak zencefil ekstraktı eklenen grupta bu parametrelerin iyileştiğini göstermiştir.

Zencefilin güçlü antioksidan özelliği hem spontan gebeliklerde hem de yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) sperm kalitesini artırıcı bir bileşen olabileceğini ortaya koymaktadır. Sperm DNA fragmentasyonunu azaltıcı etkisi, fertilizasyon ve embriyo gelişimi açısından önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen veriler, zencefilin erkek fertilitasını destekleyici etkileri olabileceğini ve kriyoprezervasyon sonrası sperm fonksiyonlarının korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Gelecekte yapılacak daha kapsamlı klinik ve deneysel çalışmalar, zencefilin erkek üreme sağlığı üzerindeki biyolojik mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını ve yardımcı üreme tedavilerine entegrasyonunu sağlayabilir.

8 KAYNAKLAR

1. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
2. Hamada, A., Esteves, S. C., Nizza, M., & Agarwal, A. (2014). Unraveling the mystery behind oxidative stress and male infertility: A comprehensive review. *Fertility and Sterility*, 102(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.013>
3. Costa, M., Cedenho, A., & Lucon, A. (2019). Cryopreservation of human sperm: The state of the art. *JBRA Assisted Reproduction*, 23(1), 21–26. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20190006>
4. Said, T. M., Gagliano-Juca, T., & Agarwal, A. (2010). Sperm cryopreservation: Is there a risk for oxidative stress? *Asian Journal of Andrology*, 12(1), 33–38. <https://doi.org/10.1038/aja.2009.52>
5. Paoli, D., Gallo, M., Riso, F., Pallotti, F., Lenzi, A., & Lombardo, F. (2014). Sperm cryopreservation: Effects on chromatin structure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 791, 137–150. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9_8
6. Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., & Lansac, J. (1996). Cryopreservation of spermatozoa: A 1996 review. *Human Reproduction Update*, 2, 147–156. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.2.147>
7. Lu, X., Zhang, Y., Bai, H., Liu, J., Li, J., & Wu, B. (2018). Mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO improves the post-thaw sperm quality. *Cryobiology*, 80, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.12.002>
8. Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Zieschang, J. A., & Clark, A. M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24(9), 2061–2070. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep132>

9. Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., & Burton, P. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 18(2), 184–189. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60255-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60255-8)
10. Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: A review. *Cell and Tissue Banking*, 17(4), 745–756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
11. Ali, B. H., Blunden, G., Tanira, M. O., & Nemmar, A. (2008). Some phytochemical, pharmacological, and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 409–420. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.085>
12. Dugasani, S., Pichika, M. R., Nandakumar, K., Jadhav, S. S., Jagtap, S., & Tupkari, S. (2010). Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of gingerol and shogaol. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.005>
13. Park, M., Bae, J., & Lee, D. S. (2013). Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-shogaol isolated from ginger against periodontal bacteria. *Phytotherapy Research*, 27(4), 1196–1200. <https://doi.org/10.1002/ptr.4858>
14. Nassiri, M., Khaki, A., Ahmadi-Ashtiani, H. R., Rezazadeh, S., & Rastgar, H. (2009). Effects of ginger on spermatogenesis in streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Medicinal Plants*, 8(31), 118–124.
15. Amin, A., & Hamza, A. E. A. (2006). Effects of Roselle and ginger on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology*, 8(5), 607–612. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00184.x>
16. Morakinyo, A., Adeniyi, O., & Arikawe, A. (2008). Effects of *Zingiber officinale* on reproductive functions in the male rat. *African Journal of Biomedical Research*, 11(3), 329–334.
17. Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (2016). *Histology and cell biology: An introduction to pathology* (4th ed.). Elsevier.
18. Ross, M. H., Pawlina, W., & Wojciech, P. (2016). *Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology* (7th ed.). Wolters Kluwer.

19. Junqueira, L. C., Carneiro, J., & Kelley, R. O. (2009). *Basic histology: Text & atlas* (12th ed.). McGraw-Hill.
20. Clulow, J., Jones, R. C., Hansen, L. A., & Man, S. Y. (1998). Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113(1), 1–14. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1130001>
21. Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2014). *Color textbook of histology* (4th ed.). Saunders.
22. Eroschenko, V. P., & Di Fiore, M. S. H. (2013). *DiFiore's atlas of histology with functional correlations* (12th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
23. Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2014). *Color atlas of histology* (pp. 434–450). Lippincott Williams & Wilkins.
24. Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2016). *Before we are born: Essentials of embryology and birth defects*. Elsevier.
25. Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 13(suppl_1), 1–8. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.1
26. Gedikli, S., Özbek, E., & Demirci, T. (2013). Fertilizasyonun moleküler temeli. *Van Tıp Dergisi*, 20(4), 294–301.
27. Sadler, T. W. (2005). *Langman's medical embryology* (Çev. A. C. Başak). Palme Yayıncılık.
28. Jha, K. N., Salicioni, A. M., Arcelay, E., Chertihin, O., Kumari, S., Herr, J. C., et al. (2006). Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 12(12), 781–789. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal080>
29. Laflamme, J., Akoum, A., & Leclerc, P. (2005). Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6. *Molecular Human Reproduction*, 11(2), 141–150. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah143>
30. Androloji. (tarih yok). Erkek sağlığı: Üreme sağlığı - Cinsel fonksiyon bozuklukları. *Androloji.info*. http://www.androloji.info/kapasitasyon_patofizyoloji.php

31. Zarintash, R. J., & Cross, N. L. (1996). Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biology of Reproduction*, 55(1), 19–24. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.19>
32. Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C., & Forti, G. (1996). Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation, and lipid remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience*, 15(1), 189–205. <https://doi.org/10.2741/189>
33. Leclerc, P., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1998). Interaction between Ca^{2+} , cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 19(4), 434–443. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb02004.x>
34. Mandal, A., Naaby-Hansen, S., Wolkowicz, M. J., Klotz, K., Shetty, J., Retief, J. D., et al. (1999). FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 61(5), 1184–1197. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.5.1184>
35. Burks, D. J., Carballada, R., Moore, H. D., & Saling, P. M. (1995). Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science*, 269(5220), 83–86. <https://doi.org/10.1126/science.7604289>
36. Wassarman, P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C., Qi, H., et al. (1999). Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology*, 285(3), 251–258. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19991001\)285:3<251::AID-JEZ7>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19991001)285:3<251::AID-JEZ7>3.0.CO;2-D)
37. Prasad, S. V., Skinner, S. M., Carino, C., Wang, N., Cartwright, J., & Dunbar, B. S. (2000). Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida. *Cells Tissues Organs*, 166(2), 148–164. <https://doi.org/10.1159/000016703>
38. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). (2013). An online catalog of human genes and genetic disorders. *OMIM Database*. <http://omim.org/entry/182889>

39. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). (2013). An online catalog of human genes and genetic disorders. *OMIM Database*. <http://omim.org/entry/182888>
40. Zülfikaroğlu, G., Özgür, H., & Polatürkey, S. (2010). Molecular aspects of capacitation. *Archives Medical Review Journal*, 19(1), 12–24.
41. Fisher, H. M., Brewis, I. A., Barratt, C. L. R., Cooke, I. D., & Moore, H. D. (1998). Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction*, 4(9), 849–855. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.9.849>
42. Hirohashi, N., & Vacquier, V. D. (2003). Store-operated calcium channels trigger exocytosis of the sea urchin sperm acrosomal vesicle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), 285–292. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00581-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00581-6)
43. Androloji. (tarih yok). Erkek sağlığı: Üreme sağlığı - Cinsel fonksiyon bozuklukları. *Androloji.info*. <http://www.androloji.info/Kruger.php>
44. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi. (tarih yok). *Dönem I Hücre Bilimleri Ders Kurulu 3: Genel Embriyoloji Ders Notları*. Prof. Dr. Ali Otlı. <http://www.belgeler.com/blg/2su5/genel-embriyoloji-ders-notlari>
45. Androloji Workshop Kitapçığı. (1998). Antalya.
46. Elder, K., & Dale, B. (2011). *In-vitro fertilization* (pp. 32–34). Cambridge University Press.
47. Cooper, T., & Yeung, C. (2010). *Physiology of sperm maturation and fertilization* (pp. 70–73). Springer.
48. Inaba, K., & Mizuno, K. (2016). Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reproductive Medicine and Biology*, 15(2), 77–94. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12009>
49. Delilbaşı, L. (2010). *A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvarı*. Veri Medikal Yayıncılık.
50. World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (6th ed.). WHO Press. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>

51. Irvine, D. S. (1998). Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction*, 3(1), 1–5. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030001>
52. Potts, R. J., Newbury, C. J., Smith, G., Notarianni, L. J., & Jefferies, T. M. (1999). Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Research*, 423(1–2), 103–111. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00002-7)
53. Arnon, J., Meirow, D., Lewis-Roness, H., & Ornoy, A. (2001). Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Human Reproduction Update*, 7(4), 394–403. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.4.394>
54. Morris, I. D. (2002). Sperm DNA damage and cancer chemotherapy: Clinical implications. *Cell and Tissue Research*, 322(1), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0561-5>
55. Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., & Giwercman, A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: Biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*, 8(1), 11–29. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00121.x>
56. Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Said, T. M., Sikka, S. C., & Thomas, A. J. (2003). Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility*, 80(6), 1431–1436. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.06.024>
57. Kobayashi, H., Gil-Guzman, E., Mahran, A. M., Sharma, R. K., Nelson, D. R., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2001). Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *Journal of Andrology*, 22(4), 568–574.
58. Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., & Maisse, G. (2001). Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60(3), 397–404. <https://doi.org/10.1002/mrd.1083>
59. Laberge, R. M., & Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biology of Reproduction*, 73(2), 289–296. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.037473>

60. Sinha, H. A., Singh, S. P., & Singh, R. (1999). Apoptosis of germ cells in human testis. *Indian Journal of Urology*, 15(2), 135–139.
61. Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., & Bizzaro, D. (2003). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1478–1484. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017814>
62. Raimondo, S., Gentile, L., Lo Furno, D., & Barbagallo, D. (2014). Role of DNA repair genes in sperm DNA fragmentation: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15724–15738. <https://doi.org/10.3390/ijms150915724>
63. Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), 1–17. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
64. Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa and its relationship to fertility. *Reproduction*, 114(1), 25–34. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1140025>
65. Zini, A., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: Levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16(3), 183–188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01174.x>
66. Küpker, D., Dittrich, R., & Beckers, F. (1999). Genetic and molecular biological aspects of male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 4(S1), 27–30. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60075-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60075-4)
67. Majzoub, A., Agarwal, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Gosálvez, J. (2017). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: Practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, 6(Suppl 4), S720–S733. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.08.06>
68. Shen, J. C. (2000). Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.

- Methods in Enzymology*, 319, 340–346. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)19080-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)19080-7)
69. Haines, G., Marples, B., Daniel, P., & Morris, I. (1998). DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 444, 79–91. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4861-8_10
 70. Tarozzi, N., Nadalini, M., Bizzaro, D., Serrao, L., Fava, L., & Borini, A. (2007). Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reproductive Biomedicine Online*, 14(6), 746–757. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60676-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60676-3)
 71. Pastuszek, E., Kiewisz, J., Kulwikowska, P., & Lukaszuk, K. (2017). Methods of sperm DNA fragmentation assessment—Their advantages, disadvantages, and clinical utility. *Ginekologia Polska*, 88(11), 669–675. <https://doi.org/10.5603/GP.a2017.0117>
 72. Robbins, P., & Coleman, N. (1988). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 36(8), 1006–1011. <https://doi.org/10.1177/36.8.3292520>
 73. Shamsi, M. B., Venkatesh, S., Pathak, D., Deka, D., & Dada, R. (2011). Sperm DNA damage and oxidative stress in recurrent spontaneous abortion (RSA): A case–control study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(9), 911–917. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9604-x>
 74. Gosálvez, A. K. (2011). In situ nick translation as a tool to detect DNA fragmentation in human spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-9>
 75. Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertility and Sterility*, 86(3), 701–704. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.04.029>
 76. Panner, S., & Agarwal, A. (2017). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, 23(6), 654–672. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx021>

77. Muriel, L., Meseguer, M., Fernández, J. L., Alvarez, J., Remohí, J., Pellicer, A., & Garrido, N. (2006). Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: A blind prospective study. *Human Reproduction*, 21(3), 738–744. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei382>
78. Yiğit, S., Keskin, İ., & Aksoy, Ş. (2015). Sperm DNA hasarının değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler. *Androloji Bülteni*, 17(1), 1–8.
79. Küçük, M. (2018). İnfertil çiftlerde sperm genomik stabilitesinin belirlenmesinde DNA fragmentasyon testlerinin yeri. *Journal of Human Rhythm*, 4(1), 25–32.
80. Türk, G., Ateşşahin, A., Sönmez, M., Çeribaşı, A. O., & Yüce, A. (2006). Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology*, 66(4), 776–785. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.056>
81. Koyuncu, H. (2011). Sperm DNA hasarının infertilite üzerine etkisi. *Androloji Bülteni*, 13, 1–5.
82. Güneş, S., Aslan, A., & Dönmez, M. İ. (2013). Sperm DNA hasarının önemi ve değerlendirilmesi. *Türk Üroloji Dergisi*, 39(2), 129–135. <https://doi.org/10.5152/tud.2013.027>
83. Yiğit, S. (2015). Sperm DNA hasarının infertilite üzerine etkisi ve değerlendirilmesi. *Androloji Bülteni*, 17, 1–7.
84. Küçük, N. (2018). Sperm DNA hasarının değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler. *Üroloji Bülteni*, 27, 1–10.
85. Rahiminia, T., Yazd, E. F., Nematollahi, M. A., & Ghasemi-Esmailabad, S. (2017). Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*, 49(10), e12763. <https://doi.org/10.1111/and.12763>
86. Manicardi, G. C., Bianchi, P. G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U., & Sakkas, D. (1995). Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology of Reproduction*, 52(4), 864–867. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.4.864>

87. Singh, N. P., Muller, C. H., & Berger, R. E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility*, 80(6), 1420–1430. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.06.005>
88. Silber, S. J. (2000). Microsurgical techniques in male infertility. *Urology*, 55(2), 153–157. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(00\)00440-0](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00440-0)
89. Silber, S. J. (2000). Percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and testicular sperm extraction (TESE) for in vitro fertilization. *Human Reproduction*, 15(3), 243–246. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.3.243>
90. Schlegel, P. N. (2006). Evaluation of male infertility. *The New England Journal of Medicine*, 355(19), 2153–2165. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp053611>
91. Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2013). Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *International Brazilian Journal of Urology*, 39(4), 440–453. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2013.04.02>
92. Schlegel, P. N., & Su, L. M. (1997). Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*, 12(8), 1682–1688. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.8.1682>
93. American Society for Reproductive Medicine (ASRM). (2012). Cryopreservation in reproductive medicine. *Fertility and Sterility*, 99(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.015>
94. Wetzels, A. M. M., Bras, M., Lens, J. W., Piederiet, M. H., Rijnders, P. M., & Zeilmaker, G. H. (1996). Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/Theory*, 229–244.
95. Gardner, D. K., Lane, M., & Watson, A. J. (2007). *A laboratory guide to the mammalian embryo*. Oxford University Press.
96. Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666. <https://doi.org/10.1038/164666a0>
97. Mantegazza, P. (1831–1910). Studies on the preservation of sperm at low temperatures. *Journal of Experimental Medicine*, 12(4), 253–267.
98. Hammond, J., & Walton, A. (1930). The effect of temperature on the survival of rabbit spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*,

- Biological Sciences*, 107(749), 308–315.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1930.0025>
99. Polge, C., & Rowson, L. E. A. (1952). Fertilization in cattle with frozen bull semen. *The Veterinary Record*, 64(12), 323–324.
 100. Bunge, R. G., & Sherman, J. K. (1953). Human spermatozoa: Freezing and viability in vitro. *Nature*, 172(4379), 767–768.
<https://doi.org/10.1038/172767a0>
 101. Sherman, J. K. (1963). Preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Science*, 141(3578), 354–355.
<https://doi.org/10.1126/science.141.3578.354>
 102. Sherman, J. K. (1970). Long-term storage of spermatozoa at low temperatures. *Fertility and Sterility*, 21(1), 1–11.
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)38074-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)38074-7)
 103. Fuller, B. J., & Paynter, S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(6), 680–691.
[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61795-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61795-0)
 104. Gardner, D. K. (2007). *In vitro fertilization: A practical approach*. CRC Press.
 105. Mazur, P. (2004). Principles of cryobiology. *Cell Transplantation*, 13(1), 13–25. <https://doi.org/10.3727/0000000004783985658>
 106. Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*, 67(1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.014>
 107. Rienzi, L., Ubaldi, F., & Iacobelli, M. (2012). New perspectives in oocyte cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(2), 138–146.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.11.015>
 108. Best, B. P. (2015). Cryoprotectant toxicity: Facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*, 18(5), 422–436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>
 109. Palasz, A. T., & Mapletoft, R. J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 14(2), 127–149. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02003-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02003-3)

110. Elder, K., & Dale, B. (2011). *In vitro fertilization*. Cambridge University Press.
111. Shaw, J. M., & Jones, G. M. (2003). Terminology associated with vitrification and related cryopreservation techniques for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9(6), 583–605. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg035>
112. Avery, B., Greve, T., & Schmidt, M. (1998). Cryoprotection of mammalian spermatozoa and embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 33(1), 1–7.
113. Agarwal, A., et al. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*.
114. Isachenko, V., et al. (2004). Human spermatozoa vitrified in the absence of cryoprotectants: Birth of two healthy babies. *Reproductive Biomedicine Online*.
115. Sharma, R., et al. (2022). Impact of cryopreservation on sperm DNA integrity: Mechanisms, methods, and clinical significance. *Andrology*.
116. Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*.
117. Mazur, P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *Journal of General Physiology*, 47(2), 347–369. <https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>
118. Best, B. P. (2015). Cryoprotectant toxicity: Facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*, 18(5), 422–436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>
119. Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14(3), 251–272. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90037-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90037-1)
120. Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*.
121. Shaw, J. M., & Jones, G. M. (2003). Terminology associated with vitrification and related cryopreservation techniques for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9(6), 583–605. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg035>

122. Leibo, S. P., & Mazur, P. (1971). The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology*, 8(5), 447–452. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(71\)90044-7](https://doi.org/10.1016/0011-2240(71)90044-7)
123. Meistrich, M. L. (2013). Male gonadal toxicity. *Pediatric Blood & Cancer*, 60(1), 31–36. <https://doi.org/10.1002/pbc.24124>
124. Tournaye, H., Krausz, C., & Oates, R. D. (2017). Concepts in diagnosis and therapy for male reproductive impairment. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 5(7), 554–564. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30040-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30040-7)
125. Patrizio, P., & Caplan, A. L. (2016). Ethical issues surrounding sperm donation. *Fertility and Sterility*, 105(2), 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.10.012>
126. Mulhall, J. P., Müller, A., & Donohue, J. F. (2011). Fertility preservation in men with cancer. *The Journal of Sexual Medicine*, 8(7), 1772–1779. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2011.02223.x>
127. Holt, W. V., & Fazeli, A. (2016). Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract. *Molecular Human Reproduction*, 22(8), 507–518. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw036>
128. Esteves, S. C., Miyaoka, R., & Agarwal, A. (2015). Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *International Brazilian Journal of Urology*, 41(1), 6–17. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.01.02>
129. Oates, R. D. (2018). Sperm cryopreservation and fertility preservation for male cancer patients. *Urologic Clinics of North America*, 45(4), 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2018.07.005>
130. Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., Haugen, T. B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M. T., & Vogelsong, K. M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16(3), 231–245. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>
131. Heng, B. C., Choo, J. C. J., & Lee, J. (2019). Sperm donor regulations and ethical considerations. *Asian Journal of Andrology*, 21(3), 241–248.

132. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60, 481–492.
133. Sağlık Bakanlığı. (2010). Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Hakkında Yönetmelik. *Resmî Gazete*, 06 Mart 2010.
134. Wang, J., Li, Y., & Chen, Y. (2018). The role of medicinal plants in fertility enhancement and reproductive health. *Phytotherapy Research*, 32(5), 915–928.
135. Ginsburg, J., & Smith, P. (2019). Herbal medicine and reproductive health: A review of the evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 244, 112153.
136. Katar, D., Yaşar, M., & Katar, N. (2023). Zencefil (*Zingiber officinale* Roscoe) tarımı. *Tarımsal Üretime Makro Bakış*, 77–110.
137. John, S., Rao, P. S., & Prasad, D. (2002). Traditional uses of *Zingiberaceae* species in folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2), 187–192.
138. Zanariah, M. S., Roslan, J., & Karim, N. (2010). The economic importance of ginger cultivation. *Malaysian Agricultural Journal*, 28(3), 45–52.
139. Jakribettu, R. P., Bloor, R., & Raghunath, P. (2016). Medicinal properties of *Zingiberaceae* family: A review. *International Journal of Pharmacology and Phytochemistry*, 5(4), 72–81.
140. Ernst, E., & Pittler, M. H. (2000). Efficacy of ginger for nausea and vomiting: A systematic review. *British Journal of Anaesthesia*, 84(3), 367–371.
141. Udounang, C. N., Ukoha, P. O., & Nweke, I. N. (2022). Pharmacological and therapeutic effects of *Zingiber officinale*: A review. *Phytotherapy Research*, 36(5), 1045–1060.
142. Melati, M., Faridah, A., & Aminah, A. (2015). Effect of geographical origin on the composition of bioactive compounds in *Zingiber officinale*. *Journal of Herbal Medicine*, 6(2), 111–121.
143. Govindarajan, V. S. (1982a). Ginger-chemistry, technology, and quality evaluation: Part I. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 17(1), 1–96.

144. Govindarajan, V. S. (1982b). Ginger-chemistry, technology, and quality evaluation: Part II. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 17(2), 189–258.
145. Kaplan, M. (2005). Ginger and its health benefits: A comprehensive review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 34(1), 90–102.
146. Bayar, S. (2020). Tıbbi ve aromatik bitkilerde uçucu yağların bileşimi ve kullanım alanları. *Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(3), 78–92.
147. Suckawa, P., Nakazawa, H., & Inouye, S. (1986). Studies on pungent principles of ginger. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(4), 933–939.
148. Bartley, J. (1995). The biochemistry of ginger flavour. *Food Chemistry*, 49(1), 111–117.
149. Raina, V. K., Srivastava, S. K., & Syamasundar, K. V. (2005). Essential oil composition of ginger (*Zingiber officinale*) from different regions of India. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 222–226.
150. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., & Rahmat, A. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its bioactive components. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 438–447.
151. Haida, M., & Barber, M. (2019). Polyphenols and their role in oxidative stress-induced male infertility: A review. *Antioxidants*, 8(12), 570.
152. Zahid, H., Rabia, N., & Farhan, S. (2021). Flavonoids and their role in human health: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112159.
153. Shao, L., Wang, H., & Liu, J. (2003). Ginger extract in traditional Chinese medicine: A historical perspective. *Journal of Chinese Medicine*, 12(1), 88–97.
154. Sripramote, M., & Lekhyananda, N. (2003). Ginger extract for the prevention of pregnancy-induced nausea and vomiting. *Journal of Obstetric and Gynecological Medicine*, 45(2), 134–139.
155. Geiger, C. J. (2005). Ginger: A powerful natural remedy. *Herbal Medicine Research*, 42(1), 33–48.

156. Zanariah, H., Rahayu, S., & Ismail, S. (2010). Traditional medicinal uses of ginger in Malaysia: An ethnobotanical approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(3), 425–430.
157. Kemper, K. J. (1999). Ginger (*Zingiber officinale*): Review and analysis of clinical trials. *Journal of Herbal Pharmacology*, 10(2), 245–257.
158. Ernst, E., & Pittler, M. H. (2000). Efficacy of ginger for nausea and vomiting: A systematic review of randomized clinical trials. *British Journal of Anaesthesia*, 84(3), 367–371.
159. Mustafa, T., Sripramote, M., & Lekhyananda, N. (1993). The role of ginger in the treatment of nausea and motion sickness. *Alternative Medicine Journal*, 23(4), 189–195.
160. Frisch, C., Zitterl-Eglseer, K., & Sator-Katzenschlager, S. (1995). The effectiveness of ginger in the prevention of nausea and vomiting during pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 61(3), 245–247.
161. Udounang, M., Ekpo, O., & Nwankpa, C. (2022). *Medicinal applications of ginger in rheumatic disorders: A systematic review*. *Phytotherapy Journal*, 58(4), 287-299.
162. Choi, J. H., Kim, D. W., & Park, S. E. (2018). *Ginger extract as a complementary treatment for cardiovascular diseases*. *Journal of Traditional Medicine*, 12(2), 109-115.
163. Ghafoor, K., Choi, Y. H., & Park, J. (2020). *Ginger extracts and their role in modulating cardiovascular function*. *Phytotherapy Research*, 34(6), 1234-1245.
164. Said, O., Fulder, S., & Khalil, K. (2020). *The use of ginger in traditional and modern medicine: A comprehensive review*. *Ethnopharmacology Journal*, 56(1), 133-145.
165. Zheng, Y., Wang, J., & Zhang, Y. (2008). *The effect of ginger on motion sickness: A systematic review*. *Complementary Medicine Journal*, 7(2), 101-107.
166. Ali, S., et al. (2016). "Protective effects of ginger extract on oxidative stress in sperm." *Asian Journal of Andrology*.

167. Aitken, R. J., & Clarkson, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(2), 459–469.
168. Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1992). Evidence that membrane lipid peroxidation is an important factor in the loss of sperm motility during in vitro incubation of human spermatozoa: Role of lipid peroxidation and protective effect of seminal plasma. *Journal of Andrology*, 13(3), 232–241.
169. Keel, B. A., Webster, B. W., Roberts, D. K., & Evenson, D. P. (1987). Effects of cryopreservation on the integrity of chromatin structure in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 47(5), 864–869.
170. Hammadeh, M. E., Szarvasi, M. R., Rosenbaum, P., Georg, T., & Schmidt, W. (1999). Evaluation of cryopreservation effects on chromatin condensation, morphology, and sperm vitality in human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 16(10), 530–536.
171. Esteves, S. C., Sharma, R. K., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2000). Effect of cryopreservation on sperm chromatin structure assay DNA fragmentation in patients with oligospermia and normal sperm count. *Fertility and Sterility*, 74(4), 920–924.
172. Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Franssen, K., Janssen, M., Vanheusden, E., & Ombelet, W. (2009). Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid-binding ability of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 19(2), 202–206.
173. Donnelly, E. T., Steele, E. K., McClure, N., & Lewis, S. E. (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction*, 16(6), 1191–1199.
174. Nijs, M., & Ombelet, W. (2001). Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility*, 4(3), 158–163.
175. O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704–709.

176. Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., & Karahuseyinoglu, S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8), 403–411.
177. Nassiri-Asl, M., Hosseinzadeh, H., & Heidari, M. R. (2009). Antioxidant effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(3), 328–330.
178. Shukla, Y., & Singh, M. (2007). Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*, 45(5), 683–690.
179. Hosseini, J., Heidari, M., Najafi, M., & Sepidarkish, M. (2016). The influence of ginger (*Zingiber officinale*) on human sperm quality and DNA fragmentation: A double-blind randomized clinical trial. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(8), 533–540.

9 ÖZGEÇMİŞ

Adı	Zuhal	Soyadı	ÇANKIRI
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	T.C	Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2021
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2005
Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2001
Lise	Ziya Gökalp Lisesi	1997

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Öğretmen	MEB	2

Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL	TİPDİL	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	55,00							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,27384		

10 EKLER

10.1 Etik kurul raporu

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR NONINTERVENTIONAL STUDIES					
187 KARAR					
Prof. Dr. Murat AKKUŞ, Doktora Öğrencisi Zuhul ÇANKIRI, Doç. Dr. Onur DEDE, Dr. Öğretim Üyesi Fırat AŞIR, Doktora Öğrencisi Dilara AKINCI isimli araştırmacılar tarafından planlanan "İnsan sperminde kriyoprezervasyon sonrası oluşan DNA hasarı üzerine In Vitro Zencefil (Zingiber Officinale) uygulamasının etkisi" başlıklı araştırmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir. Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.					
DECISION					
The project titled as "The effect of In Vitro Ginger (Zingiber Officinale) application on DNA damage after cryopreservation in human sperm" planned by Murat AKKUŞ, Zuhul ÇANKIRI, Onur DEDE, Fırat AŞIR, Dilara AKINCI has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.					
Oturum No (Meeting number):		Tarih (Date): 14.06.2023		Saat (Hour):10:00-12:00	
KURUL BAŞKANI (CHIEF)		Prof. Dr. İbrahim KAPLAN			
KURUL ÜYELERİ / MEMBERS					
	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA /
1	Prof. Dr.	İbrahim KAPLAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya	
2	Doç. Dr.	Fikret SALIK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	
3	Doç. Dr.	Mehmet TÖRE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	
4	Doç. Dr.	Seyfettin ERDEM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Göz Hastalıkları	
5	Doç. Dr.	Muhammed Akif DENİZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Radyoloji	
6	Dr. Öğretim Üyesi	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	
7	Dr. Öğretim Üyesi	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyoistatistik	
8	Dr. Öğretim Üyesi	Gülray AYDOĞDU	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Patoloji	
9	Dr. Öğretim Üyesi	Mehmet Fatih AKKOÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Plastik Cerrahi	
10	Dr. Öğretim Üyesi	Abdullah ŞEN	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Acil Tıp	
11	Dr. Öğretim Üyesi	Zeynep ERDOĞMUŞ ÖZGEN	Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Farmakoloji	
12	Avukat	Şahhanım KAPLAN	Dicle Üniversitesi Rektörlük	Hukuk Müşavirliği	

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

10.2 Gönüllü Hasta Onam Formu

Bu onam formu, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji polikliniğine başvuran ve infertilite tanısı konan hastalardan alınacak olan semen örneklerinden elde edilecek spermilerin morfolojik yapısı ve spermilerin DNA fragmentasyonları incelenmek amacıyla hazırlanmıştır. Çalışmaya katılacak erkek hastaların infertiliteye sahip olması ve gönüllülük esasına dayanır.

Bir infertilite hastası olarak yukarıda doktorumun / araştırmacının bana anlattığı bilgiler ışığında araştırmaya dahil olmayı kabul ettiğimi, alınacak olan semen örneklerinden elde edilecek spermilerin morfolojik yapısı ve spermilerin DNA fragmentasyonları incelenmesinin tarafımda bir sakıncası olmadığını, bu araştırmada istemediğim takdirde spermierimin çalışmada kullanılmayacağını, istediğim anda araştırmadan çıkabileceğimi beyan ederim.

İSTEMDE BULUNAN DOKTOR

Doç. Dr. Onur DEDE

Tel:

İmza:

ARAŞTIRMACI

Biyolog Zuhall Çankırı

Tel:

İmza:

KATILIMCI

Adı Soyadı:

Adresi:

Tel:

İmza:

Tarih: / / 202

10.3 Orjinallik Raporu



Sayfa 1 of 81 - Kapak Sayfası

Gönderi Kimliği trn:oid::1:3173704244

Zuhal Çankırı

Doktora Tezi

ders

İntihal

Dicle University

Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği

trn:oid::1:3173704244

Gönderi Tarihi

5 Mar 2025 09:53 GMT+3

İndirme Tarihi

5 Mar 2025 09:58 GMT+3

Dosya Adı

Zuhal_Çankırı_Tez.pdf

Dosya Boyutu

2.5 MB

75 Sayfa

15.511 Sözcük

109.246 Karakter

11% Genel Benzerlik

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

Ön Sıradaki Kaynaklar

10% İnternet kaynakları

6% Yayınlar

2% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

10.4 Mezuniyet Yayını



İNSAN SPERMİNDE KRİYOPREZERVASYONUNUN SPERM VİTALİTESİNE ETKİSİ EFFECT OF CRYOPRESSERVATION OF HUMAN SPERM ON SPERM VITALITY

Zuhal Çankırı

Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology
ORCID ID: 0000-0002-1618-4030

Murat Akkuş

Profesör, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Professor., Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology
ORCID ID: 0000-0002-1659-1189

Dilara Akıncı

Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology
ORCID ID: 0000-0002-2563-0688

Eda Yıldızhan

PhD, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
PhD., Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology
ORCID ID: 0000-0002-5648-6498

Fırat Aşır

Dr. Öğr. Üyesi, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Assistant Professor, Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology
ORCID ID: 0000-0002-6384-9146

Zeynep Türe

Dr., Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
MD., Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology
ORCID ID: 0000-0002-5114-0121

ZUHAL ÇANKIRI	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA	DİYARBAKIR-2025
----------------------	---	----------------	------------------------