

T.C.  
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

TÜRKİYE'DE HALK ARASINDA YAYGIN OLARAK  
KULLANILAN ADAÇAYI, SUSAM VE YABAN MERSİNİ  
BİTKİLERİNİN *in vitro* KOŞULLARDA SPERM FONKSİYONU  
PARAMETRELERİNE ETKİSİ

CEMİLE YILMAZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Abdülkerim ALPINAR

İSTANBUL

2019

**T.C.**  
**BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

TÜRKİYE'DE HALK ARASINDA YAYGIN OLARAK KULLANILAN  
ADAÇAYI, SUSAM VE YABAN MERSİNİ BİTKİLERİNİN *in vitro*  
KOŞULLARDA SPERM FONKSİYONU PARAMETRELERİNE ETKİSİ

**CEMİLE YILMAZ**

**TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Abdülkerim ALPINAR**

**İSTANBUL, 2019**

**Anabilim Dalı:** Histoloji ve Embriyoloji

**Program Adı:** Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

**Öğrencinin Adı Soyadı:** Cemile YILMAZ

**Danışman:** Prof. Dr. Abdülkerim ALPINAR

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Cemile YILMAZ tarafından hazırlanan "Türkiye' de Halk Arasında Yaygın Olarak Kullanılan Adaçayı, Susam ve Yaban Mersini Bitkilerinin İn Vitro Koşullarda Sperm Fonksiyonu Parametrelerine Etkisi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:30/07/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Abdülkerim ALPINAR

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Nurten DAYIOĞLU

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Leman ŞENTURAN  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## I.BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı herhangi bir davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, çalışma ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar listesi şeklinde eklediğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Cemile YILMAZ



## II. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, tezimin konusunun belirlenmesinde, araştırma aşamasında ve tamamlanma süreci boyunca yanımda olan, her daim güler yüzüyle ve sonsuz sabrıyla bana destek olan çok değerli hocam Prof. Dr. Abdülkerim ALPINAR'a bana ayırdığı değerli vakti ve sağladığı destek için sonsuz teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Tezimin başlangıcından bitimine kadar bana inanan, benden yardımlarını esirgemeyen, her danıştığımda değerli vaktini ayırıp sabırla elinden gelenin fazlasını sunan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Tülay İREZ'e teşekkürü borç bilirim. Çalışmam boyunca benden yardımını ve maddi manevi desteğini esirgemeyen hayat arkadaşım Erdi YILMAZ'a, aramızda kilometreler olmasına rağmen, telefonda sürekli beni motive eden ve her daim daha da ileriye gitmemi teşvik eden, başta annem olmak üzere aileme ve 5 ay önce aramıza katılıp, çok sakin bir bebek olarak çalışmamı bitirmeme müsaade eden çok sevgili oğlum Çağlar YILMAZ'a sonsuz teşekkür ederim

CEMİLE YILMAZ

### III. İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
I. BEYAN.....	iii
II. TEŞEKKÜR .....	iv
III. İÇİNDEKİLER .....	v
IV. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
V. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
VI. TABLOLAR DİZİNİ .....	x
1.ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4.GENEL BİLGİLER .....	5
4.1. Erkek Üreme Sistemi.....	5
4.1.1. Testis histolojisi .....	5
4.1.2. Spermatogenez.....	8
4.1.3. Olgun spermatozoon.....	13
4.1.3.1. Sperm membranı.....	15
4.1.4. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi .....	15
4.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	21
4.2.1. ROS'un hücrel substratları .....	22
4.2.2. Antioksidanlar.....	23
4.2.3. İnsan semeninde ROS'un kaynağı.....	24
4.2.4. Oksidatif stres ve erkek infertilitesi .....	25
4.2.5. Spermatozoon antioksidan sistemi.....	26
4.2.6. Yardımlı üreme teknikleri (YÜT) ve ROS .....	26
4.3. Medikal Bitkiler .....	29
4.3.1. Adaçayı (tıbbi).....	34
4.3.2. Susam.....	37
4.3.3. Yaban mersini .....	39
5. GEREÇ VE YÖNTEM .....	42
5.1. Gereçler .....	42
5.1.1. Kimyasallar .....	42
5.2. Yöntem .....	43
5.2.1. Hazırlık aşaması.....	43

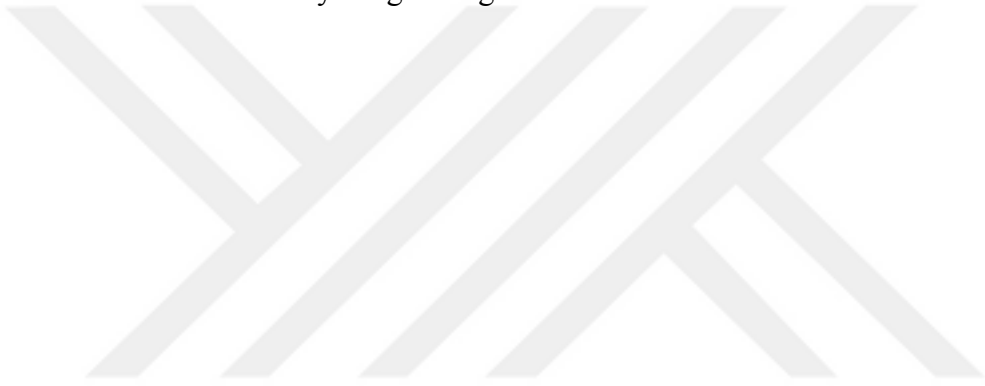
5.2.2. Hasta gruplarının belirlenmesi.....	43
5.2.3. Bitki ekstraktlarının hazırlanması.....	43
5.2.4. Semen örneklerinin toplanması .....	44
5.2.5. Sperm sayısı ve motilitesinin değerlendirilmesi.....	44
5.2.6. Sperm vitalitesinin değerlendirilmesi .....	44
5.2.7. Semen örneklerinin çalışılması.....	45
5.2.8. Bitki ekstraktlarının uygulanması .....	45
5.2.9. İstatistiksel Yöntem .....	46
6. BULGULAR.....	47
6.1. Progresif Motilite Bulguları .....	47
6.2. Vitalite Bulguları .....	53
7.TARTIŞMA VE SONUÇ .....	56
8.KAYNAKÇA.....	67
9.EKLER.....	86
EK-1 BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ .....	86
<b>“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN</b> <b>BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU.....</b>	<b>86</b>
EK-2 Etik Kurul Onayı .....	90
10. ÖZGEÇMİŞ .....	92
İNTİHAL RAPORU .....	93

#### IV. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Cm</b>	: Santimetre
<b>Kg</b>	: Kilogram
<b>Mg</b>	: Miligram
<b>gr</b>	: Gram
<b>FSH</b>	: Folikül uyarıcı hormo
<b>µl</b>	: mikrolitre
<b>LH</b>	: Luteinizan hormon
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>ml</b>	: mililitre
<b>CAMP</b>	: Siklik adenozin mono fosfat
<b>pH</b>	: Power of Hydrogen
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>dk</b>	: Dakika
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>NADH</b>	: Nikotinamit adenin dinükleotit
<b>NADPH</b>	: Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>OH</b>	: Hidroksil radikali



<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>GPX</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>YÜT</b>	: Yardımla Üreme Teknikleri
<b>GRD</b>	: Glutasyon redüktaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>µM</b>	: Mikromol
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü



## V. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Çiçek ( <i>Salvia officinalis</i> )	34
Şekil 2	Yaprak ( <i>Salvia officinalis</i> )	34
Şekil 3	Çiçekli gövde ( <i>Sesamum indicum</i> )	36
Şekil 4	Genç meyveler ( <i>Sesamum indicum</i> )	37
Şekil 5	Tohumlar ( ( <i>Sesamum indicum</i> )	38
Şekil 6	Çiçekler ( <i>Viccinium myrtilus</i> )	39
Şekil 7	Meyve ( <i>Viccinium myrtilus</i> )	39
Şekil 8	Kontrol ve bitkilerin 0.01 mg/ml'lik solüsyonlarına ilişki progresif motilite ortalamaları	49
Şekil 9	Kontrol ve bitkilerin 0.05 mg/ml'lik solüsyonlarına ilişkin progresif motilite ortalamaları	50
Şekil 10	Kontrol ve bitkilerin 0.1 mg/ml'lik solüsyonlarına ilişki progresif motilite ortalamaları	50
Şekil 11	Susam solüsyonlarına ilişkin progresif motilite ortalamaları	51

## VI. TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	Yaş, volüm, konsantrasyon, motilite, progresif motilite, morfoloji, vitalite ortalama değerleri	<b>45</b>
<b>Tablo 2</b>	Adaçayı konsantrasyonlarında progresif motilite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması	<b>46</b>
<b>Tablo 3</b>	Yaban mersini konsantrasyonlarında progresif motilite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması	<b>47</b>
<b>Tablo 4</b>	Susam konsantrasyonlarında progresif motilite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması	<b>48</b>
<b>Tablo 5</b>	0.1 mg/ml'lik bitki konsantrasyonlarında progresif motilite ortalaması, standart sapması ve bitkilerin karşılaştırılması	<b>49</b>
<b>Tablo 6</b>	Adaçayı konsantrasyonlarında vitalite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması	<b>51</b>
<b>Tablo 7</b>	Yaban mersini konsantrasyonlarında vitalite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması	<b>52</b>
<b>Tablo 8</b>	Susam konsantrasyonlarında vitalite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması	<b>53</b>
<b>Tablo 9</b>	0.1 mg/ml'lik bitki konsantrasyonlarında vitalite ortalaması, standart sapması ve bitkilerin karşılaştırılması	<b>53</b>

## 1. ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER

Semendeki oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ve seminal antioksidanlar arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkar. Oksidatif stresin erkek infertilitesine sebep olduğu daha ince yapılmış olan çalışmalardan bilinmektedir. Antioksidanlar yüksek ROS konsantrasyonunu dengeleyerek, semen parametreleri üzerindeki negatif etkilerini tersine çevirirler. Bu amaçla çalışmamızda antioksidan içeriği yüksek olan üç bitkinin *in vitro* koşullarda sperm fonksiyonları üzerindeki etkisini araştırdık. Bu ve benzer çalışmalar ile yardımcı üreme teknikleri uygulamaları sırasında ortaya çıkan ROS'un etkileri minimuma indirilebilir. Bu çalışmada normozoospermi olgularında, sperm hazırlama yöntemlerinden gradient yöntemi kullanılarak hazırlanan sperm örnekleri üzerinde susam, adaçayı ve yaban mersini bitkilerinin üç farklı konsantrasyonu uygulanarak, örneklerdeki progresif motilite ve vitalite parametrelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma 'Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul'una sunuldu ve 2017/5-3 sayılı ve 26.04.2017 tarihli etik kurul onayı alındı. Çalışma, Haziran 2017- Nisan 2018 tarihleri arasında Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'ne spermiyogram analizi için başvuran hastalarda uygulandı. Bu çalışmada Bahçelievler Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran hastalardan normozoospermi (n=40) olarak değerlendirilenler seçilerek WHO kriterlerine uygun standart semen analizi uygulandı. Sperm örnekleri gradient yöntemi ile yıkanarak, yıkama sonrası progresif motilite ve vitalite açısından değerlendirildi. Susam, adaçayı ve yaban mersini bitkilerinin üç farklı konsantrasyonu sperm örneklerine 1:1 oranında uygulanarak 30. 60 dakikalar ve 24. saatte progresif motilite ve vitalite açısından yeniden değerlendirildi. Bu tez çalışmasına göre susam, adaçayı ve yaban mersini ekstraktlarının uygulandığı sperm örneklerinde istatistiksel olarak en anlamlı fark susam ekstraktının uygulandığı örneklerde görülmüş olup, hem kontrol hem de diğer iki bitkiye göre progresif motilite ve vitalite bulgularında anlamlı artış gözlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** erkek infertilitesi, bitkisel antioksidanlar, motilite, vitalite

## **2. ABSTRACT**

### **The Effects of Sage, Sesame and Blueberry Plants in Widely Used in Turkey to The Sperm Functions Parameters During *in vitro* Conditions**

Oxidative stress in semen arises from the imbalance between reactive oxygen species and seminal antioxidants. Oxidative stress is known to cause more infertility. Antioxidants reverse the high ROS concentration and reverse their negative effects on semen parameters. In this study, we investigated the effect of three plants with high antioxidant content on sperm function *in vitro*. This and similar studies and the effects of ROS during assisted reproduction techniques can be minimized. In this study, it was aimed to evaluate the progressive motility and vitality parameters of the samples by applying three different concentrations of sesame, sage and blueberry plants on sperm samples prepared by using the gradient method in normozoospermia cases. The study was submitted to the Biruni University Non-Interventional Ethics Committee and was approved by the ethics committee of 2017 / 5-3 issues and 26.04.2017. The study was performed between June 2017 and April 2018 in Bahçelievler Medical Park Hospital IVF Center for patients who applied for spermogram analysis. In this study, normozoospermia (n = 40) patients who were admitted to Bahçelievler Medical Park Hospital Clinic Center were selected and standard semen analysis was performed according to WHO criteria. Sperm samples were washed by gradient method and evaluated for progressive motility and vitality after washing. Three different concentrations of sesame, sage and blueberry plants were reevaluated in sperm samples at a ratio of 1: 1 to 30, 60 minutes and 24 hours for progressive motility and vitality. According to this study, the most significant difference in the sperm samples in which the sesame, sage and blueberry extracts were applied was observed in the samples where the sesame extract was applied and a significant increase was observed in both the control and the other two plants according to the progressive motility and vitality findings.

**Key words:** male infertility, herbal antioxidants, motility, vitality

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Düzenli bir cinsel ilişkiye rağmen (haftada iki kez) hiçbir korunma yöntemi uygulanmaksızın bir yıl içinde gebelik oluşmamasına infertilite denir. İnfertilite, günümüz evli çiftlerinin %15 kadarını etkileyen ve giderek artış gösteren bir sağlık sorunudur. Erkek infertilitesi, infertil çiftlerin %10-30'unda tek neden iken, %15-30'unda kadındaki probleme ek bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla vakaların yaklaşık %50'sinde erkek faktörü görülmektedir. İnfertil erkek bireylerin yaklaşık %40-60'ında infertilitenin altında yatan neden bilinmektedir. Geri kalanında ise sebep ortaya konulamamakta ve bu olgular idiopatik infertilite olarak kabul edilmektedir. İnfertilitede erkek faktörleri ürogenital sistem organlarının herhangi birinden kaynaklı olabilmektedir. Sperm kromozomlarının yapısal (translokasyonlar) veya sayısal kromozomal (anöploidiler) bozuklukları, genetik mutasyonlar, geçirilmiş enfeksiyonlar, varikosel, azospermi, oligospermi, astenozoospermi gibi durumlarda en sık karşılaşılan erkeğe bağlı infertilite sebepleri olarak sıralanabilmektedir.

Son yıllarda infertil çiftlerin çocuk sahibi olabilme olasılıkları, üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYTE) geliştirilmesine paralel olarak artmıştır. İlk mikroenjeksiyon uygulaması 1992 yılında gerçekleşmiş, o zamandan günümüze infertiliteye çözüm arayışları için yardımcı üreme teknikleri çalışmaları gelişmiş ve hızlanmıştır. Özellikle erkek faktörlü infertilite açısından değerlendirildiğinde, bu gelişmeler infertilitenin çözülebilir bir sorun olduğunu göstermiştir.

Tüm bu gelişmelere rağmen idiopatik infertilite olgularında hala yanıt bekleyen birçok soru kalmıştır. Spermatozoadaki motilite ve vitalite değerlerinin normal sınırlar altında olması bu sorunlardan başlıcalarıdır. Spermatozoanın motilite ve vitalite değerlerinin infertilitedeki önemi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Motil ve vital spermatozoa sayısı azaldıkça doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır. Bu soruna yanıt arayan araştırmacılar motilite ve vitalitenin azalmasında, semendeki oksidatif stresin sorumlu olabileceğini düşündürten veriler ortaya koymuşlardır.

Normal koşullar altında, reaktif oksijen türleri (ROS) kadın ve erkek genital

kanallarında düşük konsantrasyonda mevcuttur ve antioksidan aktivitesi ile dengeli bir şekilde muhafaza edilir. Yüksek oranda bulunan ROS, oksidatif strese sebep olarak lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın hasarında rol oynar. Meydana gelen hasarlar sonucunda sperm motilite ve vitalitesinde azalma, morfolojik defektlerde artma gözlenir. Idiopatik infertilite olgularının yüksek çoğunluğunda yüksek ROS oranı, düşük antioksidan aktivitesi gözlenir.

Erkek ve kadın üreme kanalları içerdikleri ROS'un yanı sıra, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan molekülleri de içermektedir. Bu moleküller spermatozoayı ROS'un yan etkilerinden korur. Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda, oral yollarla alınan antioksidanların sperm konsantrasyon ve motilitesinde artışa, sperm DNA fragmantasyon oranında ise azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Biz de yaptığımız literatür incelemesi neticesinde bitkisel antioksidanların *in vitro* ortamda da sperm parametreleri üzerine etkilerinin olabileceğini düşündük. Bu çalışma ile de antioksidanlar bakımından zengin olan çeşitli bitki ekstraktlarının sperm fonksiyonları üzerinde *in vitro* ortamdaki etkilerini incelemeyi amaçladık.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1. Erkek Üreme Sistemi**

Erkek üreme sistemi; spermatozoanın sürekli üretimi, beslenmesi ve depolanmasından, ve erkek seks hormonlarının sentezi ve salgılanmasını gerçekleştirir (Kierszenbaum, 2006)

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı genital bezler ve penisten oluşturmaktadır. Erkek gonad olan testisler karın boşluğunun dışarısında skrotum içinde yer alan, hem hormon hem de spermatozoa üreten organlardır. Duktuli eferentes, duktus epididimis, duktus vas deferens, duktus ejakulatorius ve üretradan oluşan genital kanallar testiste üretilen spermatozoayı penise taşımaktadır. Seminal veziküller, prostat bezi ve bulboüretal bezler yardımcı genital bezler olup; penis yapısında erektil dokuları barındıran çiftleşme organı olarak işlev görmektedir (Junqueira and Carneiro, 2009).

Genital kanallar ve yardımcı bezler, düz kasların kasılması yoluyla testiste üretilen spermlerin kanallara ve üretraya taşınmasını sağlayan salgıları üretirler. Bu salgılar aynı zamanda erkek üreme sistemi içindeki spermlerin besin ihtiyacını karşılar. Spermler ile birlikte genital kanalların ve yardımcı bezlerin salgısı, penisten ejakülasyonla atılacak olan semen sıvısını meydana getirmektedir (Kierszenbaum, 2006, Junqueira and Carneiro, 2009, Ross and Pawlina, 2009).

#### **4.1.1. Testis histolojisi**

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde asılı duran bir çift organdır. 4-5 cm uzunlukta, 2,5 cm genişlikte, 3 cm kalınlıkta ve 10-15 gr ağırlığındadır. Testislerin bu yerleşimleri vücut ısısından 2-3 °C düşük ısıda olmalarını sağlar. Testisler periton ile sarılmadan önce karın boşluğunun arka duvarında gelişmeye başlarlar. Periton kesesi daha sonra tunika vaginalise dönüşür ve testisin skrotum içinde hareketli olmasını sağlar. Ortalama testiküler hacim 20 ml'dir

Testisler, erkek üreme hücresi olan sperm üretimini ve androjenlerin sentezini, depolanmasını, sekresyonunu sağlarlar. Ekzokrin ve endokrin salgı



işlevleri vardır (Gartner and Hiatt, 2007, Akay, 2001). Testislerin düzenli şekilde işlevlerini yerine getirebilmeleri için, hipofiz bezinin Leydig hücreleri ve Sertoli hücreleri arasındaki ilişki ile ayarlanabilen hormonal kontrol düzeneği gereklidir (Clermont, 1972).

Testis, tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsülle sarılır. En dış kısımdaki visseral katman olan tunika vajinalis, kapsülü dıştan sarar (Ovalle and Nahirney, 2009). Testisin arka kenarında kapsül kalın bir katlanma şeklinde içeriye doğru uzanır, bu kısım “mediastinum testis” adını alır. İnce fibröz bölmeler, mediastinumdan ışınsal olarak uzanarak yaklaşık 250 adet lobülü oluşturur (Ovalle and Nahirney, 2009). Her lobülde 1-4 adet gevşek bağ dokusu ile sarılı, kıvrımlı yapıda, spermatozoon üretiminden sorumlu olan seminifer tübüller bulunur (Gartner and Hiatt, 2007). Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreleri içerir. Leydig hücreleri, testis androjenlerinin sekresyonundan sorumludurlar. (Junqueira and Carneiro, 2006).

Her bir seminifer tübül, U şeklinde iki ucu olan rete testise açılır. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünlerini toplayan kanallar ağıdır. Seminifer tübül, somatik Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelyumdan oluşur (Kierszenbaum, 2006). Seminifer epitel, bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar, kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrelenmiştir. Miyoid hücreler, hareketsiz spermatozoonları rete testise ileten ritmik kasılmalardan sorumludur (Kierszenbaum, 2006).

#### **4.1.1.1. Spermatogenik hücreler**

Spermatogenik hücreler, bazal membran üzerine yerleşmiş ve tübül duvarını döşeyen epitelin çoğunluğunu oluşturan ve farklı gelişim aşamalarında olan, düzenli sıralanmış hücrelerdir. Hücreler geliştikçe tüp kenarından lümene doğru yer değiştirirler (Davidoff, Schulze, Middendorff, Holstein 1993, Turek, 2004). Seminifer tübülde spermatogenik seri hücreler bazaldan lümene doğru spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve spermiyum olmak üzere dört hücre tipi şeklinde sıralanır (Junqueira and Carneiro, 2006).

Spermatogonyumlar, bazal lamina ile doğrudan ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir (Kierszenbaum, 2006). Bazal laminanın hemen üstünde yer alan diğer seri hücelere kıyasla daha küçük hücrelerdir (Junqueira and Carneiro,

2006). Puberte başlangıcında testosteron hormonu etkisiyle mitoz bölünme ile çoğalmaya başlarlar (Gartner and Hiatt, 2007). Yapısal olarak koyu A (A dark, Ad) tipi spermatogonyum, açık A tipi (A pale, Ap) spermatogonyum ve B tipi spermatogonyum olmak üzere üç esas spermatogonyum tipi gözlenir (Clermont, 1972).

Seminifer epitelin kök hücreleri olan Ad tipi spermatogonyumlar bazal lamina tabanı üzerine yerleşmişlerdir. Bu hücreler depo hücreleridir ve hücre döngüsüne girmezler. Mitoz bölünmeyle düzensiz olarak bölünerek hem yeni Ad tipi spermatogonyumları ve hem de Ap tipi spermatogonyumları meydana getirirler (Ross, 2006). Ap tipi spermatogonyumlar fonksiyonel olarak hayat boyu spermatogenezde aktif rol oynarlar (Meachem et al,2001, Ehmcke, Wistuba, Schlatt, 2006). Her siklusta kendilerini yenilerler. Ap tipi spermatogonyumlar mitozla çoğaldıklarında sitoplazmik bölünme tam anlamıyla gerçekleşmez ve birbirlerine sitoplazmik köprüler ile bağlı kalırlar. Ap spermatogonyumdan türeyen diğer seri hücreleri de birbirlerine bağlı kalarak hücre kolonisini oluştururlar. Bu bağlantılar spermiomorfogeneze kadar sürer. Testosteron hormonunun etkisiyle Ap spermatogonyumla mitozla bölünürler ve spermatogenezde etkin rol oynayan B tipi spermatogonyumları oluştururlar (Ross, 2006). B tipi spermatogonyumlar spermatogonyumların en çok bulunan tipidir. Bazal lamina üzerinde yer alırlar ancak bağlantıları daha azdır. B tipi spermatogonyumlar, hem mitozla çoğalırlar, hem de bazıları mayoz bölünmeye girerek primer spermatositleri oluştururlar (Junqueira and Carneiro 2006, Ross 2006).

Primer spermatositler spermatogenik serinin tübül duvarında en çok görülen hücreleridir (Moore and Persaud, 2002). B tipi spermatogonyumlar mayoz ile bölünerek, primer spermatositleri oluştururlar. Spermatositler Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantıların oluşturduğu kan testis bariyerinin hemen üzerinde yer alırlar. Bunun sebebi de mayoz hücre bölünmesinin her iki aşamasında da sperm spesifik antikorların meydana gelmesini engellemektir (Seçkin, 2008).

Spermatidler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda Sertoli kriptaları içine yerleşmişlerdir (Kierszenbaum, 2006). Spermiogenez veya spermiomorfogenez süresince spermatidler, bol hidrolitik enzim depolayıp, organellerini azaltırlar daha sonra sitoplazmalarının bir kısmı atılır ve flagellumla ilgili yapılar şekillenir (Gartner and Hiatt, 2007).

#### 4.1.1.2. Sertoli hücreleri

Seminifer tübüllerin bazal membranı üzerine oturup lümene kadar uzanan büyük, oval ya da üçgen biçimli ve ökromatik destek hücreleridir. Belirgin bir nükleolus içeren yuvarlak veya üçgen şekilli ökromatik nükleusları bazal sitoplazmada izlenir. Organel bakımından zengin hücrelerdir (Eşrefoğlu, 2014). Sertoli hücrelerinin çeşitli işlevleri vardır. Gelişmekte olan spermatogenik hücelere karışı destekleme, beslenme ve korunma işlevlerini sağlarlar. Spermatogenik seri hücrelerinin bir arada bulunduğu ağ sistemi, Sertoli hücrelerinin sitoplazmik uzantıları ve yüzeylerindeki kriptaları yoluyla besin maddeleri ve metabolitlerin alınıp verilmesini sağlar. Seminifer tübüllerin iç kısmıyla kan arasında bir bariyer yer alır. Bu bariyere rağmen spermatogenik hücrelerin ihtiyaç duydukları büyük moleküllerin geçişi sağlanabilmektedir. Sertoli hücreleri bariyerleri bu geçişi engelleyerek spermatogenik hüceleri pek çok patolojik etmene karşı korur. Spermiyogenez sonunda spermatidler tarafından atılan atık cisimler, Sertoli hüceleri tarafından fagosite edilip, lizozomların yardımı ile parçalanır (Junqueira and Carneiro, 2006).

#### 4.1.2. Spermatogenez

Embriyonik ve fetal gelişim döneminde, spermatogonyumlar primordial germ hücrelerinden köken alır. Yeni doğan bir erkek çocuğunda seminifer tübüller, Sertoli hüceleri ve daha az olmak üzere spermatogonyumlar tarafından kuşatılmıştır. Puberteye yaklaştıkça spermatogonyumlar artar ve gelişme puberteye kadar bu aşamada duraklar. Spermatogenez, erkek bireylerde puberte ile başlayıp germ hücelerinin çeşitli aşamalardan sonra olgun sperm hücelesine dönüştüğü bir süreçtir (Parks, Lee, Huang, Kaproth, 2003). Bu süreç, spermatogenik hücelere çevrili olan seminifer tübüllerde gerçekleşir. İnsanlarda tüm spermatogenez süreci yaklaşık olarak 64 gün sürer ve olgun spermatozoanın ejakülatta görülmesi ise 74 gün alır. Germ hüceleri mayoz bölünme sonunda 46 kromozomlu diploid halden 23 kromozomlu haploid hale gelirler. Daha sonra haploid spermin, yine haploid olan oosit ile birleşmesiyle tekrar 46 kromozomlu yeni bir bireyin oluşmasına olanak sağlanmış olur. Spermin bu farklılaşma aşamaları; spermatogonial faz

(spermatositogenez), spermatosit fazı (mayoz) ve spermatid fazıdır (spermiogenez) (De Jonge et al., 2004). Spermiyogenezis sürecini tamamlayan spermatidlerin Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasından serbest kalması ise spermiyasyon olarak isimlendirilir (Kierszenbaum, 2006).

#### **4.1.2.1. Spermatogonial faz**

Diploit spermatogonyumların primer spermatositlere farklılaşması olayıdır. Puberte döneminden önce, testisteki seminifer tübüllerin epiteli, az sayıda germ hücresine karşılık çok sayıda Sertoli hücresi içerir. Puberteyle beraber çok önemli nörohormonal değişimler olur. Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormonun etkisiyle hipofiz ön lobundan FSH ve LH salgılanır (Karagöz, 2002). FSH ve LH etkisiyle, genç ve ilkel spermatogonyum tip A hücreleri mitoz bölünme ile hızla çoğalarak çok sayıda yeni spermatogonyum tip A jenerasyonlarını oluştururlar (Karagöz, 2002). Bu mitotik aktivite ile hem spermatogenez için yeterli sayıda hücre elde edilirken hem de kaynak hücre ihtiyacı sağlanır. Böylece spermatogenik hücreler zarar görürse kaynak hücreler mitotik aktivite sayesinde çoğalarak spermatogenik sürecin devamını sağlar. Tip B spermatogonyumlar mitoz ile çoğalarak bir taraftan sayılarını arttırırlar, bir taraftan da bazıları mayoz bölünmeye girerek primer spermatositlere dönüşürler. Böylece spermatosit evresi başlamış olur (Means, Fakunding, Huckins, 1976).

#### **4.1.2.2. Spermatosit fazı**

Erken evredeki spermatositler başlangıçta bazal membrana yakın olarak bulunurlar ve spermatogonyumlarla aynı yapısal özellikleri taşırlar. Birbirine bitişik Sertoli hücrelerinin oluşturduğu bölümde yer alarak gelişim süreci içerisinde lümene doğru ilerlerler (Karagöz, 2002). Spermatosit fazında spermatogonyumlar ile primer spermatositler Mayoz I aşamasındadır. Gelişim süreci ilerledikçe hücre hacimleri artar. Çekirdek morfolojileri de mayoz bölünmenin profaz aşamasına uygun özellikler gösterir. Primer spermatositler 1. Mayoz bölünmesini tamamlayarak sekonder spermatositleri oluşturur. Sekonder spermatositte 2. Mayoz bölünmesini tamamlayarak spermatidleri meydana getirir. Mayoz bölünme ile elde edilen sonuçlar

şunlardır; Spermatozoonlardan her biri, homolog kromozom çiftlerinin yalnızca bir temsilcisini içerir, maternal ve paternal kromozomlar yavru hücrelere rastgele dağılır ve crossing over ile genetik çeşitlilik artar (Delilbaşı, 2008). Spermin farklılaşma aşamalarından olan spermatid fazı 3. fazdır ve sekonder spermatositlerin 2. Mayoz bölünmeyi tamamlamasıyla oluşan spermatidlerin geçirdiği morfolojik değişiklikleri kapsar. Bu döneme spermiyogenez veya spermiyomorfogenez denir.

#### **4.1.2.3. Spermiyogenez (spermiyomorfogenez)**

Spermiyogenez, spermatozoon üretiminin en son aşaması ve spermatidlerin erkek deoksiribonükleik asidini (DNA) ovuma aktarmak için spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu evrede hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler, Sertoli hücreleri arasında tübül lümene en yakın bulunan hücrelerdir. Gelişimlerinin ileriki safhalarında Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına gömülü vaziyette bir seri yapısal değişiklikler geçirdikten sonra spermiyumlara dönüşerek tübül lümenine salınırlar. Bu yapısal değişiklikler akrozom oluşumu, flagellum şekillenmesi, kromatin yoğunlaşması ve fazla sitoplazmanın atılmasıdır. Spermatidin, Golgi kompleksinde oluşan veziküllerin ön kısma doğru hareket etmesiyle akrozomal kepi oluşturur. Bu kepi içerisinde akrozomal enzimler yer alır ve bu enzim fertilizasyon sırasında aktifleşerek oosit çevresindeki yapıların eritilmesini sağlarlar. Spermiyogenez; Golgi evresi, kepi evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi olmak üzere 4 evreden oluşur ( Delilbaşı, 2008 ).

Golgi evresi: Spermatidin sitoplazmasında çekirdek yakınında belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriyonlar, bir çift sentriol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum bulunur. Spermatidin endoplazmik retikulumunda üretilen hidrolitik enzimler golgi kompleksine iletilip, çeşitli değişiklikler geçirerek golgi kompleksinin trans yüzünden “proakrozomal granül“ adı verilen PAS(+) granüller halinde salınırlar. Bu granüllerin birleşmesiyle oluşan akrozomal veziküller, çekirdek zarına yapışık halde olup, aynı spermin ön kutbunu belirlerler. Bu evrede sentrioller, çekirdek bölgesinden uzaklaşır ve oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma yerleşirler. Bir tanesi flagellumun aksonemini ( 9 çift periferde, 2 tane merkezde mikrotubuus yapısı içeren, kuyruk iskeleti) oluşturmak üzere akrozomal bölgenin karşı kutbunda konumlanır (Junqueira and Carneiro 2006, Ross,

2006).

Kep (şapka) evresi: Akrozomal vezikül genişleyerek büyür, çekirdekle temas ettiği yerden başlayarak, çekirdeğin ön kısmını yarıya kadar bir başlık gibi sarar. Akrozomal vezikül son büyüklüğüne ulaştığında hidrolitik enzimleri içeren akrozom adını alır.

Akrozom evresi: Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom içerisinde hyalüronidaz, akrozin, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteazlar gibi hidrolitik enzimler yer alır. Bu yüzden akrozom özelleşmiş bir lizozom gibi işlev görür. Bu enzimlerin, oositi çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Spermatozoonlar bir oosit ile karşılaştığında, akrozomun dış zarı birçok bölgede spermatozoonun plazma zarı ile kaynaşarak akrozom enzimlerinin hücre dışına boşalmasını sağlar. Bu işlem 'akrozom reaksiyonu' olarak bilinir. Bu reaksiyon döllenmenin ilk basamaklarından biridir (Junqueira and Carneiro 2006, Ross, 2006).

Spermiyogenezin bu evresinde, spermatid seminifer tübülünün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümenine doğru uzanır. Ayrıca, çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden biri gelişerek kamçıyı oluşturur. Mitokondriyumlar da kamçının proksimal kısmı etrafında toplanarak 'orta parça' adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur. Kamçı hareketi, mikrotübüller, Adenozin trifosfat (ATP) ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkilemesi sonucunda oluşur (Junqueira and Carneiro 2006, Ross 2006.).

Olgunlaşma evresi: Spermatidlerin arasındaki protoplazmik köprülerin ortadan kalkmasıyla oluşan artık cisimcik adı verilen sitoplazmik kısımlar Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler. Spermatitteki değişiklikler sonucunda türe has genetik özellikleri taşıyan olgun fakat hareket ve dölleme yetenekleri olmayan spermatozoonlar gelişir. Bu spermatozoonlar tübül lümenine bırakılır. Bu olaya spermiyasyon denir. Spermiyasyon olayıyla Sertoli hücrelerinden ayrılıp seminifer tübül lümenine geçen spermatozoonlar, morfolojik olarak olgun germ hücresi olmasına rağmen, fonksiyonel olarak henüz olgun değildir. Hareket yeteneklerini yardımcı bezlerin salgıları ile duktus epididimiste ve dölleme yeteneklerini dışı genital kanallarında kapasitasyon geçirerek kazanırlar.

#### 4.1.2.4. Spermatogenezi etkileyen faktörler

Spermatogenez, hipofizden salgılanan FSH ve LH hormonlarının testis hücreleri üzerindeki etkisine bağlıdır. Bu hormonlar, spermatogenez serisindeki hücrelerin normal gelişimi için gerekli olan testosteron üretimini uyarır. FSH'nin Sertoli hücreleri üzerinde etkili olduğu, siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerini arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca, androjen bağlayıcı protein sentezini ve salgısını da uyarır. Bu protein, testosteronu bağlayarak seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron aracılığı ile uyarılır, östrojenler ve progesteronlar tarafından baskılanır (Junqueira and Carneiro 2006, Ross, 2006).

Ortalama vücut sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıklarda gerçekleşen spermatogenezin düzenlenmesinde sıcaklık çok önemlidir. Spermatogenez için 35 °C'lık bir sıcaklık kritiktir. Bu sıcaklık, spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu pampiniform pleksus tarafından skrotumda sağlanır ve sıcaklığı dağıtmak için ters yönlü akımla ısı değişimi görevi görür. Sıcaklık 35 °C'nin altına düştüğünde, spermatik kordondaki kremaster kasının ve skrotal kesenin dartos kasının kasılması sıcaklığı arttırmak için testisi karın boşluğuna yakınlaştırır. Spermatik kordon venlerinin anormal genişmesi nedeniyle oluşan varikoselin bir sonucu spermatozoon üretiminde azalmadır (Kierszenbaum, 2006). Testisin inişindeki bozukluk olan kriptorşidizm'de testisler 37 °C'de kalır ve spermatogenez inhibe olur (Kierszenbaum, 2006).

#### 4.1.2.5. Spermatozoon kapasitasyonu ve hareket kazanması

Spermatozoon hücreleri epididimisten ayrılıncaya kadar hareket kazanmazlar. Dişi üreme sistemine geçtikten sonra, spermatozoonlar kapasitasyon geçirerek dölleme yeteneği kazanır. Kapasitasyon; spermatozoon motilitesi (hiperaktivasyon), spermatozoon yüzey değişiklikleri, akrozom reaksiyonu ve oosit-sperm füzyon olayları şeklinde gerçekleşmektedir ( Zülfiaroğlu ve ark., 2010). Kapasitasyon sonrası spermatozoonlarda morfolojik değişiklik gözlenmez, ancak daha aktif hale gelirler. Spermatozoonların kapasitasyonu uterus ya da uterin tüplerin içinden geçtiği sırada buralardan salgılanan maddeler yardımıyla olur (Moore and Persaud, 2009). İnsanda yaklaşık 7-8 saat süren kapasitasyon olayı ile spermatozoonun akrozomal

yüzeyini kaplayan plazma membranı üzerindeki glikoprotein kılıfları ve seminal plazma proteinleri tamamen ortadan kaldırıldıktan sonra akrozomal reaksiyon başlar.

#### **4.1.2.6. Akrozom reaksiyonu**

Akrozom, spermatogenez sırasında golgi kompleksinden köken alan bir yapı olup, sperm oosit ile teması sonucu akrozom reaksiyonunu başlatmaktadır. Sperm ile ovumun yüzeysel tutunması, ovumdaki fertilizin ve spermdeki antifertilizin reseptörlerinin ekileşimi türe özeldir. Sperm zona reseptörlerinin oosit membran proteini olan zona pellusida ile teması sonucu kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) kanalları açılırken, oosit kumulus hücrelerinden salınan progesteronun, sperm membranındaki GABA reseptörleriyle teması sırasında klor ( $Cl^-$ ) kanalları açılmaktadır. Ayrıca sperm membranından  $H^+$  ayrılmasıyla pH artışı gerçekleşirken, fosfolipaz A2 ( $PLA_2$ ) artışı ile araşidonik asit, lyosofosfatidilkolin ve platelet-aktive edici faktör artışı gerçekleşmektedir. Spermatozoon iç ve dış akrozomal membranı arasında akrozomal enzimler olarak bilinen hyalüronidaz, akrozin, nöraminidaz ve tripsin benzeri maddeler yer alır. Oosit plazma membranı ile spermatozoon dış akrozomal membranının birleşmesiyle, ekzositoz sonucu hidrolitik veziküller dış ortama salınır. Serbest bırakılan ilk enzim, hyalüronidazdır. Hyalüronidaz spermatozoonun, korona radiata tabakasını geçmesini sağlarken, akrozin ve tripsin benzeri maddeler zona pellusidayı eriterek, spermatozoonun oosite ulaşmasına olanak verir (Zülfikaroğlu, 2010). Spermatozoonun kapasitasyonu sonucu oluşan hiperaktivasyon ile oosit membranında meydana gelen penetrasyon yarığında spermatozoon girişi gerçekleşir.

#### **4.1.3. Olgun spermatozoon**

Olgun bir spermatozoon baş, boyun ve kuyruk bölgesinden oluşur. Toplam uzunluğu yaklaşık 60  $\mu m$  kadar olan spermatozoon baş kısmının boyu 3-5  $\mu m$ , eni 2-3  $\mu m$  dir. Baş bölümünün büyük kısmını yoğun ve kompakt yapıdaki nükleus kaplamaktadır. Aşın esas görevi DNA materyalini taşımak ve korumaktır. Bu yapıları saran akrozom bulunmaktadır. Akrozom baş ve ekvatoryal bölge olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Boyama yoğunluğuna bağlı olarak akrozom sperm



başının %40-70'ini kaplayan oval yapıda görülmektedir. Spermatidin Golgi cisimciğinden oluşan akrozomal yapı, fertilizasyon için gerekli hyalüronidaz ve proakrozin gibi hidrolitik enzimle içermektedir. Ovumun fertilizasyonu sırasında akrozomal membranın oosit plazma membranı ile birçok bölgeden birleşmesi ile akrozom reaksiyonu oluşmakta ve enzimatik yapı serbest kalmaktadır (Gartner and Hiatt 2007). Akrozomal bölgede vakuoller de bulunmaktadır.

Boyun bölgesinin uzunluğu yaklaşık 0,3 µm olup, yapısında segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriol bulunur. Proksimalde iki çift bölünmüş sütun, 2 major ve 2 minör sütun oluşturup başın alt kısmında birleşirler. Distal sentriyol ise spermiogenezin ileri evrelerinde ortadan kalkmaktadır. Bunlar aksonemin oluşumu sırasında önemli bir rol oynar. Proksimal sentriyol 9 adet üçlü dış mikrotübül içerir. Ortada ise mikrotübül çifti yoktur.

Spermin hareketini sağlayan kuyruk kısmı ise 45 µm uzunluğunda ve 0.4-0.5 µm çapındadır. Kuyruk spermatozoonun hareketini sağlar ve fertilizasyonun gerçekleşeceği bölgeye gitmesine yardım eder. Orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç bölümden oluşur. Kuyruğun orta parçası 5-9 µm uzunluğunda, 1 µm çapındadır. Boyun ile esas parça arasında uzanır. Orta parça oluşturan aksonem ve dış yoğun fibrillere ek olarak helezon tarzında dizilmiş büyük mitokondrilere sahiptir. Aksonemin çevresinde 9 adet dış yoğun lifler, bunların etrafında kuyruğa enerji sağlayan spiral tarzda düzenlenmiş mitokondriler yer alır. Kuyruğun sonuna doğru dış yoğun lifler incelerek kaybolur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır ve yaklaşık 45µm uzunluğundadır. 7 dış kalın lifle sarılı, aksonem ve bunları çevreleyen fibröz bir kılıftan oluşur. Bu fibröz kılıf ve lifler spermin öne hareketi sırasında mikrotübüller kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluştururlar. Esas parça mitokondri sarmalının son bölümünün altında yoğun bir halka olan annulus adı verilen son halkadan başlar, mitokondriyon sarmalı içermez. Son parça yaklaşık 5 µm uzunluğunda olup spermin en kısa parçasıdır. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanması nedeniyle sadece aksonemi içerir, sonuna doğru aksonem mikrotübüllerin sayısında azalma olur (Kierszenbaum, 2006).

#### **4.1.3.1. Sperm membranı**

Spermatozoon membranı, protein, lipid ve karbonhidrat yapısındadır. Lipidlerin esas görevi membran yapısını oluşturarak stabilizasyonu sağlamak, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit-sperm füzyonunda rol almaktır. İnsan spermatozoonları yüksek oranda fosfotidil kolin, fosfotidil etanolamin ve sfingomiyelin içerir. Fosfolipidlerle birlikte kolesterol sperm membranının bütünlüğünü ve impermeabilitesini sağlar. Spermatozoon membranının yapısında, mannoz ve glukoz gibi monosakkaridler ile disakkaridler bulunur. Tirozin, tripofan ve histidin ise esas aminoasit yapısını oluşturmaktadır. Spermatozoonların membranında spesifik antijenler ( tirozin kinaz sp 95, proakrozin, PH-20, PH-30, sp 56, galaktozilt galaktoziltransferaz, spermadezinler, progesteron reseptörü ) dışında, hücre- hücre ya da hücre-matriks etkileşimini yürüten nonspesifik proteinler, matriks proteinleri ile (kollajen, fibronektin, laminin, adezyon molekülleri) birlikte, immünoglobülinler, kaderinler, selektinler ve integrinler gibi adezyon moleküllerinin de yer aldığı gösterilmiştir (Zülfikaroğlu, 2010).

#### **4.1.4. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi**

Erkek infertilitesinin araştırılması sırasında, erkek sistematik bir şekilde incelenmelidir. Değerlendirme, anamnez, fiziksel muayene ve ejakulatın laboratuvarında incelenmesini kapsar. İlk ve temel yöntem semen analizidir (Burrows, Schepterman, Lipshultz, 2002). Semen incelenmesinde klasik olarak spermatozoaların semen içerisindeki sayısı, motilitesi ve morfolojisi değerlendirilir. Hastanın öyküsü ayrıntılı olarak alınmalıdır. Erkek infertilitesi değerlendirilirken tıbbi ve üreme öyküsü, bir ürolog ya da bu konuda uzman kişi tarafından yapılmış fizik muayene ve en azından iki semen analizi gereklidir. Sonuca göre infertilitenin etiolojisine göre ek testler istenebilir.

#### **4.1.4.1. Semen analizi**

Erkek infertilitesi araştırılırken fizik muayene ve anamnezden sonra ilk adım semen analizidir. Her hastanın en az 15 gün ara ile yapılmış 2 ya da 3 semen analizi olmalıdır.

#### **4.1.4.2. Semen**

Semen sıvısı, spermatozoonun testis ve epididimis salgısının, ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerin salgılarının birleşmesiyle oluşur. Sonuç olarak, oluşan viskozitesi yüksek sıvı “semen” adını alır. Bu salgıda spermatozoon, semen sıvısının %5’ini oluşturur. Cinsel birleşme sırasında, spermatozoonları içeren semen, penis aracılığıyla dişi üreme sistemine iletilir.

Prostat salgısı, duktus deferens ve dişi üreme yollarının asidik salgılarını nötralize ederek spermatozoonların hareket kazanmasına yardımcı olur. Spermatozoonlar için gerekli enerji seminal veziküllerin fruktozdan zengin salgısından sağlanır (Gartner and Hiatt, 2009).

#### **4.1.4.3. Semen toplaması**

Semen örneği laboratuvarında hastalar için hazırlanmış olan özel odalarda verilmelidir. Örnek ağzı geniş, kapağı kilitli, steril ve poliesterden yapılmış plastik kaplara alınmalıdır. Klasik semen analizi için incelenecek olan ejakulat en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrasında masturbasyon ile alınmalıdır. Cinsel perhiz süresi, sperm konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bundan dolayı 2-7 günlük cinsel perhizden sonra spermlerin epididimiste kalma süreleri parametreleri etkileyeceğinden cinsel perhiz süresi 7 günü geçmemelidir. Perhizi uygun olan hasta semen örneğini masturbasyon yoluyla vererek örneğin tamamını steril plastik kaba toplamalıdır. Masturbasyondan önce ellerin dezenfektan ve sabun ile yıkanmaması ayrıca herhangi bir kayganlaştırıcı ürünün kullanılmaması gerekmektedir. Uygun koşullarda semen örneği alınan kişinin adı-soyadı, örneğin verildiği tarih ve saat yazılıp etiket ile kap üzerine yapıştırılmalıdır.

#### 4.1.4.4. Semen makroskopik değerlendirilmesi

Likefaksiyondan hemen sonra ya da ejakülasyondan sonraki 30 dakika ile bir saat içinde semenin gözlenmesi ile analize başlanmalıdır. Likefaksiyon genellikle ilk 15 dakika içinde görülmesine karşın normal semenin likefaksiyonu oda sıcaklığında 60 dakikada tamamlanır. Tam likefaksiyon 60 dakikada oluşmazsa bildirilmelidir. Likefaksiyon sırasında örneğin düzenli olarak karıştırılması homojen bir örnek elde edilmesine yardımcı olabilir. Nadiren likefaksiyon oluşmayarak semen değerlendirmesini zorlaştırır. Bu tür vakalarda mekanik karıştırma veya enzim ile çözme gerekebilir. Bu uygulamalar seminal plazma biyokimyasını, sperm motilitesini ve morfolojisini etkileyebileceklerinden dolayı raporda belirtilmelidir.

Likefaksiyondan sonra geniş ağızlı (yaklaşık 1.5 mm) plastik pipete örneği dikkatlice çekerek ve yerçekiminin etkisiyle damlamasını bekleyip damla ile pipet arasında oluşan ince ipliğin uzunluğu gözlenerek viskozitesi ölçülebilir. Normal bir örnek pipeti küçük ayrı damlalar şeklinde terk eder. Anormal viskozitelerde bu uzunluk 2 cm'den daha uzundur. Yüksek viskozite sperm motilitesini, konsantrasyonunu, sperm antikora kaplanmasını ve biyokimyasal ölçümleri etkileyebilir. Viskoziteyi azaltma yöntemleri gecikmiş likefaksiyonda kullanılanla aynıdır.

Likefiye olmuş normal bir örnek homojen ve gri-opelasan bir görünüme sahiptir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse örnek daha az opak görünür. Renk, örneğin eritrosit varsa (hemospermi) kırmızı-kahverengi, hastanın sarılığı varsa veya bazı vitaminlerin ve ilaçların kullanımı ile sarı olabilir. Ejakülatın hacminin oluşumuna ağırlıklı olarak seminal vezikül, prostat salgıları, bir miktar bulboüretal bezler ve epididim katkıda bulunur. Total sperm hücresi ve sperm olmayan hücrelerin sayısının hesaplanmasında kullanılacağı için hacmin hassas bir şekilde ölçülmesi gerekir. Semen hacmi için en düşük referans değeri 1,5 ml'dir (WHO, 2010).

Düşük semen hacimleri, ejakülatuar kanal obstrüksiyonu veya seminal vazikül gelişiminin yetersiz olduğu konjenital bilateral vas deferens agenezisinin karakteristiğidir. Hacmin düşük olması aynı zamanda örnek toplama problemi, parsiyel retrograd ejakülasyon ve androjen eksikliğini de gösterebilir. Yüksek semen volümleri aksesuar bezlerin aktif inflamasyonunda gözlenen aktif eksudasyonun bir yansıması olabilir. Semen hacmi 1 ml veya daha az ise hipospermik, 6 ml'den daha

fazla ise hiperspermik olarak adlandırılır. Seminal sıvının tam yokluğuna ise aspermi denilmektedir (Delilbaşı, 2008).

Semen pH'sı 7,2 ile 8 arasında olmalıdır. Ölçümün geç yapılması halinde seminal plazmanın salgıladığı CO<sub>2</sub> nedeniyle pH artabilir. Normalde pH değerinin 8 üzerine çıkması akut enfeksiyonların göstergesi iken, pH 7'nin altında olması azosperminin yanı sıra boşaltım kanallarının obstrüksiyonu ve aksesuar bezlerin agenezini düşündürür (De Jonge et al, 2004).

Normal semen çok az miktarda visközdür, ancak kronik enfeksiyonlardan kaynaklı viskozitesi artabilir. Ejakülasyondan 5-40 dk sonra semen önce koagüle sonra da likefiye olur. Koagülasyondan veziküla seminalisten salınan proteinokinaz enzimi, likefaksiyondan ise prostat ve Cowper bezinin sekresyonundaki proteolitik enzimler sorumludur. Likefaksiyonun geciktiği durumlarda semenin laboratuvarda tekrar çözünmesi sağlanarak mikroskobik incelenmeye alınmalıdır (Gökçe, 2011).

#### **4.1.4.5. Semen mikroskobik değerlendirilmesi**

Taze semen değerlendirmesi için faz-kontrast mikroskobisi önerilir. İlk mikroskobik değerlendirme sırasında konsantrasyon, motilite, mukus iplikleri formasyonu, sperm agregasyon ve aglütinasyonu ve spermden farklı hücresel elemanların değerlendirmesi yapılabilir. Örnek iyi karıştırılmamışsa geniş ağızlı plastik bir pipete 10 kez aspire edilmesi ile örnek karıştırılabilir. Spermelere hasar verebileceğinden dolayı yüksek hızlı karıştırıcılar kullanılmamalıdır. Semen hacmi ve lamel boyutlarının da standart olması gerekir. Böylece analizler her zaman derinliğin yaklaşık 20 µm'de sabit olduğu preparatlarla yapılmış olur. Derinliğin 20 µm'nin altında olması spermlerin rotasyonel hareketini zorlayabilir.

Sperm sayımı için hemositometre, microcell, CellUV, Standard Count, Makler gibi çeşitli sayım kamaraları kullanılmıştır. Günümüzde yaygın olarak Makler sayım kamarası kullanılmaktadır. Makler kamarası, içerisinde 100 karelik alan bulunan sayım kamarasıdır ve bu alanlar içindeki spermler sayılarak değerlendirmelerde yapılır. Doğru bir sonuç alabilmek için en az 10 karede sayım yapılır ve saptanan sayı ile 10<sup>6</sup> ile çarpılarak (x 10<sup>6</sup> /ml) sperm sayısı belirlenir. Makler kamarasıyla değerlendirme yapılırken kamara ısısının 37°C olması, kamaraya koyulan ejakülat miktarının 10µl 'yi geçmemesi ve hava kabarcığı

kalmaması iyi sonuç alınabilmesi için gereklidir (Delilbaşı, 2008). 10 µl semen sayım kamarası üzerine konur.

Hareketsiz spermilerin birbirleriyle, mukus iplikleriyle debris veya sperm olmayan hücrelere yapışması sonucu oluşan nonspesifik agregasyon gözlenirse kaydedilmelidir. Hareketli spermilerin birbirlerine baş-baş, kuyruk-kuyruk veya mikst şekilde yapışmalarına aglütinasyon denir ve bu izole form, orta, çok ve şiddetli olmak üzere derecelendirilebilir (1-4 arası).

Aglütinasyon, agregasyondan ve hareketli spermilerin debris veya sperm dışı hücrelere yapışmasından ayırt edilmelidir. Aglütinasyon olması infertilitenin nedeninin immünolojik olduğu için yeterli kanıt değildir ama antisperm antikor çalışılmasını ve daha ileri incelemelerin yapılmasını düşündürülebilir. Şiddetli aglütinasyon sperm motilite ve konsantrasyon değerlendirmesini etkileyebilir.

### **Sperm sayımı**

“Total sperm sayısı” ve “sperm konsantrasyonu” terimleri aynı değildir. Sperm konsantrasyonu her bir ünite semen volümü başına düşen sperm sayısını ifade ederken total sperm sayısı tüm ejakülattaki sperm sayısını ifade eder. Total sperm sayısı semen analizi sırasında hesaplanan sperm konsantrasyonundan elde edilir (Slama et al., 2002). Ejakülattaki total sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu dölleme yeteneği, gebelik oluşumuna kadar geçen süre ve gebelik oranları ile ilişkilidir. Normal bir erkekte obstrüksiyon yoksa ve cinsel perhiz süresi çok uzun değilse total sperm sayısı testis volümü ile doğru orantılıdır ve bu da testislerin sperm üretme yeteneğini ve yolun sağlığını gösterir. ( MacLeod and Wang, 1979) Seminal vezikül ve prostat salgılarının miktarından etkilenebilen sperm konsantrasyonu ise fertilizasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir ancak testis fonksiyonunu değerlendirmek için özgün değildir (Eliasson, 1975). Örnekte mikroskopla hiç sperm görülmediyse yeni bir taze preparat hazırlanır. Yine sperm görülmezse azospermiden şüphelenilebilir. Örnek 3000 g'de 15 dakika santrifüj edilir ve sperm hücresi tespit edilirse kriptozoospermi, görülmezse azospermi denir.

## **Sperm motilitesi**

Fertilizasyonda sperm sayısı kadar motilite de önemli parametrelerden biridir. Sperm motilitesi kuyruğun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğüne, enerji üreten sistemin yeterliliğine, ısı ve süre gibi faktörlere bağlıdır. Motilite değerlendirilmesi ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde, tercihen likefaksiyondan sonraki 30 dakikada içerisinde değerlendirilmelidir. Taze hazırlanmış preparatların stabil hale gelmesi için yaklaşık bir dakika bekletilir.

Motilite değerlendirmesi faz kontrast mikroskopta 200-400 büyütmede yapılır. Sperm motilitesi 37°C'de ısıtılmış tabla üzerinde veya oda sıcaklığında bakılabilir. Farklı motilite kategorilerindeki spermelerin oranlarını hesaplayabilmek için en az beş mikroskopik alanda en az 200 sperm hücrelerinin değerlendirilmesi gerekir. Aynı semen örneğinden hazırlanmış başka bir preparatta tekrar 200 sperm sayılıp birbirinden bağımsız bir şekilde motilite yüzdeleri kıyaslandığında kabul edilebilir farklılık oranları varsa işleme devam edilir. Büyük farklar varsa bu durumda yeni preparat hazırlamak gerekir. Fokal bir mikroskop düzleminde gratikülle belirlenmiş çizgilerin sınırladığı alanda ya da sperm sayısı azsa tüm alanda sperm hücreleri sayılarak motilite değerlendirilir. Motilitenin değerlendirmesi için spermeleri progresif hareketli, non-progresif hareketli ve hareketsiz şeklinde sınıflandıran basit bir yöntem tavsiye edilir (Günalp, 2002).

Progressif hareket: Sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket eder.

Non-progresif hareket: İlerleyici olmayan hareketlerin tamamını içerir. Örneğin çok küçük daireler şeklinde, kuyruğun hareketiyle baş kısmının çok zor olarak yer değiştirmesi, sadece kuyruğun hareket etmesi gibi.

Hareketsiz: Hiç hareketin olmaması.

## **Sperm morfolojisi**

Semen analizindeki bir diğer kriter ise spermin yapısal özelliklerinin incelemesine dayanan morfolojik sınıflandırmadır. Değerlendirmede birçok kriter kullanılmasına karşın en fazla kullanılanlar Dünya Sağlık Örgütü (WHO) laboratory manual kriterleri ve Kruger'in kesin kriterleridir. Sperm morfolojisi değerlendirmesi,

semende elektron mikroskop ile veya faz kontrast mikroskop ile spermleri çeşitli yöntemlerle boyayarak yapılabilir (Delilbaşı, 2008). Boyama yöntemi olarak Papanicolaou, Shorr ve Diff-Quick boyama yöntemleri tavsiye edilen yöntemlerdir. Boyalı preparatlar x100 büyütme objektif kullanılarak immersiyon yağı yardımıyla incelenir (Gökçe, 2011).

### **Sperm canlılığı**

Sperm canlılığı hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranının %40'dan az olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Aynı zamanda bu testle hareketlilik değerlendirmesinin doğru yapılıp yapılmadığı da kontrol edilebilir. Canlı olmayan hücrelerin sayısı hareketsiz olan spermlerin sayısını aşmamalıdır. Normalde canlı hücrelerin sayısı motil hücrelerden fazladır. Canlı spermlerin oranı boya eksklüzyonu ya da hipoozmotik şişme yöntemleri ile hücre zarı sağlam olanların değerlendirilmesi ile hesaplanabilir. Boya eksklüzyonu metodu ölü hücrelerde hasarlanan plazma zarının bazı boyaları alması prensibine dayanır. Bu yöntem eosin nigrosin veya sadece eosin boyaları kullanılarak yapılabilir. Hipoozmotik şişme ise sadece sağlam membranı olan hücrelerin hipotonik solüsyonlarda şişmesi prensibine dayanır. Isı değişikliği ve dehidratasyonun sperm canlılığı üzerine olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla likefaksiyondan sonraki 30 dakikada ya da ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde canlılık değerlendirilmelidir. Hareketsiz spermlerin canlı olup olmadıkları klinik açıdan önemlidir. Canlılık değerlendirmesinin sonuçları aynı semen örneğinin hareketlilik sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmelidir. Canlı ama hareketsiz hücrelerin büyük oranda bulunması kuyruktaki yapısal defektlerin göstergesi olabilir. (Chemes and Rawe, 2003) Hem hareketsiz hem de ölü hücrelerin (nekrozoospermi) yüksek oranda bulunması ise epididimal bir patolojinin göstergesi olabilir. (Correa-Perez et al., 2004)

### **4.2. Reaktif Oksijen Türleri**

Serbest radikaller dış orbitalinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır (Bast et al.,



1991; Halliwell ve Gutteridge, 1985; Nawar, 1996). Reaktif oksijen türleri (ROS), yüksek derecede reaktif oksijenlenmiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır (Aitken and Clarkson, 1988). Organizmada geçiş metallerini ( $Fe^{2+}$  ve  $Cu^+$  gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi ile oksidasyon reaksiyonları meydana gelmektedir (Halliwell and Gutteridge, 1999). Sonuç olarak, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksijenden reaktif oksijen ara ürünlerinin meydana gelmesine yol açmaktadır. İleri derecede reaktif türler ve doymamış yağlarda, proteinler ve DNA'da ciddi kimyasal değişikliklere neden olurlar. ROS'lar reperfüzyon hasarı, kanser, inflamatuvar hastalıklar ve yaşlanma gibi çok sayıda patolojiden sorumlu tutulmuşlardır (Lenzi et al., 1998). Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ( $O_2\bullet$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH\bullet$ )'dir. Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ( $R\bullet$ ), peroksit radikalleri ( $ROO\bullet$ ), alkoksi radikalleri ( $RO\bullet$ ), tiyil radikalleri ( $RS\bullet$ ), sülfenil radikalleri ( $RSO\bullet$ ), tiyil peroksit radikalleri ( $RSO_2\bullet$ ) gibi çeşitli serbest radikaller oluştururlar.

#### **4.2.1. ROS'un hücresel substratları**

Lipitler; Hücre içi organellerin membranlarında bulunan lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve poliansatüre (doymamış) yağ asitleri (PUFA) serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer, lipit peroksidasyonu oluşturur (Baker and Aitken, 2005). Lipit peroksidasyonu hücre membranının, akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak hücre membranına zarar verebilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir.

Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna neden olur. Böylece plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesi sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipit peroksidasyonu" denir (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Proteinler; serbest radikallere karşı doymamış yağ asitlerine kıyasla daha az hassastırlar. Serbest radikaller proteinleri doğrudan etkilerken, proteinlerin etkilenme derecesini amino asit içerikleri belirler. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (Devasagayam et al., 2003).

Serbest radikaller, yapısal proteinlerin fonksiyonunu ve enzim aktivitesini engelleyerek birçok proteinin hasarına neden olabilir. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu protein oksidasyonu neticesinde, protein hidroperoksitler gibi kararlı ve yüksek derecede reaktif ürünler meydana gelir. Bu ürünler ile geçiş metal iyonlarının etkileşimi sonucunda da radikaller oluşabilir. Bununla beraber oksitlenmiş proteinlerin birçoğu, fonksiyonel olarak doğada inaktiftir ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Fakat zaman ile kademeli olarak bir miktar birikebilir. Böylece çeşitli hastalıkların yanı sıra yaşlılık ile ilişkili hasarlara da sebep olur (Devasagayam et al., 2004; Sarma et al., 2010).

Karbohidratlar; Hidroksil gibi serbest radikaller, karbonhidratlar ile reaksiyona girer ve karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomu çıkararak karbon merkezli radikal üretirler. Bunlar hyaluronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına yol açar (Devasagayam et al., 2004)

Nükleik Asitler ve DNA; iyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH•) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşır. Sonunda DNA kalıcı "oksidatif hasara" uğrar.

#### **4.2.2. Antioksidanlar**

ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidan savunma mekanizmaları hem intraselüler (superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, peroksidaz, ferritin) hem de ekstraselülerdir (transferrin, laktoferrin, seroloptazmin, haemopexin, haptoglobin ve

albumin). Antioksidan sistemde enzimatik (süperoksitdismutaz: SOD, Glutasyon peroksidaz / Glutasyon reduktaz: GPX / GRD, Katalaz: CAT) ve enzimatik olmayan (Askorbat, Ürat, Vitamin E, Pirüvat, Taurin, Hipotaurin) antioksidanlar mevcuttur. Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: Süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-GPx), glutasyon S-transferazlar (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: Glutasyon, ferritin, hemoglobin, seruloplazmin, bilirubin, transferrin, sistein, laktoferrin, ürat, miyogloblin, metiyonin, albümin, melatonin

Eksojen antioksidanlar şunlardır:  $\beta$ -karoten, E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol), C vitamini (askorbik asit), folik asit, mannitol, albümin, ksantin oksidaz, barbitüratlar (Halliwell and Gutteridge, 1999)

#### **4.2.3. İnsan semeninde ROS'un kaynağı**

Semende ROS kaynağı lökositler ve spermatozoondur.

Lökosit: Lökositler erkek genital sisteminde mevcut olan enfeksiyon için bir gösterge olarak kabul edilir.

Düşük miktarda lökosit hem normal hem de infertil erkeklerin semenlerinde bulunabilir. Bütün infertil erkeklerin %10-20'sinde bulunur. Lökositlerin %60-70'ini polimorf nükleuslu nötrofiller oluşturur. Mikroorganizmalara karşı mücadele verirken ortama süperoksit anyonu salarlar ki bu da diğer ROS ve iyonlarla reaksiyona girerek ya da dismutasyon ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH\bullet$ ) veya hipoklorid gibi diğer toksik maddelerin oluşmasına neden olur (Halliwell and Gutteridge, 1999). Enfeksiyon ya da kronik enfeksiyonun mevcudiyeti durumunda lökosit, spermatozoona göre 1000 kat daha fazla ROS üretebilir (Plante et al., 1994). Bu dozdaki ROS antioksidan savunma sistemini devre dışı bırakabilir. Serbest oksijen radikallerinin üretimi lökositospermik (semen lökosit kontaminasyonu) örneklerde anlamlı olarak daha fazladır. Eğer semende lökosit konsantrasyonu 3 milyon/ml'yi geçerse fertilizasyonda anlamlı bozulma gözlenir (WHO, 2010)

Spermatozoon: ROS'un ikinci kaynağı spermatozoonun kendisidir. Somatik hücreler gibi insan spermatozoonu da, mitokondrideki elektron transport zincirinin

yan ürünü olarak ROS üretir (Aitken and Clarkson, 1987). Normal fizyolojik sınırlar içerisinde kalmakla birlikte ROS, üreme sistemi için gereklidir (Aitken et al., 1995). Spermatozoon kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve sperm oosit füzyonu sırasında faydalanılmak üzere az miktarda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit spermatozoa tarafından üretilmektedir (de Lamirande and Gagnon, 1993).

Spermatozoon  $H_2O_2$ 'nin düşük konsantrasyonuyla inkübe edildiğinde, sperm kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyon yeteneği kazanması ile fertilizasyon yeteneğinin stimüle edilebildiği gösterilmiştir (Aitken and Krausz, 2001). Epididimisteki henüz maturasyonunu tamamlamamış olan spermatozoon, erken evre spermatositler ve yuvarlak ve uzamış spermatidlerden daha fazla ROS üretir (Aitken and Krausz, 2001). Matürasyonu tamamlanamayan spermatozoon spermiyogenezin son evresinde fazla sitoplazma artığını atamaz. Sonuçta spermatozoon normalden daha fazla ROS üretir ve oksidatif stres belirtilerine sebep olur.

#### **4.2.4. Oksidatif stres ve erkek infertilitesi**

Spermatozoonun plazma membranı yüksek oranda doymamış yağ asitleri, sitoplazması da düşük oranda antioksidan sistem enzimleri içerdiğinden ROS'un etkilerine karşı normal hücrelerden daha hassastır (Sikka, 2004). Normal koşullarda serbest oksijen radikallerinin üretimi ve antioksidan sistem arasında bir denge vardır (Sikka et al., 1995).

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), nitrik oksit (NO), peroksinitrit gibi ROS'un, spermatozoada fazla miktarda bulunmasının, erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Pasqualotto et al., 2001). Yapılan araştırmada infertil erkeklerin semen örnekleri değerlendirildiğinde %25-40'ında yüksek ROS tespit edilmiştir (de Lamirande and Gagnon, 1995). Bunun da spermatozoon morfoloji ve motilitesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Moein and Dehghani, 2007) Oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, 1943'te John MacLeod'un yüksek oksijen konsantrasyonunda inkübe edilen insan spermatozoonların hareketliliğinin çok hızlı bir şekilde düşüş göstermesi ve katalazın kültür ortamına ilave edilmesi ile de arttığını göstermesinden beri bilinmektedir (Aitken and Krausz, 2001). Erkek faktörlü infertilitede, oksidatif stres süresince temel değişiklikler sonucunda

spermatozoon DNA'sında bütünlük hasarı, kromatin çapraz bağlanmaları ve DNA fragmentasyonu oluşur. (Agarwal and Said, 2003). Spermatozoonda ROS toksisite mekanizması lipid peroksidasyonu ile başlar. Lipid peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerince zengin membranın bütünlüğüne ve akışkanlığını bozarak yapı ve işlevinin bozulmasına sebep olur (Allamaneni, 2005). Spermatozoonda ROS'un etkisinin ilk göstergesi flagellar salınım sıklığında progressif bir azalma olmasıdır ve motilitenin azalmasıyla sonuçlanır. Bu etki hücre içi Adenozin Trifosfat (ATP) konsantrasyonunun düşmesine bağlıdır ve aksonem proteinlerinin cAMP-protein kinaz A-bağımlı yolla fosforilasyonunda bozulmaya yol açan bir takım olaylar zinciri tarafından tetiklenir.

#### **4.2.5. Spermatozoon antioksidan sistemi**

Seminal plazma ve spermatozoa, oksidatif strese karşı oldukça etkin bir dizi koruyucu antioksidan mekanizmaya sahiptirler. Seminal plazma; superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi bir takım yüksek molekül ağırlıklı enzimatik antioksidan içerirler. Bu enzimlerdeki eksikliğin sperm DNA hasarına ve erkek infertilitesine neden olduğu gösterilmiştir (Lewis et al., 1995). Seminal sıvı aynı zamanda askorbik asid, alfa tokoferol, piruvat, glutatyon, L- karnitin, taurin ve hipotaurin gibi seminal antioksidan kapasitenin büyük kısmını oluşturan enzimatik olmayan antioksidanları içerir. Bunun yanı sıra; seminal plazmanın değişik oranlarda oksidatif strese karşı etkili olduğu öne sürülen ürat, piruvat, albumin, melatonin, beta-karoten ve ubiquinol içerdiği gösterilmiştir. Ayrıca, prostaglandin D2 sentaz gibi lipokalinlerin, lipid peroksidaz ürünlerini ayırarak oksidatif hasara karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir (Zini et al., 2009).

#### **4.2.6. Yardımlı üreme teknikleri (YÜT) ve ROS**

Yardımlı üreme tekniklerinde *in vitro* spermatozoon hazırlama işlemleri, immatur ve anormal spermatozoon ve lökosit kontaminasyonu yüksek ROS üretimine neden olmaktadır. İlk kez Aitken tarafından *in vitro* ortamda spermatozoon hazırlanması yardımlı üreme teknikleri sırasında kemulimünisans metot kullanılarak

ROS üretimini arttığı bildirildi (Mortimer, 2000). Seminal plazma spermatozoonu oksidatif stresten koruyacak önemli miktarda antioksidan güce sahip olduğundan, spermatozoon seminal plazma içerisinde kaldığı sürece, lökositosperminin yaratacağı oksidatif stresten bir dereceye kadar korunabilecektir. Ejakulat yıkanması durumunda, seminal plazma uzaklaştırılmış olacağı için oksidatif stres etkin hale geçer ve spermatozoon fonksiyonları da bozulmaya baslar (Aitken and Clarkson, 1988). Yardımlı Üreme Teknikleri laboratuvarında spermatozoon hazırlığı için çeşitli medyumlar (tampon solüsyonları) ve santrifüj kullanılmaktadır. YÜT laboratuvarındaki başlıca ROS kaynakları aşağıdaki gibidir.

Oksijen konsantrasyonu: Var olan herhangi bir aerobik çevre enzim aktivitesini ve ROS salınımını arttırabilir. Daha önce de bildirildiği gibi *in vivoda* erken embriyo gelişimi düşük oksijen gerilimli mikroçevrede gerçekleşir. Bu düşük oksijenli ortamın YÜT uygulamalarında da taklit edilmesi gebelik sonuçlarının iyileştirilmesine yardımcı olur. Daha önceki çalışmalarda da bildirildiği gibi, atmosferik oksijen konsantrasyonundaki embriyo kültürlerinde, düşük oksijen konsantrasyonundaki embriyo kültürlerine göre daha fazla DNA fragmentasyonu gelişmektedir. Bir başka prospektif randomize çalışmada, Kasterstein 258 hastaya ait oositleri iki gruba bölerek, bu gruplarda %5 ve %20 oksijen konsantrasyonundaki embriyo gelişimini ve klinik sonuçları gözlemlemiştir. Elde edilen sonuçlara göre %5'lik oksijen konsantrasyonunda, %20'lik konsantrasyona göre 3. gündeki iyi kaliteli embriyo sayısı, implantasyon oranı, klinik gebelik oranı ve canlı doğum oranından istatistiksel olarak anlamlı artış bildirilmiştir.

Işık : YÜT prosedürleri esnasında görülebilir ışık, ROS salınımını tetikleyip, endojen ROS kaynağı gibi işlev görebilir. Oositlerin ve embriyoların görünür ışığa maruziyetinin minimuma indirilmesi, daha iyi gebelik sonuçlarının alınmasında yardımcı olabilir. Daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olmakla birlikte, hayvanlarla yapılan çalışmalar göstermiştir ki, kısa dalgalı görünüş ışığının az miktarının koruyucu etkisi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada hamster ve fare zigotları gün ışığı, soğuk floresan ve sıcak floresan ışığa maruz bırakılarak ROS seviyeleri ölçülmüş ve gün ışığına maruz kalan zigotlarda ROS 'un en yüksek seviyede olduğunu gözlemlenmiştir (Takenaka, 2007). Yine bu çalışmadaki zigotların transfer edildikten sonraki gelişimleri takip edildiğinde ışığa maruz bırakılmayan kontrol grubundaki zigotların en iyi gelişimi gösterdiği bildirilmiştir.

Grotti'nin (2001) yaptığı çalışmada ise, görünür ışığın etkilerini ve oksidatif strese sebep olarak hücre membranlarında doymamış yağ asitleri ve kolesterol moleküllerine hasar verdiğini bildirmiştir.

Kültür ortamı: İnsan oosit ve embriyolarının kültüründe kullanılan mediumun içerikleri, embriyo kalitesi ve ART başarısı üzerinde direkt olarak etkilidir. Kültür ortamında  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  gibi metalik iyonların varlığı, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları ile hidroksil radikallerinin üretimine sebep olur ROS miktarını arttırabilir. Bedaiwy et al., (2004) belirttiğine göre kültür mediumundaki ROS seviyesinin artışı kötü embriyo gelişimi, fertilizasyonda düşüş, hücre bölünmesinin azalması ve fragmentasyonun artışı ile doğru orantılıdır.

pH ve ısı: pH değişimi protein sentezi, mitokondriyal fonksiyon ve hücrel metabolizma gibi hücrel faaliyetleri doğrudan etkiler. Kültür ortamındaki pH değişimi sperm motilitesini, oosit maturasyonunu ve embriyo gelişimini olumsuz yönde etkiler. İnkübatör sıcaklığı ise insan vücut sıcaklığını taklit etmesi gereken önemli bir değişkendir. Artan sıcaklık pH seviyesini düşürüp ROS indüklü hücrel hasara sebep olabilir.

Santrifüj: Santrifüjleme, sperm hazırlama esnasında seminal plazma ve ölü hücreler, debris, immatur spermatozoa gibi potansiyel ROS kaynaklarını uzaklaştırmak için uygulanan rutin bir işlemdir. Bununla birlikte santrifüjleme kendisi ROS'un ortaya çıkmasına sebep olabilir. Santrifüj süresi ile ROS üretimi arasında direk bir bağlantı vardır. Uzun süreli santrifüjleme yüksek sıcaklıklara sebep olarak sperm parametreleri üzerinde negatif etkiye sahip olabilir. Woren ve arkadaşları 1987'de yaptıkları çalışmalarında tekrarlanan santrifüj nedeniyle spermatozoon yıkanması sırasında ROS seviyesinin 20-50 kat artabildiğini ve spermatozoon fonksiyonları üzerine zararlı etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Spermatozoonun hazırlanması sırasında seminal plazmanın atılımı burada bulunan antioksidanları da uzaklaştırdığından ROS'un zarar vermeye devam etmesine neden olabilmektedir (Tarin et al., 1998).

Kriyoprezervasyon: Kriyoprezervasyon, gamet, embriyo, over ve testiküler dokuların 0 °C'nin altındaki sıcaklıklara düşürülmesini sağlayan protokolleri içerir. Kriyoprotektanların ve optimize edilmiş protokollerin kullanılmasına rağmen, vitrifikasyon ve çözme gibi işlemler spermin yapısını ve bütünlüğünü bozmasına sebebiyet verecek kadar strese maruz bırakabilir. Kriyoprezervasyon lipid

peroksidasyonunun bir sonucu olarak membran hasarına, DNA fragmentasyonuna, motilite ve vitalitede azalmaya sebep olabilir.

### 4.3. Medikal Bitkiler

Son yıllarda erkek kaynaklı infertilitenin tedavisinde tıbbi tedavilerin yan sıra alternatif tedavi yöntemleri de uygulanmaya başlanmıştır. Zini ve ark.'nın (2004) yaptığı çalışmada infertil erkeklerde alternatif tıp uygulamalarının kullanım prevalansı %30 olarak belirtilmiştir. İnfertil çiftlere yardımcı olmak amacıyla tedavi öncesi ve tedavi sürecinde bu uygulamalar önerilebilmektedir. Bu uygulamalar infertilite tedavisinde yeni kullanılmaya başlandığı için daha fazla çalışmaya ve araştırmaya gereksinim duyulmaktadır (Royner ve ark., 2009). Bahsedilen bu alternatif tedavi yöntemlerine, homeopati, akupunktur, diyet, psikoterapi ve bitkisel kaynaklı ilaçlar örnek verilebilir (Clark ve ark., 2013)

Bitkisel tedavilerin kullanımı, hem daha az invaziv olmaları hem de düşük maliyetli olmaları sebebiyle uzun yıllardır insanlar arasında yaygındır. Birçok farklı bitki çeşidinin erkek üreme sistemini koruyucu ya da iyileştirici etkisi bulunmaktadır. Bu bitkilerin etkilerini ve etki mekanizmalarını anlayabilmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır.

*Camelia sinensis* (çay) terapötik özellikleri sebebiyle insanlar tarafından kullanımı oldukça yaygındır. Daha önce yapılan çalışmalarda yeşil çay ve siyah çayın içerdikleri polifenol ve flavanoidler sebebiyle yüksek antioksidan, antitoksik ve antikarsinojenik özellik gösterdikleri bildirilmiştir ( Figueiroa et al., 2009)

Farelerde yapılmış olan bir çalışmada, yeşil çayın oral yoldan, 28 günlük uygulamasının, ısı kaynaklı oksidatif stresin etkilerini tersine çevirerek, spermatozoa konsantrasyonunu ve motilitesini arttırdığı belirtilmiştir (Abshenas et al., 2012) .

Başka bir çalışmada ise yeşil çayın süperoksit dismutaz enziminin aktivitesini arttırarak, lipit peroksidasyonunu engellediği rapor edilmiştir (Awoniyi et al., 2011).

Yüksek oranda tanin, flavanoid ve karoten içerdiği bilinen *Daucus carota* (havuç) üzerinde yapılan çalışmalarda, testosteron seviyesinin, spermatogenik



aktivitenin (Nouri et al., 2009) ve cauda epididimisteki sperm rezervinin (Yu et al., 2005) arttığı belirtilmiştir.

Antioksidan özelliği daha önceden aydınlatılmış olan (Nassiri et al., 2009) *Zingiber officinale* (zencefil) ile yapılan çalışmalara bakıldığında Amin ve Hamza (2006) zencefilin erkek farelerde testiküler antioksidan enzimlerin aktivitesini ve sperm motilitesini arttırdığını rapor etmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise 28 gün boyunca günde 1000 mg/kg dozunda zencefil alan farelerde, 14. günden sonra epididimal sperm konsantrasyonunun ve motilitenin anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir (Morakinyo et al., 2008).

*Cinnamomum zeylanicum*'un (Seylan tarçını) farelerin üreme sistemi üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, diyetlerinde tarçın ekstraktı alan farelerde, testis ağırlığının arttığı, sperm konsantrasyonu ve motilitesinin yükseldiği rapor edilmiştir (Shah et al., 1998)

Shalaby ve Mouneir'in (2010) yaptıkları çalışmada ise, 65 gün boyunca günlük 500 mg/kg tarçın ekstraktı alan diyabetik farelerde, insülin ve testosteron seviyesiyle birlikte testis ağırlığının da arttığı ve semen parametrelerinin iyileştiği bildirilmiştir.

*Trigonella foenum-graecum* (çörek otu) tohumuyla yapılan çalışmada, oral yoldan alınan çörek otunun, lipid peroksidasyonu baskılayarak oksidatif stresi azalttığı ve SOD ve CAT aktivitelerini arttırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise çörek otunun negatif etkisi olduğu bildirilmiştir. 3 ay boyunca diyetlerinde çörek otu ekstraktı alan tavşanlarda testis ağırlığının ve sperm konsantrasyonunun %43 oranında azaldığı gözlenmiştir. Bu da çörek otu tohumlarının testiküler doku üzerindeki toksik etkisine işaret etmektedir.

*Linum usitatissimum* (keten), linoelik asit ve n-3 yağ asitlerinden zengin bir bitkidir. Collins et al. (2003) yapmış oldukları çalışmada beslenmelerine %5 oranında keten tohumu dahil edilen farelerde prostat loblarının ağırlığının azaldığı gözlenmiştir. %10 oranında dahil edildiğinde ise serum testosteron ve östradiol seviyesinin yükseldiği, seminal vezikül ve testis ağırlıklarının arttığı bildirilmiştir. Sprando et al. (2009) yaptıkları çalışmada ise beslenmelerine keten tohumu eklenen fareler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında seminifer tübüllerde herhangi bir artış

olmadığı, dolayısıyla spermatogenez ve testis üzerinde herhangi bir iyileştirici etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir.

*Panax ginseng* insanlar tarafından en çok tüketilen medikal bitkilerin başında gelmektedir. Ginseng kökleri, ginsenosit, poliasetilen, polifenolik bileşenler ve asidik polisakkaritler yönünden oldukça zengindir. Ginseng'in kromozomal anomaliler ve sperm anomalilerinde anlamlı bir azalmaya, testosteron seviyesi, sperm konsantasyonu ve motilitesinde ise anlamlı artışa yol açtığı bildirilmiştir (Kumar et al., 2003).

Hwang et al. (2004) 2,3,7,8- tetraklorodibenzodiyoksine maruz kalan ginepiglerde ginsengin spermatogenezini düzenlediği ve sperm kalitesini arttırdığını belirtmiştir.

Bir başka çalışmada ise gama radyasyonuna maruz bırakılmadan önce ginseng ile tedavi edilen farelerde germ hücre popülasyonunun korunduğu rapor edilmiştir (Kumar et al., 2003). Başka bir çalışmada ise vahşi ginsengin kök kültürüyle tedavi edilen erkek farelerde testis ve epididimisteki sperm konsantrasyonunun artış gösterdiği bildirilmiştir (Park et al., 2006).

*Petroselinum crispum* (maydanoz), yiyecek, ilaç, parfüm ve kozmetik endüstrisinde sıkça kullanılan bir bitkidir. Antianemik, antimikrobiyal, antikoagulator özellikler göstermekle birlikte içerdiği flavanoidlere bağlı olarak antioksidan özelliği de mevcuttur. Hassan et al. (2006) yaptıkları çalışmada *P. crispum* yağı ile tedavi edilen farelerde glutatyon redüktaz ve SOD aktivitesinin arttığı bildirilmiştir.

*Lepidium meyenii*, *in vitro* ve *in vivo* da etkisi araştırılmış bitkilerden biridir (Rubio et al., 2006). Gonzales et al. (2004) yaptıkları çalışmada *L. meyenii*'nin fertil erkeklerde serum testosteron, FSH ve LH seviyesini değiştirmedeğini bununla birlikte sperm konsantrasyon ve motilitesini arttırdığını göstermişlerdir. *L. meyenii*'nin 1.5 ve 3.0 gramlık dozlarının kullanımının testosteron üretimini etkilemeden cinsel gücü arttırdığı da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Gonzales et al., 2001) *Cucurbita pepo* L. (kabak) tohumları ve tohumunun yağı başta yüksek oranda protein olma üzere çok sayıda makro ve mikro bileşenle içerir (Abd El-Ghany et al., 2010). Erkek üreme sistemi için gerekli olan selenyum, kalsiyum, manganez, fosfor, potasyum ve çinko gibi minerallerce de zengindir (Abd El-Ghany et al., 2010). Kabak tohumları testosteron seviyesini arttırarak cinsel isteği ve sperm

kalitesini arttırır ( Banks et al., 2004). Oyeyem et al. (2008) yaptıkları çalışmada, kabak çekirdeğinin anormal yapıdaki sperm sayısını anlamlı ölçüde azaldığı gözlenmiştir.

*Allium cepa* (soğan) androjenik sistem üzerinde antioksidatif etkileri olan ve spermatogenesisi iyileştiren bir bitkidir (Khaki et al., 2008) Soğanın bileşiminde fitokimyasallar ve vitamin, flavanoid ve sülfür elementleri gibi serbest radikallere karşı etkileri olan mikro bileşenler içerir (Khaki et al., 2011). Ola-Mudathir et al. (2008) yaptıkları çalışmada kadmiyuma maruz kalan farelerde soğan ekstraktının lipit peroksidasyonunun seviyesini düşürüp, SOD ve CAT enzimlerinin aktivitesini arttırmıştır. Bunun yanı sıra testis yapısının ve sperm kalitesinin korunduğu gözlenmiştir.

Khaki et al. (2011) ise 20 gün boyunca soğan suyu içen erkeklerde sperm konsantrasyonu, vitalitesi ve motilitesinin anlamlı artış gösterdiği bildirilmiştir.

*Apium graveolens* (kereviz) medikal özellikleri sebebi ile oldukça sık kullanılan bir bitkidir. Fotokimyasal yapısı araştırıldığında, limonen gibi terpenler ve apigenin gibi flavanoitler içerdiği ortaya çıkmıştır (Sultana et al., 2005). Yapılan bir çalışmada sodyum valproatın toksik etkisine maruz kalan albino erkek farelerde, *Apium graveolens* ekstraktı tedavisiyle üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerin anlamlı şekilde düştüğü ve sperm konsantrasyonu ile motilitesinin iyileştiği gözlemlenmiştir (Hamza and Amin, 2007).

*Tribulus terrestris* (demir dikenli), bileşenlerinde steroid, saponin, flavanoid, alkaloid, doymamış yağ asitleri, vitamin, tannin, resin, aspartik asit ve glutamik asit içeren çiçekli bir bitkidir (Karimi et al., 2012). Daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki 50 mg/kg dozundaki *Tribulus terrestris* serbest testosteron oranını anlamlı şekilde arttırmaktadır ( El Tantawy et al., 2007).

Emzirme dönemindeki koyunlar ile yapılan çalışmada, 4 gün boyunca günde 1.5 gr *T. terrestris* ekstraktı alan koyunlarda spermatogenez aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Karimi et al., 2012). Bitkinin içerdiği saponinlerden biri olan furostanolun farelerde spermatogenezini düzenlediği ve sperm parametrelerinin kalitesini arttırdığı bildirilmiştir (Gauthaman and Ganesan, 2008). İnsanda uygulanan *T. terrestris* tedavisi de sperm konsantrasyonunu %160'a kadar farklı yüzdelerde arttırmıştır (Bashir et al., 2009)

Çörek otu olarak bilinen *Nigella sativa*, özellikle Orta Doğu ülkelerinde tedavi amacıyla sıklıkla kullanılan bir bitkidir. *N. sativa* tohumlarının, erkek albino farelerde, üreme oranlarının ağırlığını, olgun Leydig hücrelerinin sayılarını, androjen seviyesini ve epididimisteki spermelerin motilitelerini arttırdığı bildirilmiştir (Mohammed et al., 2009). Bashandy (2007) yaptığı çalışmada hiperlipidemik farelerin diyetlerine *N. sativa* ekstraktı eklenmesi sonrasında, testosteron seviyesiyle birlikte sperm motilitesi ve kalitesinin de arttığı gözlenmiştir.

*Crocus sativus* (safran) alternatif tıpta, özellikle cinsel gücü arttırdığına inanılması sebebiyle sıklıkla kullanılmaktadır (Abdullaev et al., 2003). Modaresi et al. (2008), 20 gün boyunca 100 mg/kg dozunda *C. sativus* alan farelerde FSH, LH ve serum testosteron seviyesinin arttırdığını bildirmiştir.

Bir başka çalışmada günde 200 mg/kg safran tüketildiğinde, testis dokusu ve spermatogenez üzerinde inhibe edici etkisi olduğu gözlenmişken (Modaresi et al., 2008), daha düşük dozlarının ise (50-100 mg/kg) spermatogenez ve testis dokusu üzerinde pozitif etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Khayatnur et al., 2011).

Kök yumruları sahlep olarak bilinen *Dactylorhiza maculata*, glukoz, mannan, nitrojenik bileşikler, protein, ferulik asit, kuersetin ve steroid gibi bileşenler içerir. *D. maculata*'nin kök ekstraktının, ejakulasyonu, reproduktif organların ağırlığını, testosteron seviyesini, semen früktoz miktarını ve sperm konsantrasyonunu artırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Thakur et al., 2011).

Kökün sulu çözeltisinin, farelerde testosteron ve LH seviyesini arttırarak, Leydig hücrelerinin çoğalmasını ve spermatogenezi düzenlemiştir (Kashani et al., 2012)

Isırgan olarak bilinen *Urtica dioica*, İran, Yunanistan ve Türkiye gibi birçok ülkede yetişen bir bitkidir (Golalipour et al., 2011). Mavi ve ark. (2004) bildirdiğine göre, ısırgan yüksek oranda antioksidan özellik gösteren fenolik bileşenler içerir. Golalipour et al. (2011) yaptıkları çalışmaya göre, ısırganın hidroalkolik ekstraktından günde 100 mg/kg alan diyabetik farelerde, seminifer tübül çaplarının ve seminifer tübül aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte bir başka çalışmada ise diyabetik farelere, ısırganın hidroalkolik ekstraktının günlük 100 mg/kg olacak şekilde peritoneal enjeksiyonu yapılmış fakat farelerin üreme sistemi üzerinde hiçbir etkinin gözlenmediği bildirilmiştir ( Ghafari et al., 2011).

Çalışmamız için Türkiye’de halk arasında yaygın olarak kullanımı bulunan, yüksek antioksidan içeriği olan ve daha önce sperm fonksiyonları üzerindeki *in vitro* etkilerine dair çalışma yapılmamış olması sebebiyle *Salvia officinalis* L., *Sesamum indicum* L. ve *Vaccinium myrtillus* L. seçilmiştir.

#### 4.3.1. Adaçayı (tıbbi)

*Salvia officinalis* L. Türkiye’de ‘tıbbi adaçayı’ olarak bilinen, Orta ve Güneybatı Avrupa’da dağ yamaçlarında kendiliğinden yetişen ve yetiştirilen, ülkemizde ise yerli olmayan ve ancak süs bitkisi olarak az da olsa yetiştirilen bir türdür. Bitkinin tedavide yaprak, çiçek ve çiçekli dalları kullanılır.

Doğu Akdenizde ve Türkiye’de, Akdeniz ikliminin görüldüğü bölgelerde kendiliğinden yetişen ve yaygın olarak kullanılan ise ‘Anadolu adaçayı’dır (*Salvia fruticosa* Mill.) Bu tür başlıca yaprak ve çiçek özellikleriyle ‘tıbbi adaçayı’ndan ayrılır. Anadolu adaçayı’nın yaprakları ve halk arasında karminatif, antiseptik, tonik ve stimülan etkisinden dolayı dahilen, aromatik yağı (Elma yağı) ise aynı amaçlarla haricen kullanılır. Bitkinin üzerinde görülen ve küçük bir elmayı andıran küremsi mazılar, halk arasında ‘elma’ olarak tanımlanmakta ve bitkiden elde edilen aromatik yağa da bu nedenle ‘elma yağı’ adı verilmektedir.

Tıbbi adaçayı, 50-100 cm yükseklikte, morumsu mavi çiçekli, basit yapraklı, çok yıllık ve çalimsı bir bitkidir. Yaprakları basit (Anadolu adaçayında genellikle 3 (-5) loplu veya parçalı), 3-8 x 1 – 4 cm boyutlarında, kenarları küçük yuvarlak dişli; her iki yüzde de yoğun gümüşü tüylüdür ve genellikle ‘lavanta’ renkli (Anadolu adaçayında pembemsi lavanta) çiçek açar



**Şekil 1.** Çiçek (*Salvia officinalis*), (ClaBen-Beckhoff, 2004)

Tıbbi adaçayı yaprakları başlıca % 1-2 kadar aromatik yağ, tanenler, fenolik asitler, (başlıca rosmarinik ve kafeik asitler), kumarinler, mineraller, vitaminler, fitosteroller içerir. Aromatik yağda ise en fazla  $\alpha$ - ve  $\beta$ -tuyon (% 30-50), sineol (% 15), borneol (% 10) ve kafur (% 7) bulunur.



**Şekil 2.** Yaprak (*Salvia officinalis*), (Hamidpour M., 2014)

Yaprakların antioksidan, antialerjenik, antimutajenik, antikarsinojenik, kardiyoprotektif, vazodilatatör, spazmolitik, antidiyabetik, diüretik, stomaşık, astrenjan, virostatik, antibiyotik ve antienflamatuvar etkisi vardır; sulu veya alkollü ekstresi ağız ve boğaz iltihaplanmalarında, akut ve kronik bronşit tedavisinde kullanılır; ayrıca diş koruyucu bitkisel preparatlarda etkili bileşen olarak yer alır. Aromatik yağı ise aromaterapide, masaj, banyo ve inhalasyon yoluyla değerlendirilir.

Sineol ve tüyondan dolayı merkezi sinir sisteminde kalıcı hasara meydana gelebileceğinden tıbbi adaçayının uzun süreli ve yüksek dozda kullanılmaması önerilir. Anadolu adaçayında ise tüyon miktarı çok az olduğundan dahilen kullanımında bir sorun bulunmaz.

*Salvia officinalis*' in antioksidan bileşiminin belirlenmesi amacıyla yapılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kütle spektrometrisi çalışmalarında karnosol, rosmadial, rosmanol, epirosmanol, metil karnosat, rosmarinik ve karnosik asidin bu bitkide bulunan en önemli antioksidan bileşenler olduğu saptanmıştır. Bileşenlerin etkisinin karşılaştırıldığı daha ileri çalışmalarda ise karnosik asidin etkili antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Cuvelier et al., 1994). Antioksidan aktiviteleri bilinen fenolik bileşiklerin özellikle üç sınıfı *Salvia officinalis*'te aydınlatılmıştır. İlk çalışmalar fenolik diterpenler üzerine yoğunlaşmıştır. Daha sonra yapılan araştırmalar özellikle antioksidan aktiviteleriyle bilinen birçok flavonoid ve fenolik asidin bitkide bulunmasının önemini vurgular niteliktedir. Bu fenolik bileşiklerden başlıcaları; kafeik asit, rosmarinik asit, salvianolik asit, kumarin, sagerinik asit, 6-hidroksiluteolin 7- glukozit ve sagekumarindir (Lu and Foo, 2001).

*Salvia officinalis* üzerine yapılan araştırmalar her geçen gün biyolojik etkileri hakkında daha fazla bilgi elde edebilmemizi sağlamaktadır. Örneğin hayvanlarda streptozotosin ile oluşturulan bir diyabet modelinde sıçanlara *Salvia officinalis* alkol ekstresi uygulanmış ve serum glükoz, trigliserit, kolesterol, üre ve ürik asit seviyelerinin anlamlı derecede düştüğü gözlenmiştir (Eidi and Eidi, 2009). Bundan başka *Salvia officinalis* esansiyel yağlarının antibakteriyel ve antifungal etkilerinin incelendiği bir çalışmada özellikle *E. coli*, *Shigella sonnei* ve *Salmonella typhi* gibi patojen bakterilerin bu esansiyel yağlara oldukça duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (Bozin et al, 2007). Antioksidan, antidiyabetik ve antimikrobiyal aktivitelerinin yanında *Salvia officinalis*' in, kanser hücrelerinde hücre içi nitrik oksit düzenleyicisi olarak işlev yaptığı ve apoptozu uyardığı görülmüştür (Kontogianni et al., 2013). *Salvia officinalis* kullanımının psikolojik etkilerinin incelendiği bir araştırmada insanlarda her gün düşük dozda adaçayı kullanımının kaygı bozukluğunu engellediği, yüksek dozlarda tüketiminin ise sakinlik, uyanıklık ve hoşnutluk sağladığı gösterilmiştir (Kennedy et al., 2006).

### 4.3.2. Susam

Kuzey Afrika'da doğal olarak yetişen ve tohumları kullanılan susam (*Sesamum indicum* L.) tropik ülkelerde doğallaşmış olarak bulunur, aynı zaman da bazı ülkelerde yetiştirilir.

Susam, 30-100 cm yüksekliğinde, dallanmış gövdeli, tek yıllık otsu bir bitkidir. Gövdenin alt tarafındaki yapraklar 4-14 cm uzunluğunda ve karşılıklı, üsttekiler yaklaşık 5 cm uzunluğunda ve almaşık dizilişlidir. Çiçekler 3-5 cm uzunluğunda, beyaz, sarımsı beyaz, mavi veya mor, tüpsü; meyve 2-8 cm uzunluğunda, tüylü, kapsula tipinde, 0.7-3 cm boyunda ve çok tohumludur. Tohumlar ovat ve beyaz, sarımsı, gri, kızılımsı veya siyah renkli; genellikle 3-4 mm uzunluğunda ve 1 mm kalınlığında, yüzeyi parlak veya hafifçe çizgilidir.



**Şekil 3.** Çiçekli gövde (*Sesamum indicum* L.)

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/sesamum-indicum> (03.06.2019)

Susam tohumları başlıca lignanlar ve sabit yağ (% 40-50) taşır. Yağın yapısında doymamış yağ asitlerinden % 35-50 oranında linoleik asit (Omega-6) ve yine aynı oranlarda oleik asit (Omega-9), ayrıca doymuş yağ asitleri de (palmitik ve stearik asitler) vardır. Diğer önemli maddeler ise kuvvetli bir antioksidan olan sesamol ile sesamin, steroller ve E vitamini dir. Susam tohumu (*Semen Sesami*) lignan'larca zengindir.





**Şekil 4.** Genç meyveler (*Sesamum indicum* L.)

<https://www2.palomar.edu/users/warmstrong/ecoph44.htm> (03.06.2019)

Susam Türkiye’de başlıca helva yapımında ve pastacılıkta kullanılır. Tohumlardan sıkılarak elde edilen susam yağı (*Sesami Oleum*), hafif laksatiftir; eczacılık tekniğinde, emülsiyon, liniment ve sabun yapımında kullanılır, ayrıca yemeklik yağ olarak tüketilir, besin değeri yüksektir.

Susam tohumu ve yağında bulunan antioksidanlar, gıda ürünlerini stabilize etme etkisi yanında lipit peroksidasyonunun fizyolojik baskılanmasında da etkin rol oynar. Canlı sistemler kullanılarak yapılan çalışmalarda, lipit peroksidasyonunu baskılamada susamda bulunan fenolik lignanların etkisinin tokoferollere eşdeğer ya da daha yüksek olduğu bulunmuştur. Deney fareleriyle yapılan çalışmada susamda bulunan sesamin doğal bir hiperkolesterolemik ajan gibi davranmıştır (Kochhar, 2000). Kolesterol azalmasının sesaminin eş zamanlı olarak absorpsiyon ve kolesterol sentezini inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sesaminol glikozitlerinin koruyucu etkisi üzerine yapılan bir araştırmada damar sertliğinin azalmasında LDL’nin oksidatif modifikasyonunu inhibe etmesiyle antioksidan özellik gösterdiği belirtilmiştir (Kochhar, 2000). Ayrıca susam tohumu veya yağında bulunan lignanlar’ın (sesamol, sesamin veya sesamolün) tokoferollerle birlikte gama tokoferolün biyolojik yararlılığını arttırdığı bildirilmiştir (Ghafoorunissa et al, 2004).



Şekil 5. Tohumlar (*Sesamum indicum* L.)

<https://www2.palomar.edu/users/warmstrong/ecoph44.htm> (03.06.2019)

#### 4.3.3. Yaban mersini

Yaban mersini (*Vaccinium myrtillus* L.), Orta ve Kuzey Avrupa ile Asya ve Kuzey Amerika'nın dağlık bölgelerinde doğal olarak bulunur. Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nde, 1200 m'nin üstünde yaylarda, ardıç, orman gülü ve çam ağaçlarının altındaki kayalıklarda yetişir, Türkiye'nin yanısıra Arnavutluk, Polonya ve GD Avrupa ülkelerinde de ticari olarak yetiştirilir.

Yaban mersini 50 cm kadar yükseklikte, yeşilimsi-kırmızımsı çiçekli, kışın yapraklarını döken çalimsi bir türdür. Yapraklar 1-3 x 1-2 cm, ince yapılı, yan damarlar belirgin ve ağ şeklinde, kenarları dişlidir. Mayıs-temmuz aylarında açan çiçekler yeşilimsi- pembe-beyazdır. Temmuz-eylül aylarında olgunlaşan kokusuz, koyu mavi-siyah meyveleri ise 6-10 mm çapında olup saplı ve tepesinde kaliks artığı taşır; tadı tatlı-mayhoştur ve 1 mm boyunda çok sayıda oval ve sarımsı tohum taşır, meyvenin etki kısmı da mordur ve tükürüğü morumsu kırmızıya boyar.



**Şekil 6.** Çiçek (*Vaccinium myrtillus* L.) (Latti, 2011)

Başlıca fenolik madde asit (% 1) kafeik, klorojenik); antosiyanin (taze meyvede en az % 0.3, kuru meyvede en az % 0.5 / delphinidin, malvidin, siyanidin), flavonoid (astragalın, hiperozit, izokersetin, kersetin), iridoit, meyve asidi (% 1), mineral (Cr), pektin, şeker (% 30), tanen kuru meyvede % 5-10 (kateşik), triterpen (% 0.25 ursolik asit) ve vitamin içerir.



**Şekil 7.** Meyve (*Vaccinium myrtillus* L.)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124081178000040>

(03.06.2019)

Bitkinin kurutulmuş yaprakları, olgunlaşmış, kurutulmuş meyveleri ve olgunlaşmış taze meyveleri antidiyareik, antiseptik, tonik ve % 5 infüzyonu

antidiyabetik olarak kullanılmaktadır.

Meyvelerdeki antosiyanların retina kanamalarını önleyici olarak diyabetik retinopatide,  $\beta$ -karoten ile birlikte gece körlüğü ve göz yorgunluğunda, E vitaminiyle birlikte glokom ve katarakta kullanılır. Beslenme desteği kapsamında göz ve vazoprotektif olarak kullanılan 500 mg'lık kapsüllerinin yanı sıra tablet ve infüzyonları bulunur. Ayrıca venöz sorunların semptomatik tedavisinde ve ağız boşluğu ve üriner sistem antiseptiği olarak da kullanımı söz konusudur.

*Vaccinium myrtillus*, yüksek antioksidan aktivite göstermekte ve bu aktivite, içinde bulunan antosiyanidin ve fenolik grupların miktarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Kanser, kardio ve serebrovasküler hastalıklar, aterosklerosis ve diyabet gibi bazı kronik hastalıklara karşı koruyucu etkisi yüksek antioksidan kapasitesine bağlanmaktadır (Wu et al., 2002). Birçok üzüksü meyve üzerinde yapılan analizlerin sonuçlarına göre; yaban mersinlerinin belirlenen oksijen radikallerini absorbe etme kapasitesiyle en yüksek antioksidan etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Atalay ve ark., 2003).

Taze meyveler diyareye neden olurken kuru meyvelerden hazırlanan dekoksasyon antidiyareik olarak ve dizanteride kullanılır. Ayrıca antiseptik, antikoagulan, immünostimulan ve kuvvetli antioksidandır.

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1. Gereçler

- Mikropipet (Eppendorf, Almanya)
- Mikropipet ucu (Eppendorf, Almanya)
- Pastör pipeti (Falcon, USA)
- Santrifüj (Thermo Scientific, USA)
- Deney Tüpü (Falcon, USA)
- Lam (Isolab, Almanya)
- Lamel (Isolab, Almanya)
- Steril Örnek Kabı (Fırat Medikal, Türkiye)
- İnkübatör (Heraeus CO 2 , Thermo Scientific, USA)
- Enjektör
- Filtre kağıdı ( 0,18 mm, 82 GSM, ACHEM, USA)
- Parçalayıcı (3 in 1 blender, Model 602.21.001, Isolab, Almanya)
- Havan (Isolab, Almanya)
- Havan eli (Isolab, Almanya)

#### 5.1.1. Kimyasallar

- Tabakalı Sperm Yıkama Solusyonu (SpermGrad, Vitrolife, İsveç)
- Sperm Yıkama Solusyonu (GIVF, Vitrolife, İsveç)
- Ham's F-10, (Irvine, USA)
- Vitalite Boyama Kiti (Eosin-Nigrosin) (Vital Screen Kit, FertiPro Diagnostics, Belçika)

## 5.2. Yöntem

### 5.2.1. Hazırlık aşaması

“Türkiye’de halk arasında yaygın olarak kullanılan tıbbi adaçayı, susam ve yaban mersini bitkilerinin *in vitro* koşullarda sperm fonksiyonu parametrelerine etkisi” başlıklı çalışmamız, 26.04.2017 tarihinde Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 2017/5-3 karar no ile etik ve bilimsel açıdan incelenerek uygun bulunmuştur.

### 5.2.2. Hasta gruplarının belirlenmesi

Çalışmamızın yapılabilmesi için alınan söz konusu etik kurul onayı ile Bahçelievler Medikal Park Hastanesi IVF Polikliniğine semen analizi yaptırma amacıyla başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden 18 yaşından büyük gönüllülerden bilgilendirilmiş onam formu alındı. Çalışmamıza katılmayı kabul eden gönüllülerden yalnızca normozoopermi olan 40 örnek çalışmaya alındı.

### 5.2.3. Bitki ekstraktlarının hazırlanması

Bitki örnekleri Ucuzcular Gıda Maddeleri Sanayi ve Ticaret A.Ş. Mısır Çarşısı şubesinden 2018 yılında satışa sunulan ürünlerden satın alma yoluyla temin edilmiştir. Ürünlerin organoleptik özelliklerinin uygun olmasına dikkat edilmiş, çalışmada teşhisleri yapılarak doğrulukları saptanan örnekler kullanılmıştır. İthal edilen Tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis*) dışındaki bitkiler yurtiçi kaynaklıdır.

(Tıbbi adaçayı) *Salvia officinalis* yaprakları, susam (*Sesamum indicum*) tohumları ve yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*) meyvelerine ait kurutulmuş örnekler, ekstraktlarının hazırlanması amacıyla önce ayrı ayrı kaba toz hale getirildi (Yusuf et al., 2017). Bu işlem için Isolab marka blendır ve ve havan kullanıldı. Droglar ayrı ayrı sırasıyla 0.01 g, 0.005 g ve 0.001g tartıldı. % 0.1, % 0.05 ve % 0.01 konsantrasyonlarında olacak şekilde 10’ar ml Ham’s F-10 solusyonu ile oda sıcaklığında, karanlıkta 6 saat maserasyona bırakıldı. Maserasyon süresi sonunda Whatman No.1 süzgeç kağıdından süzülerek ekstraktlar elde edildi.

#### **5.2.4. Semen örneklerinin toplanması**

‘Bahçelievler Medikal Park Hastanesi Androloji Laboratuvarı’na 3-5 günlük cinsel perhiz süresi sonrası gelen hastalardan masturbasyon yöntemi ile, hastanın adının soyadının yazılı olduğu steril örnek kaplarına (Fırat Medikal, Türkiye) genel bilgiler bölümünde 4.1.4.3 numaralı alt başlıkta belirtilen toplama kriterlerine uygun biçimde semen örnekleri alındı (Delilbaşı, 2008). Örneklerin alındığı saat not edildi ve 37°C’de 20 dakika boyunca likefiye olması için bekletildi. Cinsel perhiz süresi, viskozite, hacim, renk ve hastaya özel likefaksiyon süresi de kaydedildi.

#### **5.2.5. Sperm sayısı ve motilitesinin değerlendirilmesi**

Spermatozoon konsantrasyonu ve motil spermatozoon yüzdesi (motilite) WHO (WHO, 2010) kriterlerine göre belirlenerek ışık mikroskobu (Olympus, CX41, Japonya) ile değerlendirme yapıldı. Spermatozoon konsantrasyonu ve motil spermatozoon yüzdesinin belirlenmesi için Makler Sayım Kamarası kullanıldı (Sefi Medical Instruments, Sweden). Makler Sayım Kamarasının ortasına 10µl semen örneği koyup üst kapak kapatılarak x20 büyütme altında yan yana 10 kare sayılarak mililitredeki spermatozoon sayısı tespit edildi. Motilite bakımından spermler bölüm 4.1.4.5.’te belirtilen hareketlilik kategorisine göre ‘progresif hareketli’, ‘non-progresif hareketli’ ve ‘hareketsiz’ olmak üzere 3 ayrı grupta ele alındı.

#### **5.2.6. Sperm vitalitesinin değerlendirilmesi**

Çalışmada sperm vitalitesinin değerlendirilmesi için Eosin-Nigrosin vitalite boyası (Vital Screen Kit, FertiPro Diagnostics, Belgium) kullanıldı. 50 µl semen, 2 damla Eosin Y solüsyonu ile steril test tüpünde karıştırıldı ve 30 sn sonra 3 damla Nigrosin solüsyonu eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Eosin boyası sperm hücrelerini boyamada, Nigrosin boyası ise zemin boyası olarak kontrast oluşturmada kullanıldı. Nigrosin boyası tüpe eklendikten 30 saniye sonra, semen boya karışımından pastör pipeti (Falcon, USA) ile bir damla lama (Isolab, Almanya) kondu ve yayma preparatı hazırlandı. Işık mikroskobunda x100 büyütme ile incelenerek 100 spermatozoon sayıldı. Pembe veya total olarak beyaz görünmeyen hücrelerin ölü oldukları kabul edildi. Permeabilitesi bozulan spermatozoonun boya alarak pozitif renk vermesine göre elde edilen sonuçlar yüzde olarak değerlendirildi.

### **5.2.7. Semen örneklerinin çalışılması**

Sayı, motilite, vitalite ve morfoloji kriterlerine göre normozoospermi olarak saptanan örnekler iki tabakalı dansite gradient yöntemi (Moohan, 1995) ile hazırlandı. 15 ml'lik konik tüp (Falcon, USA) içine aşağıdan yukarıya doğru her birinden 1'er ml olacak şekilde %90 ve %50'lik gradient solüsyonları (Spermgrad, Vitrolife, İsveç) üst üste konuldu. En üstteki tabakanın üzerine, her bir gradient tabakası için 1 ml olacak şekilde 2 ml likefiye olmuş ejakulat sarsmadan bırakıldı ve 1400g'de 15dk süreyle santrifüje (Thermo Scientific, USA) edildi. Daha sonra en alttaki fraksiyon 1ml olacak şekilde geride bırakılarak, üstteki süpernatant kısmı transfer pipeti ile aspire edilerek dışarı atıldı. Dipte bırakılan kısım 1 ml sperm yıkama solüsyonu (Givf, Vitrolife, İsveç) ile karıştırılarak pipetaj yapıldı ve 1400g'de 5 dk olacak şekilde santrifüjlendi (Thermo Scientific, USA). Altta toplanan pellete dokunmadan süpernatant atıldı. Kalan pellet sperm yıkama solüsyonu ile homojen hale getirildi. Progresif motilite ve Eosin-Nigrosin vitalite boyası ile vitalite tayini yapıldı.

### **5.2.8. Bitki ekstraktlarının uygulanması**

Daha önceden hazırlanan ve buzdolabında (Liebherr, İsviçre) + 4°C'de saklanmakta olan bitki ekstraktları uygulamadan 2 saat önce buzdolabından alınarak oda ısısına getirildi. Normospermi olduğu saptanan semen örneklerinin her biri dansite gradient çalışması sonrasında biri kontrol ve dokuzu deney grubu olmak üzere on tüpe bölündü. Kontrol grubuna Ham's F-10 solüsyonu (Irvine, USA) ilave edildi. Çalışma grubundaki semen örneklerine, her örneğe tek bitkinin tek konsantrasyonu olacak şekilde sırasıyla 0,1mg/ml tıbbi adaçayı, 0,05 mg/ml tıbbi adaçayı, 0,01mg/ml tıbbi adaçayı, 0,1mg/ml susam, 0,05mg/ml susam, 0,01mg/ml susam, 0,1mg/ml yaban mersini, 0,05mg/ml yaban mersini, 0,01 mg/ml yaban mersini ekstraktları 1:1 (ekstrakt:semen) olacak şekilde uygulandı. Tüm örnekler 37°C inkübatöre (Heraeus CO<sub>2</sub>, Thermo Scientific, USA) konarak, 30. dakika, 60. dakika ve 24. saatte progresif motilite ve Eosin-Nigrosin vitalite boyası ile vitalite tayinleri yapıldı. Sonuçlar kayıt altına alındı.



### 5.2.9. İstatistiksel Yöntem

Değişkenler aritmetik ortalama ve standart sapma ile tanımlanmış; ikiden çok eşlendirilmiş dizilerin karşılaştırılması için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi uygulanmıştır.



## 6. BULGULAR

Çalışmamızda Özel Bahçelievler Medical Park Hastanesi Androloji Laboratuvarına başvuran 40 tane normospermili hastanın semen analizleri WHO Laboratory Manual 2010 kriterlerine göre yapıldı. Hastalara ait yaş ve semen örneklerine ait volum, konsantrasyon, motilite, progresif motilite, morfoloji ve vitaliteye ait ortalama değerler Tablo 1’de verildi

**Tablo 1:** Yaş, volüm, konsantrasyon, motilite, progresif motilite, morfoloji, vitalite ortalama değerleri

	n	Minimum	Maximum	Ortalama	Std. Sapma
Yaş	40	26	39	33,58	3,51
Volüm	40	2	7	3,05	1,15
Konsantrasyon	40	20	98	48,75	18,81
Motilite	40	58	78	64,80	4,51
Progresif Motilite	40	44	65	56,13	5,42
Morfoloji	40	4	7	5,23	1,00
Vitalite	40	73	96	85,95	4,30

### 6.1. Progresif Motilite Bulguları

Kontrol grubu ve tıbbi adaçayının üç farklı konsantrasyonundaki uygulamalarında 30 ve 60 dakikalık uygulama sürelerinde progresif motilite bulgularında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. 24 saatlik uygulamada ise tıbbi adaçayının 0,05 mg/ml ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında anlamlı fark gözlenmezken, 0,01 mg/ml’lik konsantrasyonda istatistiksel olarak

olumlu şekilde anlamlı bir fark gözlenip, progresif motil sperm sayısının daha fazla olduğu saptandı.

**Tablo 2:** Tıbbi Adaçayı konsantrasyonlarında progresif motilite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması.

		Kontrol	Tıbbi		Adaçayı	p
			Konsantrasyonları		0,1	
			0,01	0,05		
30 dk	Ortalama	90,93	91,30	91,53	91,15	0,149
	S. Sapma	6,79	5,92	5,64	5,33	
60 dk	Ortalama	90,90	91,13	91,40	89,00	0,419
	S. Sapma	6,85	6,30	5,64	14,02	
24 saat	Ortalama	80,85	<b>83,15*</b>	82,70	81,43	<b>0,003</b>
	S. Sapma	8,44	8,99	8,34	8,70	

\*Kontrolden farklı olan ortalama.

Kontrol grubu ve yaban mersininin 0,01 mg/ml'lik ve 0,05 mg/ml'lik konsantrasyonlarının üç farklı zaman dilimindeki uygulamalarının tamamında progresif motilite bulgularında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Yaban mersininin 0,1 mg/ml'lik konsantrasyonundaki uygulamalarda ise üç zaman dilimindeki ölçümlerde de istatistiksel olarak olumlu şekilde anlamlı fark gözlemlenmiş ve progresif motil sperm sayısının daha fazla olduğu saptandı.

**Tablo 3:** Yaban mersini konsantrasyonlarında progresif motilite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması.

		Yaban			Mersini	p
		Kontrol	Konsantrasyonları		0,1	
			0,01	0,05		
30 dk	Ortalama	90,93	91,50	91,78	<b>92,12*</b>	<b>0,001</b>
	S. Sapma	6,79	5,48	5,54	5,82	
60 dk	Ortalama	90,90	91,50	91,75	<b>92,05*</b>	<b>0,001</b>
	S. Sapma	6,85	5,48	5,57	5,96	
24 saat	Ortalama	80,85	84,15	83,73	<b>85,35*</b>	<b>0,001</b>
	S. Sapma	8,44	6,85	7,42	7,19	

\*Kontrolde farklı olan ortalama

Kontrol grubu ve susama ait üç farklı konsantrasyona ait uygulamalarda, susamın üç konsantrasyonunda, üç farklı zaman diliminde progresif motilite bulgularında, istatistiksel olarak olumlu yönde anlamlı fark gözlemlenmiştir. Üç uygulama zamanında da 0,1 mg/ml'lik konsantrasyondan elde edilen progresif motilite sonucu diğerlerinden daha yüksektir (p=0,001).

**Tablo 4:** Susam konsantrasyonlarında progresif motilite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması.

		Kontrol	Susam Konsantrasyonları			p
			0,01	0,05	%0,1	
30 dk	Ortalama	90,93	<b>92,87*</b>	<b>93,30*</b>	<b>93,57*</b>	<b>0,001</b>
	S. Sapma	6,79	5,76	6,76	6,71	
60 dk	Ortalama	90,90	<b>92,85*</b>	<b>93,25*</b>	<b>93,47*</b>	<b>0,001</b>
	S. Sapma	6,85	5,74	6,86	6,80	
24 saat	Ortalama	80,85	<b>86,97*</b>	<b>87,47*</b>	<b>88,17*</b>	<b>0,001</b>
	S. Sapma	8,44	8,71	8,28	8,49	

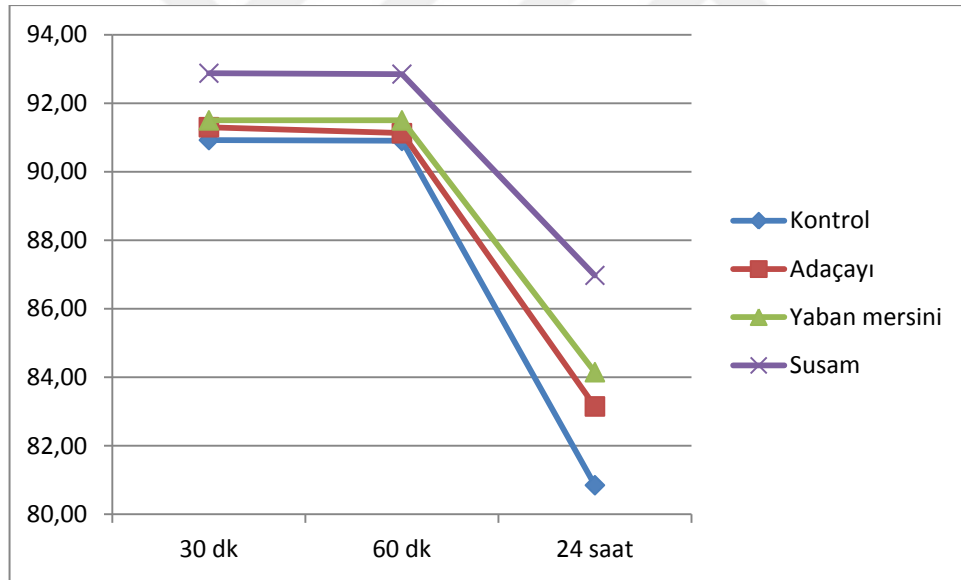
\*Kontrolde farklı olan ortalama.

30. dk, 60. dk ve 24 saat bekletilen 0,1 mg/ml'lik konsantrasyonda progresif motilite ortalamaları karşılaştırılmıştır. Üç bekletme süresinde de 0,1 mg/ml'lik susam konsantrasyonundaki sonuçlar diğer iki bitki sonuçlarından istatistiksel olarak anlamlı farklıdır.

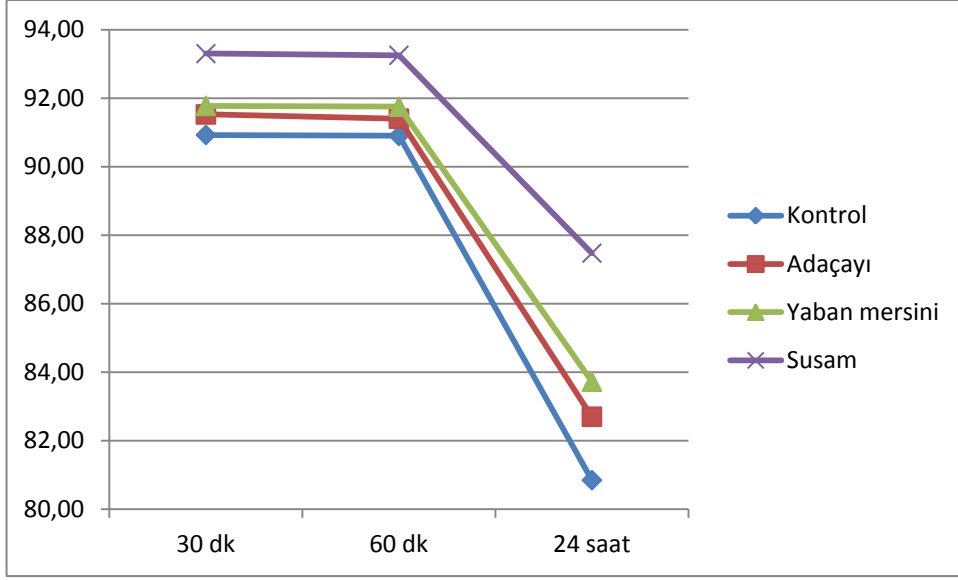
Progresif motiliteye ilişkin en olumlu durum 0,1 mg/ml'lik susam solüsyonunda 30 dk bekletilerek elde edilen sonuçtur. 60 dk veya 24 saat bekletmek zorunda kalınması halinde de en olumlu sonuç 0,1 mg/ml'lik susam solüsyonunda elde edilmiştir.

**Tablo 5:** 0,1 mg/ml’lik bitki konsantrasyonlarında progresif motilite ortalaması, standart sapması ve bitkilerin karşılaştırılması.

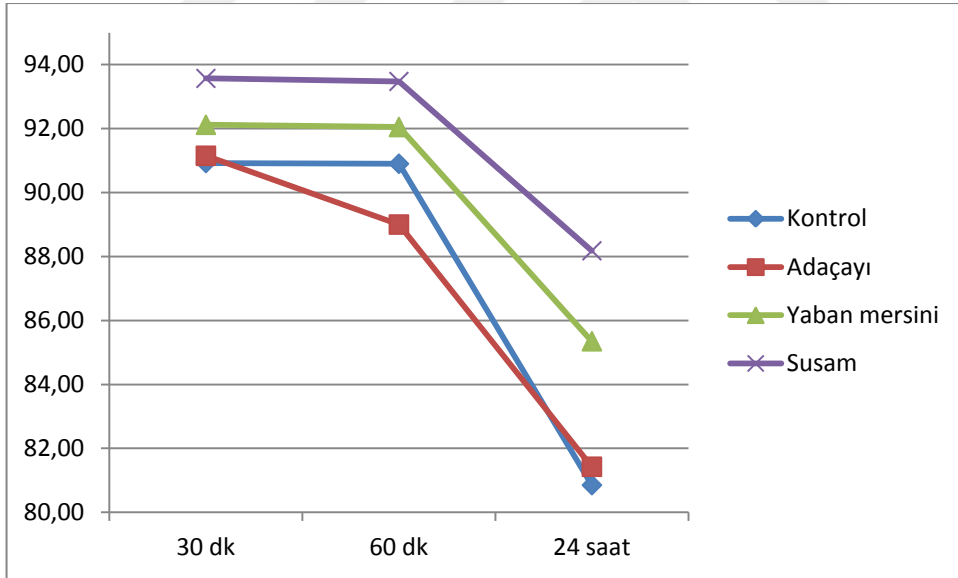
	30 dk (0,1)		60 dk (0,1)		24 saat (0,1)	
	Ortalama	S. Sapma	Ortalama	S. Sapma	Ortalama	S. Sapma
Tıbbi Adaçayı	91,15	5,33	89,00	14,03	81,43	8,70
Yaban mersini	92,12	5,82	92,05	5,96	85,35	7,19
Susam	<b>93,57</b>	6,71	<b>93,48</b>	6,81	<b>88,18</b>	8,50
p	<b>0,001</b>		<b>0,015</b>		<b>0,001</b>	



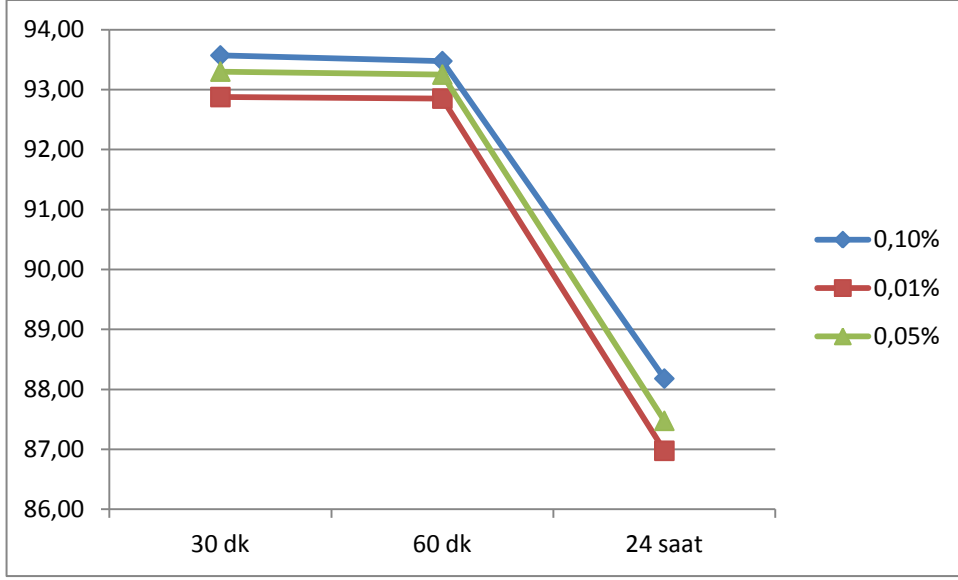
**Şekil 8.** Kontrol ve bitkilerin 0,01 mg/ml’lik solüsyonlarına ilişkin progresif motilite ortalamaları.



**Şekil 9.** Kontrol ve bitkilerin 0,05 mg/ml'lik solüsyonlarına ilişkin progresif motilite ortalamaları.



**Şekil 10.** Kontrol ve bitkilerin 0,1 mg/ml'lik solüsyonlarına ilişkin progresif motilite ortalamaları.



**Şekil 11.** Susam solüsyonlarına ilişkin progresif motilite ortalamaları

## 6.2. Vitalite Bulguları

Kontrol grubu ve tıbbi adaçayının üç farklı konsantrasyonundaki uygulamalarında 30 ve 60 dakikalık uygulama sürelerinde, vitalite bulgularında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. 24 saatlik uygulamada ise adaçayının 0,1 mg/ml'lik konsantrasyonunda anlamlı fark gözlenmezken, 0,01 mg/ml'lik ve 0,05 mg/ml'lik konsantrasyonlarında 91,35'ten 92,82 ve 92,90'a yükseldiği ve istatistiksel olarak olumlu şekilde anlamlı bir fark gözlenip, vital sperm sayısının daha fazla olduğu saptandı.

**Tablo 6.** Tıbbi Adaçayı konsantrasyonlarında vitalite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması.

		Kontrol	Tıbbi Adaçayı			p
			0,01	0,05	0,1	
30 dk	Ortalama	97,73	97,73	97,73	97,73	1,000
	S. Sapma	2,18	2,18	2,18	2,18	
60 dk	Ortalama	97,73	97,73	97,70	97,73	0,393
	S. Sapma	2,18	2,18	2,17	2,18	
24 saat	Ortalama	91,35	<b>92,82*</b>	<b>92,90*</b>	92,45	<b>0,001</b>
	S. Sapma	4,90	4,91	4,67	4,35	

\*Kontrolden farklı olan ortalama.



Kontrol grubu ve yaban mersininin üç farklı konsantrasyonundaki uygulamalarında 30 ve 60 dakikalık uygulama sürelerinde, vitalite bulgularında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. 24 saatlik uygulamada ise 0,01 mg/ml ve 0,05 mg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlı bir fark gözlemlenmezken, 0,1 mg/ml'lik konsantrasyonun uygulanmasında kontrolden anlamlı farklılık gözlemlenmiştir.

**Tablo 7.** Yaban mersini konsantrasyonlarında vitalite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması.

		Kontrol	Yaban mersini			p
			0,01	0,05	0,1	
30 dk	Ortalama	97,73	97,73	97,73	97,73	1,000
	S. Sapma	2,18	2,18	2,18	2,18	
60 dk	Ortalama	97,73	97,70	97,70	97,68	0,499
	S. Sapma	2,18	2,19	2,19	2,18	
24 saat	Ortalama	91,35	93,20	93,10	<b>93,87*</b>	<b>0,001</b>
	S. Sapma	4,90	4,21	4,66	4,08	

\*Kontrolden farklı olan ortalama.

Kontrol grubu ve susamın üç farklı konsantrasyonunun uygulamalarında 30 ve 60 dakikalık uygulama sürelerinde, vitalite bulgularında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. 24 saatlik uygulamada ise susamın tüm konsantrasyonlarında kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir.

**Tablo 8.** Susam konsantrasyonlarında vitalite ortalama, standart sapma ve konsantrasyonların karşılaştırılması.

		Susam			p	
		Kontrol	0,01	0,05		0,1
30 dk	Ortalama	97,73	97,73	97,73	97,73	1,000
	S. Sapma	2,18	2,18	2,18	2,18	
60 dk	Ortalama	97,73	97,73	97,70	97,60	0,377
	S. Sapma	2,18	2,18	2,28	2,31	
24 saat	Ortalama	91,35	<b>94,71*</b>	<b>94,92*</b>	<b>95,15*</b>	<b>0,001</b>
	S. Sapma	4,90	4,93	4,66	5,05	

\*Kontrolden farklı olan ortalama

30. dk, 60. dk ve 24 saat bekletilen 0,1 mg/ml'lik konsantrasyonlarda bitkiler arası vitalite ortalamaları karşılaştırıldığında 24 saat bekletme süresinde 0,1 mg/ml'lik susam konsantrasyonundaki sonuç adaçayı ve yaban mersininin 24 saat bekletme süresi sonuçlarından istatistiksel olarak anlamlı farklıdır (p=0,001).

**Tablo 9.** 0,1 mg/ml'lik bitki konsantrasyonlarında vitalite ortalaması, standart sapması ve bitkilerin karşılaştırılması.

	30 dk (0,1)		60 dk (0,1)		24 saat (0,1)	
	Ortalama	S. Sapma	Ortalama	S. Sapma	Ortalama	S. Sapma
T.Adaçayı	97,73	2,18	97,73	2,18	92,45	4,35
Yabanmersini	97,73	2,18	97,68	2,18	93,87	4,08
Susam	97,73	2,18	97,60	2,31	<b>95,15</b>	5,05
p	1,000		0,373		<b>0,001</b>	

## 7.TARTIŞMA VE SONUÇ

Düzenli bir cinsel ilişkiye rağmen hiçbir korunma yöntemi uygulanmaksızın, bir yıl içerisinde gebelik oluşmaması infertilite olarak adlandırılır. İnfertilite günümüz çiftlerinin yaklaşık %15'ini etkileyen bir sağlık problemidir. Erkek kaynaklı infertilite, infertil çiftlerin %10 - %30'unda tek neden iken, %15 - %30'unda da kadındaki probleme ek bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla infertilite vakalarının yaklaşık %50'sinde erkek faktörü görülmektedir. İnfertil erkek bireylerin yaklaşık %40 - %60'ında infertilitenin sebebi bilinmekle birlikte kalan vakalarda gerçek sebep tespit edilememektedir. Sebebi anlaşılmayan bu vakalar idiyopatik infertilite olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda infertil çiftlerin çocuk sahibi olabilme olasılıkları, üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYTE) geliştirilmesine paralel olarak artmıştır. Özellikle erkek faktörlü infertilite açısından değerlendirildiğinde ortaya çıkan gelişmeler infertilitenin çözülebilir bir problem olduğunu göstermiştir.

Oksidatif stresin, erkek infertilitesini negatif yönde etkilediği daha önce yapılmış olan çalışmalarla kanıtlanmıştır(Agarwal et al., 2003). İdiyopatik infertilite gözlenen erkek bireylerde fertil bireylere göre reaktif oksijen seviyelerinin yüksek, antioksidan potansiyellerinin ise düşük olduğu bildirilmiştir (Pasqualotto et al., 2001). Reaktif oksijen türleri (ROS), hidroksil radikali gibi yüksek oksidatif radikalleri ve süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi radikal olmayan türlerin tamamı için kullanılan genel bir terimdir (Wright et al., 2014). ROS'un fizyolojik sınırlar içerisindeki üretimi, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, sperm-oosit füzyonu gibi normal sperm fonksiyonları için elzemdir (Sikka et al., 1995). Bununla birlikte artmış ROS üretimi, hücrede oksidatif strese sebep olarak sperm motilitesinin azalması, vitalitenin azalması, akrozom reaksiyonunun kusurlu gerçekleşmesi ya da hiç gerçekleşmemesi veya fertilitate kaybına yol açabilir (Griveau and Le Lannou, 1997). Seminal plazma ve spermatozoa, oksidatif strese karşı oldukça etkin bir dizi koruyucu antioksidan metabolizmaya sahiptir. Normal koşullar altında ROS ve antioksidan aktivite arasında bir denge bulunmaktadır. Antioksidanlar, ROS seviyesini dengede tutarlar ve yüksek ROS seviyesini dengede tutarlar ve yüksek

ROS seviyesinin sperm parametreleri üzerindeki negatif etkilerini tersine çevirirler (Ross et al., 2010). ROS'un aşırı üretimi ve antioksidan sistemin bu üretimi dengeleyememesiyle oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres DNA hasarı, (Davies, 1987) sperm membran hasarı (Aitken et al., 1989) ve sperm motilitesinde azalma (Jones et al., 1979) gibi sonuçlara sebep olur.

İdiopatik infertilite teşhisi konmuş erkeklerle yapılmış olan bir çalışmada, infertil grupta bulunan erkeklerin semenlerinde bulunan antioksidan miktarının fertil erkeklerde bulunanlara göre anlamlı şekilde düşük olduğu gözlemlenmiştir (Alkan ve ark.,1997).

Silver et al. (2005) yaptıkları çalışmada ise günlük diyetlerinde yüksek oranda antioksidan alan erkeklerde, daha düşük antioksidan alanlara göre, sperm kalitesinin belirgin bir şekilde yükseldiği ve anöploidiye daha az rastlandığı bildirilmiştir (Silver et al., 2005).

Dawson ve arkadaşlarının (1987) %25 oranında sperm aglütinasyonunun gözlemlendiği erkeklerde yaptığı çalışmada ise 4 hafta boyunca günde 1000mg C vitamini alan erkeklerde, kontrol grubuna göre motilite, vitalite ve sperm morfolojisinin anlamlı şekilde arttığı rapor edilmiştir. Yine Dawson ve arkadaşlarının (1992) 75 sigara içen erkek üzerinde yaptığı çalışmada günde 1000mg C vitamini alan grupta, kontrol grubuna göre spermin morfolojisinin ve 24 saatlik vitalitesinin olumlu yönde arttığı bildirilmiştir (Dawson et al., 1992).

Lenzi ve ark.'nın (2003) yaptığı çalışmada ise 100 infertil erkek, 2 ay boyunca günlük 2 gr L-karnitin takviyesi almıştır. 2 ayın sonunda L-karnitin takviyesini bırakarak 2 ay boyunca normal beslenmelerini sürdürmüşlerdir. Sonraki 2 ay boyunca da yine günlük 2 gr L-karnitin takviyesi almaya devam etmişlerdir. 6. ayın sonunda elde edilen bulgularda L-karnitin takviyesi alan grupta kontrol grubuna göre total motil sperm sayısı ile progresif motil sperm sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca tedavi süresi boyunca L-karnitin takviyesi alan grupta 8 tane spontan gebeliğin olduğu bildirilmiştir (Lenzi et al., 2004).

Ciftçi ve ark. (2009) 120 idiyopatik infertilite tanısı koyulan erkekte yaptığı çalışmada, 3 ay boyunca günlük 60 mg N-asetilsistein takviyesi alan grupta, plasebo

alan kontrol grubuna göre semen volumünün, sperm motilitesinin ve total antioksidan kapasitesinin anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir.

Geva et al. (1996) daha önceden başarısız IVF siklusları olan infertil erkekler üzerinde yaptığı çalışmada, 1 aylık E vitamini tedavisinden sonra uygulanan IVF tedavisinde fertilizasyon oranlarının anlamlı şekilde yükseldiği gözlenmiştir.

Nadjarzadeh et al. (2014) 60 oligoastenoteratozoospermik infertil erkek üzerinde yaptığı çalışmada, 3 aylık koenzim Q10 tedavisinden sonra, antioksidan enzimler olan katalaz ve SOD'un aktivitelerinin artmasıyla birlikte, sperm motilite, morfoloji ve vitalitesinin de anlamlı şekilde arttığı belirtilmiştir.

Koenzim Q10'in *in vitro* etkisinin araştırıldığı çalışmada, 16 normozoospermik ve 22 astenospermik hastadan alınan örnekler 4 gruba bölünerek, ilk gruba yalnızca Ham's medium, ikinci gruba %1'lik DMSO ile birlikte Ham's medium, üçüncü gruba 5 µM CoQ10 ve Ham's medium, dördüncü gruba ise 50 µM CoQ10 ve Ham's medium ilave edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından 50 µM CoQ10 ilave edilen astenospermik grupta motilitenin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır (Lewin and Lavon, 1997)

Antioksidanların etkisini *in vitro*da gösteren başka bir çalışmada ise Al-Dujaily ve ark. (2013) infertil erkeklerden alınan semen örneklerinin *in vitro*da L-karnitin solüsyonu uygulanmış ve ve L-karnitin uygulanan örneklerde hem total sperm motilitesinin hem de progresif sperm motilitesinin, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir

Verma and Kanwar (1998) yaptıkları çalışmada *in vitro*da sperm hücrelerine askorbik asidin 50 µM'dan 4000 µM'a kadar değişen farklı konsantrasyonları uygulanmış ve 1000 µM'ın altındaki konsantrasyonlarda askorbik asidin spermatazoayı ROS'un negatif etkilerinden koruduğu ve sperm motilitesiyle birlikte vitalitesini de arttırdığı rapor edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada ise sperm konsantrasyonu 20 milyon/ml üzerinde, motilitesi ise %60'ın üzerinde olan sperm örnekleri 4 gruba bölünerek *in vitro*da E vitaminin 0.1, 1.0 ve 2.0 mmol/L olacak şekilde 3 farklı dozu uygulanmış ve oda sıcaklığında 6 saate kadar inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre E

vitaminin 1.0 ve 2.0 mmol/L dozu uygulanan örneklerde 1 saatlik inkübasyonun ardından motilitenin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. 6 saatlik inkübasyonda ise 2.0 mmol/L dozun uygulandığı örnekte motilite artışı maksimum seviyeye çıkmıştır. Yine 1.0 ve 2.0 mmol/L dozlarında 2 saatlik inkübasyonun ardından vitalitede anlamlı artış gözlenmiş olup, 6 saatlik inkübasyon sonrasında 2.0 mmol/L dozunda vitalitenin en yüksek artışı gösterdiği bildirilmiştir. (Verma and Kanwar, 1999)

Moubasher et al. (2013) çalışmalarında, 50 fertil erkekte alınan sperm örnekleri 4 gruba bölünmüştür. İlk grup sperm yıkama yapılmadan ve katalaz ilavesi olmadan, ikinci grup sperm yıkama olmadan ve katalaz ilave edilerek, üçüncü grup sperm yıkama yapıp katalaz ilave edilmeden, dördüncü grup ise hem sperm yıkama yapıp hem de katalaz ilavesi yapılarak dondurulmuştur. Çözme sonrası elde edilen bulgulara göre, katalaz ilave edilen gruplarda sperm yıkamadan bağımsız olarak progresif motilite ve vitalite yüzdesinin anlamlı şekilde arttığı, DNA hasarı yüzdesinin ise anlamlı şekilde azaldığı bildirilmiştir.

Kalthur et al. (2011) dondurulmuş çözülmüş spermler üzerinde yaptıkları çalışmada, 38 normozoospermik, 59 astenozoospermik erkekte alınan örnekler iki gruba bölünmüştür. İlk grup yıkama sonrasında E vitamini eklenmeden, ikinci grup ise 5 alt gruba bölünerek sırasıyla 1, 5, 10, 50 ve 100 mM E vitamini eklenerek dondurulmuştur. İki hafta beklemeden sonra çözme işlemi gerçekleştirildiğinde hem normozoospermik hem de astenozoospermik örneklerde 5 mM E vitaminin uygulandığı gruplarda motilite ve progresif motilitenin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. 5 mM'dan yüksek dozların uygulandığı örneklerde ise, motilitenin düştüğü rapor edilmiştir.

Chi et al. (2008) 42 normozoospermik erkek üzerinde yaptığı çalışmada, farklı dozlarda EDTA ve katalaz, sperm yıkama solüsyonuna ilave edilmiş, kontrol grubu ise EDTA ve katalaz ilave edilememiş yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında yapılan progresif motilite tayininde EDTA uygulanan tüm örneklerde anlamlı artış gözlenirken, katalaz uygulanan örneklerde anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Geçtiğimiz yıllarda özellikle gelişmekte olan Asya ülkelerinde infertilitenin tedavisi için tıbbi bitkilerin kullanımı hız kazanmaya başlamıştır (Bahmanpour et al.,

2006). İnfertilite tedavisinde kullanılan bitkilerin en önemli ortak özellikleri yüksek antioksidan içerikleridir. Birçok bitkinin tedavi için denenmesinin yanı sıra, bunların arasından yalnızca az sayıda bitki halk arasında tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Antioksidan içerikli bitkilerin etkilerini araştırmak amacıyla dizayn edilen klinik araştırmaların birçoğu bitkilerin oral yolla alınması ve *in vivo* etkilerinin gözlenmesi şeklinde yapılmıştır.

Kolahdooz et al. (2014) 68 infertil erkek üzerinde yaptıkları çalışmada hastalar ikiye bölünmüş, kontrol grubu 2 ay boyunca günde 2 kez oral yolla 2,5 ml sıvı parafin alırken, çalışma grubu ise 2 ml çörek otu yağı (*Nigella sativa* L.) almıştır. 2 ayın sonunda yeniden değerlendirilen örneklerde sperm konsantrasyonu, motilite, morfoloji ve semen volümü ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *N. sativa* alan grupta sperm konsantrasyonu, motilite, morfoloji ve semen volümünün kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı rapor edilmiştir.

Parandin et al. (2012) yaptıkları çalışmada ise erkek farelere 60 gün boyunca *N. sativa* ekstraktı 200mg/kg ya da 400 mg/kg dozları oral yoldan verilmiştir. *N. sativa* fertilite potansiyelini, luteinleştirici hormon (LH) ve testosteron seviyesini arttırmasına rağmen, motilite ve vitalite değerlerinde anlamlı fark görülmemiştir.

Bahmanpour et al. (2006) Sprague-Dawley fareleri ile yaptıkları çalışmada 50 fare 5 gruba bölünerek ilk grup kontrol olarak değerlendirilmiş, diğer dört gruba ise sırasıyla 30, 60, 120 ve 240 mg/kg *Phoenix dactylifera* polen (date palm pollen, DPP) ekstraktı günlük olarak oral yoldan verilmiştir. 35 gün süren çalışmanın sonucunda, anestezi altında ductus deferensten sperm hücreleri toplanarak, sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji ile birlikte testis ağırlığı değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre DPP ekstraktı alan tüm gruplarda sperm konsantrasyonu artmakla birlikte en etkili dozun 120 mg/kg olduğu gözlenmiştir. Yine tüm DPP alan gruplarda testis ve epididimis ağırlığının artış gösterdiği belirtilmiştir. 30 mg/kg haricindeki tüm dozlarda motilite kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır. Morfolojik değerlendirmede ise en etkili dozun 240 mg/ml olmakla birlikte tüm dozlarda morfolojinin iyileşme gösterdiği gözlenmiştir.

Shi et al. (2017) diyabetik erkek fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, çalışma grubundaki farelere 62 gün boyunca 3 farklı dozda *Lycium barbarum*

uygulanarak diyabetin yol açtığı spermatogenik fonksiyon bozukluklarını düzelterip düzeltmeyeceği gözlemlenmiştir. 62 gün sonunda elde edilen bulgulara göre, *Lycium barbarum* uygulanan diyabetik farelerde üreme organlarının ağırlığı artmış, semen parametrelerinde anlamlı iyileşme gözlenmiş ve antioksidan enzim aktivitesi farklı derecelerde artış göstermiştir.

*Tetracordium conophorum*'un albino erkek Wistar farelerinin üreme sistemlerindeki etkilerini gözlemek amacıyla yapılan çalışmada, 25 adet fare 5 gruba bölünmüştür. İlk grup kontrol olacak şekilde 2. 3. ve 4. gruplara sırasıyla 50, 500 ve 1000 mg/kg *T. conophorum* oral yoldan 21 gün boyunca verilmiştir. 21 gün sonunda elde edilen bulgulara göre *T. conophorum* uygulanan gruplarda sperm konsantrasyonu, motilitesi ve vitalitesinde anlamlı artış gözlenirken, anormal morfolojili sperm sayısında azalma gözlenmemiştir. Belirgin parametrelerde en belirgin artış en yüksek dozda gözlenmiştir. (Akomolafe and Oboh, 2017)

Amidi et al. (2014) varikoselli fareler ile yaptıkları *in vivo* çalışmada, 8 hafta boyunca *Crocus sativus*'un alkollü çözeltilisiyle tedavi edilen grupta, tüm sperm parametrelerinin iyileştiği gözlenirken, *C. sativus* ile tedavi edilmeyen kontrol grubunda varikosele bağlı olarak tüm sperm parametrelerinin anlamlı şekilde düştüğü rapor edilmiştir.

Antioksidan özelliği daha önce yapılan çalışmalarla aydınlatılmış olan *C. sativus* (Chattarjee et al., 2005) ile yapılan bir başka çalışmada ise sigara içmeyen 52 infertil erkeğin, 3 ay boyunca haftada 3 kez süt içerisinde çözülmüş 50 mg *C. sativus* içmesi sağlanmıştır. 3 ayın sonunda elde edilen semen parametreleri bulgularına göre, sperm konsantrasyonunda fark gözlenmezken, motilite, progresif motilite ve morfoloji değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. (Heidar et al., 2008)

Bitkilerin antioksidan özelliklerinin, erkek infertilitesi üzerindeki etkilerini araştıran çok sayıda *in vivo* çalışmanın yanı sıra, *in vitro*daki sperm parametreleri ve fonksiyonları üzerine çok az sayıda çalışma yapılmıştır.

Khaleghi et al. (2016) yaptıkları çalışmada yüksek antioksidan özelliği daha önce aydınlatılmış olan *Tribulus terrestris*'in (Zheleva-Dimitrova et al., 2012) *in vitro* ortamda insan semen parametreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. 40



infertil erkekte alınan örnekler 4 gruba bölünerek ilk gruba yalnızca Ham's F-10 mediumu ilave edilmiş, 2. 3. ve 4. gruplara ise sırasıyla Ham's F-10 mediumu ile birlikte *T. terrestris* ekstraktının 20, 40 ve 50 µg/ml dozları ilave edilmiş ve inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 15, 30, 60 ve 120. dakikalarında örnekler için sperm parametreleri ölçülmüştür. Elde edilen motilite bulgularına göre, 20 µg/ml dozunda tüm inkübasyon süreleri için hiçbir fark gözlenmemiştir. 40 ve 50 µg/ml dozlarda 15 ve 30 dakikalık bekleme süresinde anlamlı fark gözlenmezken, 60. ve 120. dakikalarda kontrole göre anlamlı artış rapor edilmiştir. Vitalite bulgularına bakıldığında ise 20 µg/ml dozda tüm bekleme sürelerine bakıldığında anlamlı fark gözlenmemiştir. 40 ve 50 µg/ml dozlarına bakıldığında ise 60. bekleme dakikasından itibaren vitalitenin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı belirtilmiştir. Motilite ve vitalitenin yan sıra DNA fragmentasyonunu da değerlendiren çalışmada *T. terrestris*'in DNA fragmentasyonunda hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada ise, Hang et al. (1992) geleneksel Çin bitkilerinden biri olan *Astragalus membranaceus*'un insan spermleri üzerindeki *in vitro* etkilerini ortaya koymuşlardır. Sperm örnekleri 2 gruba ayrılarak, ilk gruba yıkama işlemi yapılmadan, ikinci gruba ise yıkama işlemi sonrasında *A. membranaceus*'un 10mg/ml'lik fosfat tamponu çözeltisi uygulanmıştır. 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen bulgulara göre her iki grupta da sperm motilitesi anlamlı artış göstermiştir.

*Camellia sinensis*'in (çay) ana bileşenlerinden biri olan epigallokateşin gallat'ın (EGCG) *in vitro* etkilerinin araştırıldığı çalışmayı ise De Amicis et al. (2012) gerçekleştirmiştir. Çalışma normozoospermik erkeklerin semen örnekleriyle yapılmış ve örnekler kontrol grubu haricinde 3 gruba bölünerek EGCG'nin 2 µM, 20 µM ve 60 µM konsantrasyonları uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre EGCG'nin düşük dozlarının (2 ve 20 µM) sperm motilite ve vitalitesini arttırdığı rapor edilmiştir.

Wittayararat et al. (2013) gerçekleştirdiği çalışmada ise *Camellia sinensis*'in bileşenlerinden olan polifenollerin köpek spermleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Köpek spermlerinin 5 °C'de uzun süre saklanması için hazırlanan Tris-egg yolk mediumuna 0.5, 0.75 ve 1mg/ml konsantrasyonlarında *Camellia sinensis*'ten elde edilen polifenol ilave edilmiştir. Polifenol içeren tüm mediumlarda saklanan sperm

örneklerinde konsantrasyondan bağımsız olarak sperm motilite ve vitalitesi artmış ve 5 °C’de saklama süresi dört haftaya kadar uzamıştır.

Yaptığımız çalışmada *in vitro* sperm fonksiyonları üzerine etkilerini araştırdığımız üç bitkiden biri susamdı (*Sesamum indicum*). Susam Türkiye’de halk arasında özellikle cinsel gücü arttırdığına inanılması sebebiyle kullanılmaktadır. Susamın güçlü antioksidan içeriği daha önceki çalışmalarda aydınlatılmıştır (Shittu et al., 2007)

Abbasi et al. (2013) yaptıkları çalışmada Wistar farelerinin diyetlerine 8 hafta boyunca %5’lik susam yağı ilave edilerek, 8 haftanın sonunda elde edilen bulgular değerlendirilmiştir. Bu bulgulara göre %5 susam yağı alan grupta kontrol grubuna göre epididimal sperm miktarı, progresif motilite ve seminifer tübüllerde bulunan sperm miktarı istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır.

Yine Abbasi et al. (2013) yaptığı başka bir çalışmada ise susam yağının etkisini laboratuvar indüklü diyabet hastası fareler üzerinde araştırılmıştır. Bu çalışmada fareler, öncelikle hasta olan ve olmayan şeklinde ikiye bölünmüş, her iki grupta yine ikiye bölünerek bir grubun beslenmesine %5 susam yağı ilave edilirken diğerine ilave edilmemiştir. 56 gün süren çalışmanın sonucunda elde edilen bulgulara göre susam yağı alan 2 grupta da sperm sayısı anlamlı artış gösterirken, progresif motilite ve vitalitede fark gözlenmemiştir.

Sandhu et al. (2014) susam yağının sperm motilitesi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada ise susam yağı ile 60 dakika inkübe edilen spermelerde hem total motilitenin em de progresif motilitenin kontrol grubuna göre azaldığı rapor edilmiştir.

Khani et al. (2013) yaptıkları çalışmada susamın insan spermi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Daha önceden infertil olduğu bilinen 25 erkeğin diyetlerine 3 ay boyunca 0,5 mg/kg dozunda susa ilave edilmiştir. 3 ayın sonunda yapılan semen analizleri tedavi öncesi yapılan analizlerle karşılaştırıldığında sperm konsantrasyonu ve motilitesinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. 3 aylık tedavinin sonunda, intrauterin inseminasyon için uygun olan 3 hastadan bir tanesinde gebelik elde edilirken, mikroenjeksiyon için uygun olan 2 hastada hiç gebelik elde edilememiştir.

2 hastada ise spontan gebelik bildirilirken, tüm gebelikler canlı doğum ile sonuçlanmıştır.

Bizim yaptığımız çalışmada ise susamın tüm konsantrasyonlarında ve tüm zaman dilimlerinde progresif motilite değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Progresif motilite üzerinde en etkili olan konsantrasyon ise tüm zaman dilimlerinde 0.1 mg/ml olmuştur.

Vitalite bulguları değerlendirildiğinde ise tüm konsantrasyonlarda 30. ve 60. dakikalarda fark gözlenmezken 24 saatlik bekleme süresinde tüm konsantrasyonlara ait vitalite değerlerinde anlamlı fark gözlenmiştir.

*Salvia officinalis*, Türkiye’de halk arasında özellikle bağışıklık güçlendirici etkileri sebebiyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. Tokoferol, tokotrienol, karotenoid ve yağ asidi içerikleriyle yüksek antioksidan özellik göstermektedir (Zivkovic et al., 2014). *S. Officinalis*’in insan ya da hayvanlarda üreme sistemi ve infertiliteye etkileri üzerine çok fazla çalışma yapılmamıştır.

El-Wakf et al. (2015) obez fareler üzerinde yaptıkları çalışmada diyetlerine *S. officinalis* yağı ilave edilen farelerde, testiküler fonksiyonların obezitenin negatif etkilerine karşı korunduğu ve epididimal sperm miktarının anlamlı artış gösterdiği rapor edilmiştir.

Monton et al. (2015) yaptıkları çalışmada *S. officinalis*’in etkisini yaban domuzu spermi üzerinde göstermişlerdir. Dondurma solüsyonuna ilave edilen *S. officinalis* ekstraktının spermleri, dondurup çözmeye bağlı oksidatif stres hasarlarından koruduğu ve sperm parametrelerini iyileştirdiği bildirilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada ise, progresif motilite bulgularını değerlendirdiğimizde 0.1 ve 0.05 mg/ml’lik konsantrasyonlarda tüm zaman dilimlerinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir. 0.01 mg/ml’lik konsantrasyonda ise 24. Saatte istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir.

Vitalite bulgularına bakıldığında 0.1 mg/ml’lik konsantrasyonda tüm zaman dilimlerinde anlamlı fark oluşmamıştır. 0.01 ve 0.05mg/ml’lik konsantrasyonlarda 24 saatlik bekleme süresinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir.

*Vaccinium myrtillus* içeriğindeki antosiyanidin ve fenolik gruplara bağlı olarak yüksek antioksidan özellik gösterir. Buna bağlı olarak da halk arasında kalp hastalıkları, tansiyon ve diyabet gibi hastalıklara karşı kullanımı yaygındır. Kimyasal profili ve antioksidan özellikleri bilinmesine rağmen infertilite üzerindeki olası etkilerini araştıran hiçbir çalışma yapılmamıştır.

Bizim çalışmamızda ise, progresif motilite bulguları değerlendirildiğinde yaban mersininin 0.01 ve 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonlarında tüm bekleme sürelerinde anlamlı fark gözlenmemiştir. 0.1 mg/ml'lik konsantrasyonuna baktığımızda ise tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre anlamlı fark gösterdiği saptanmıştır.

Vitalite bulgularına bakıldığında ise, yine 0.01 ve 0.05 mg/ml'lik konsantrasyonlarda tüm zaman dilimlerinde fark gözlenmezken 0.1 mg/ml'lik konsantrasyonda ise yalnızca 24 saatlik bekletme süresinde anlamlı fark elde edilmiştir.

Susam, tıbbi adaçayı ve yaban mersininde elde ettiğimiz verileri karşılaştırdığımızda susamın 0.1mg/ml'lik konsantrasyonunun progresif motilite değerleri, adaçayı ve yaban mersinine göre anlamlı şekilde fark göstermiştir. Progresif motiliteye ilişkin en anlamlı artış susamın 0.1 mg/ml'lik konsantrasyonunun 30. dakikadaki ölçümünde gözlenmiştir.

Bitkiler arasındaki vitalite ortalamaları karşılaştırıldığında ise, 24 saatlik bekletme süresinde, 0.1 mg/ml'lik susam konsantrasyonundaki sonuç diğer iki bitkide elde edilen sonuçlara göre anlamlı şekilde farklıdır.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, yaptığımız çalışmada normospermili hastalara uygulanan tıbbi adaçayı, yaban mersini ve susam ekstraktlarının arasından özellikle susamın konsantrasyon ve bekleme süresinden bağımsız olarak *in vitro* koşullarda sperm progresif motilitesi ve vitalitesini anlamlı derecede artırdığını tespit ettik. Hem progresif motilite hem de vitalite bakımından değerlendirildiğinde en anlamlı artışın ise susamın 0.1 mg/ml'lik konsantrasyonunun 24 saatlik bekleme süresinde olduğunu gözlemledik.

Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar susam ekstraktının *in vitro* uygulamasının sperm motilitesini arttırmaya yönelik hem intrauterin inseminasyon hem de mikroenjeksiyon işlemlerinde kullanılabileceğini düşündürmekle birlikte toksik etkilerine dair elimizde yeterli bulgu olmadığından, daha çok araştırma yapılması gerekmektedir. Bundan dolayı, bu doğrultuda yapılacak daha kapsamlı ve ileri düzeydeki çalışmaların bu konuya katkıda bulunacağına inanmaktayız.



## 8. KAYNAKÇA

Abbasi, Z., Barati, F., Tabatabaei, S.R.F, Mazaheri, Y.(2013), The effects of sesame oil on some reproductive parameters of male rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15(1), 94-99.

Abbasi, Z., Tabatabaei, S.R.F., Mazaheri, Y., Barati, F., Morovvati, H.(2013), Effects of sesame oil on the reproductive parameters of diabetes mellitus-induced male rats. *World J Men Health*, 32(2), 141-149.

Abd El-Ghany, M., Dalia, A.H., Soha, M. (2010), Biological study on the effect of pumpkin seeds and zinc on reproductive potential of male rats. Faculty of Specific Education Mansoura University. *The 5th Arab and 2nd International Annual Scientific Conference*, 2384-2403.

Abdullaev, F., Riveron-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Manuel-Hernandez, J., Perez-Lopez, I. (2003), Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology in vitro*, 17(5-6), 731-736.

Abshenas, J., Babaei, H., Zare, M.H., Allahbakhshi, A., Sharififar, F. (2011), The effects of *green tea (Camellia sinensis) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress*. *Veterinary Research Forum*, 2(4), 242-247.

Agarwal, A., Said, T.M. (2003), Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Upd*, 9, 331-34.

Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A., (2003), Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 78, 313-8.

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. *J Reprod*, 81, 459-469.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S. (1988), Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*, 9(6), 367-76.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S., (1989), Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod*, 41, 183-197.

Aitken, R.J., Krausz, C. (2001), Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122, 497–506.

Aitken, R.J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D.W., van Duin, M. (1995), Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci*, 8, 2017-25.

Akomolafe, S.F., Oboh, G. (2017), Walnut leaf extract acts as a fertility agent in male Wistar albino rats- A search for herbal male fertility. *J Complement Integr Med*, 15(2).

Alkan, I., Simsek, F., Haklar, G., Kervancioğlu, E., Ozveri, H., et al. (1997), Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol*, 157, 140–3.

Allamaneni, S.S., Agarwal, A., Nallella, K.P., Sharma, R.K., Thomas, A.J. Jr. (2005), Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertil Steril*, 83, 800–803.

Al-dujaily, S.S., Al-Sultani, Y.K., Shams A.N. (2013), DNA normality following in vitro sperm preparation with pentoxifylline and L-Carnitine for asthenozoospermic infertile men. *Glob J Med Res*, 13, 25-30.

Amidi, F., Ebrahimi, S., Abbasi, M., Yazdani, M., Ghasemi, S. (2014), Effects of saffron extract on sperm parameters in rats with experimentally induced-varicocele. *J Qazvin Univ Med Sci*, 815, 4-11.

Amin, A., Hamza, A.E.A. (2006), Effects of Roselle and Ginger on cisplatin induced reproductive toxicity in rats. *Asian Journal Androl*, 8(5), 607-612.

Atalay, M., Gordillo, G., Roy, S., Rovin, B., Bagchi, D., et al. (2003), Anti-Antigionic Property of Edible Berry in a Model of Hemangioma. *FEBS Letters*, 544: 252-257.

Awoniyi, D., Aboua, G., Marnewick, J.L., Plesis, S.S. , Brooks, N.L. (2011), Protective effects of rooibos (*Aspalathus linearis*), green tea (*Camellia sinensis*) and commercial supplements on testicular tissue of oxidative stress-induced rats. *African Journal of Biotechnology*, 10(75), 17317-17322.

Bahmanpour, S., Talaei, T., Vojdani, Z., Panjehshahin, M.R., Poostpasand, A., et al. (2006), Effect of Phoenix Dactylifera Pollen on sperm parameters and reproductive system of adult male rats. *IJMS*, 31, 208-212.

Baker, M.A., Aitken, R.J. (2005), Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 29(3), 67.

Banks, W.A., Coon, A.B., Robinson, S.M., Moinuddin, A., Shultz, JM. (2004), Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes*, 53(5), 1253-1260.

Bashandy, A.E.S. (2007), Effect of fixed oil of *Nigella sativa* on male fertility in normal and hyperlipidemic rats. *International Journal of Pharmacology*, 3(1), 27-33.



Bashir, A., Tahir, M., Samee, W., Munir, B. (2009), Effect of tribulus terrestris on testicular development of immature albino rats. *Biomedica*, 25, 63-68.

Bast, A., Haenen, G., Goelmen, J.A. (1991), Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am J*, 91(Suppl 3), 2-13.

Bedaiwy, M.A., Falcone, T., Mohamed, M.S., Aleem, A.A., Sharma, R.K. (2004), Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*, 82, 593-600.

Bozin, B., Mlmica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007), Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7879-7885.

Burrows, P.J., Schepterman, C.G., Lipshultz, L.I. (2002), Comprehensive Office evaluation in the new millennium, *Urol Clin North Am*, 29, 873-894.

Chatterjee, S., Poduval, T.B., Tilak, J.C., Devasagayam, T.P. (2005), A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*). *Clin Chim Acta*, 352, 155-63.

Chemes, E.H., Rawe, Y.V. (2003), Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update*, 9, 405-28.

Chi, H.J., Kim, J.H., Ryu, C.S., Lee, J.Y., Park, J.S., et al. (2008), Protective effect of antioxidant supplementation in sperm preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 23, 1023-1028.

Ciftci, H., Verit, A., Savaş, M., Yeni, E., Erel, O. (2009), Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. *Urology*, 74, 73-6.

ClaBen-Beckhoff, R., Speck, T., Tweraser E., Wester, P., Thimm S., et al. (2004), The staminal lever mechanism in *Salvia L.*: a key innovation or adaptive radiation. *Organism Diversity & Evolution*, 4(3), 189-205.

Clark, N.A., Will, A.M., Moravek, M., Xu, X, Fisseha S. (2013), Physician and patient use of attitudes towards complementary and alternative medicine in the treatment of infertility. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 112(3), 253-7.

Clermont, Y. (1972), Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelial cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52, 198-236.

Collins, T.F.X., Sprando, R.L., Black, T.N., Olejnik, N., Wiesenfeld, P.W. (2003), Effects of flaxseed and defatted flaxseed meal on reproduction and development in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 819-834.

Correa-Perez, J.R., Fernandez-Pelegrina, R., Aslanis, P., Zavos, P.M. (2004) Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospermia. *Fertil Steril*, 81, 1148-50.

Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H. (1994), Separation of Major Antioxidants in Sage by High-Performance Liquid-Chromatography. *Sciences Des Aliments*, 14(6), 811-815.

Dağdeviren, A., Müftüoğlu, F.S., Karabay, G. (Çev.) (2009), Renkli Histoloji Atlası. Gartner L.P., Hiatt, J.L. Ankara: Güneş Tıp Kitapevi.

Davidoff , M.S., Schulze, W., Middendorff, R., Holstein, A. F. (1993), The Leydig cell of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res*, 271, 429-439.

Davies, K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals 1- general aspects. *J. Biol. Chem*, 262, 9895-9901.

Dawson, E.B., Harris, W.A., Teter, M.C., Powell, L.C. (1992), Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril*, 58, 1034-9.

De Amicis, F., Santoro, M., Guido, C., Russo, A., Aquila, S. (2012), Epigallocatechin gallate effects survival and metabolism of human sperm. *Mol Nutr Food Res*, 56(11), 1655-64.

De Jonge, C., LaFromboise, M., Bosmans, E., Ombelet, W., Cox, A. (2004), Influence of the abstinence period on human sperm quality, *Fertil Steril*, 82, 57-65.

De Lamirande, E., Gagnon, C. (1993), A Positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human Spermatozoa. *Inter J Androl*, 16(1), 21-5.

De Lamirande, E., Gagnon, C. (1995), Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod*, 10(Suppl 1), 15-21.

Delilbaşı, L. (2008), In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Ankara: Veri Medikal Yayıncılık.

Demir, R. (Çev.) (2006) Üreme Sistemi, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye giriş. Kierszenbaum, A. L., Ankara; Palme Yayıncılık, 531-544.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K. (2004), Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, 52, 794-804.

Eidi, A., Eidi, M. (2009), Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 3(1), 40-44.

Eliasson, R. (1975), Analysis of semen. In: Progress in Infertility. Behrman SJ KR, (eds), NY: Little, Brown, s: 691-713.

El-Tantawy, W.H., Temraz, A., El-Gindi, O.D. (2007), Free serum testosterone level in male rats treated with tribulus alatus extracts. *International Braz j Urol*, 33(4), 554-559.

Eşrefoğlu M. (2004), Genel ve Özel Histoloji. Malatya: Pelikan Yayıncılık

El-Wakf, A.M., Elhabibi, E.M., El-Ghany, E.A. (2015), Preventing male infertility by marjoram and sage essential oils through modulating testicular lipid accumulation and androgens biosynthesis disruption in a rat model of dietary obesity. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3), 167-175.

Figueiroa, M.S., Cesar, V.j.S., Leite, D.S., Filho, R.C., Ferreira, F. et al. (2009), Green tea polyphenols inhibit testosterone production in rat Leydig cells. *Asian Journal of Andrology*, 11(3), 362-370.

Gartner, L.P., Hiatt, J.L. (2007), Color Textbook of Histology. '3nded.' Philadelphia: WB Saunders Company.

Gauthaman, K., Ganesan, A.P. (2008), The hormonal effects of Tribulus terrestris and its role in the management of male erectile dysfunction - an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine*, 15(1), 44-54.

Geva, E., Bartoov, B, Zabludovsky, N., Lessing, J.B., Lerner-Geva, L., et al. (1996), The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*, 66, 430-4.

Ghafari, S., Balajadeh, B.K., Golalipour, M. (2011), Effect of *Urtica dioica* L.(Urticaceae) on Testicular Tissue in STZ-induced Diabetic Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14, 798-804.

Ghafoorunissa, Hemalatha, S., Rao M.V. (2004), Sesame lignans enhance antioxidant activity of vitamin E in lipid peroxidation systems, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262: 195 – 202.

Girotti, A.W. (2001), Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cryoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B*, 63, 103-13.

Golalipour, M.J., Kabiri, B.B., Ghafari, S., Azarhosh, R. (2011), Protective effect of *urtica dioica* L.(urticaceae) on morphometric and morphologic alterations of seminiferous tubules in stz diabetic rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(5), 472–477.

Gonzales, G., Córdova, A., Vega, K., Chung, A., Villena, C. (2003), Effect of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *Journal of Endocrinology*, 176(1), 163-168.

Gonzales, G., Gasco, M., Cordova ,A., Chung, A. (2004), Rubio J. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). *Journal of endocrinology*, 180(1), 87-95.

Gökçe, A. (2011), Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre standart semen analizi, *TurkUrol Sem*, 2, 1-7.

Griveau, J.F., Le Lannou, D. (1997), Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*, 20, 61-9.

Güenalp, S. (Çev) (2002), WHO ( Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı: İnsan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. Ankara; Tıp Teknik Kitapevi.

Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. (1999), Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition, London: Oxford University Press.

Hamidpour, M., Hamidpour R., Hamidpour S., Shahlari M. (2014), Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(2), 82-88.

Hamza, A.A., Amin, A. (2007), Apium graveolens modulates sodium valproate induced reproductive toxicity in rats. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307(4), 199-206.

Hang, C.Y., Ku, J., Wu, P. (1992), Astragalus membranaceus stimulates human sperm motility in vitro. *The American Journal of Chinese Medicine*, 20, 289-294.

Hassan, A.M., Abdel-Wahhab, M.A. (2006), Antioxidant effect of parsley and panax ginseng extract standardized with ginsenosides Rg3 against alteration induced in reproductive functions in male mice. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 22, 60-72.

Heidary, M., Nejadi, J.R., Delfan, B., Birjandi, M., Kaviani, H., et al. (2008), Effects of saffron on semen parameters of infertile men. *Urol J*, 5, 255-9.

Hwang, S.Y., Kim, W.J., Wee, J.J., Choi, J.S., Kim, S.K. (2004), Panax ginseng improves survival and sperm quality in guinea pigs exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzop-dioxin. *BJU international*, 94(4), 663-668.

Jones, R., Mann, T., Sherins, R.J. (1979), Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*, 31(5), 531-7.

Junqueira, L.C., Carneiro J. (2006), Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

Kalthur, G., Raj, S., Thiyagarajan, A., Kumar, S., Kumar, P., et al. (2011), Vitamin E supplementantation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freze-thaw-induced DNA damage. *Fertil Steril*, 95, 1149-51.

Karagöz, E. (2002), Özel Histoloji. Isparta: SDÜ Basımevi.

Karimi, J.H., Malekzadeh, S.S., Hoshmand, F. (2012), The effect of the Tribulus terrestris extract on spermatogenesis in the rat. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences*, 9(4), 9.

Kashani, H.H., Malekzadeh, S.S., Hoshmand, F. 2012), The effect of aqueous extract of Salep prepared from root-tubers of Dactylorhiza maculate (Orchidaceae) on the testes and sexual hormones of immature male mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(24), 4102-4106.

Kassem, A., Al-Aghbari, A., Al-Habor, M., Al-Mamary, M. (2006), Evaluation of the potential antifertility effect of fenugreek seeds in male and female rabbits. *Contraception*, 73(3), 301-306.

Keith, L., Moore, T.V.N., (2009), İnsan Gelişiminin Başlangıcı. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. (Ed) Dalçık H, Yıldırım M, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi

Kennedy, D.O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E. J., Milne, A. (2006), Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology*, 31(4), 845-852.

Khaki, A., Farzadi, L., Ahmadi, S., Ghadamkheir, E. (2011), Recovery of spermatogenesis by *Allium cepa* in *Toxoplasma gondii* infected rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(7), 903-907.

Khaki, A., Fathiazad, F., Nour, M., Khamenehi, H., Hamadeh, M. (2008), Evaluation of androgenic activity of *allium cepa* on spermatogenesis in the rat. *Folia Morphologica*, 68(1), 45-44.

Khaleghi, S., Bakhtiari, M., Sadmoloini, A., Esmaeili, F. (2017), *Tribulus terrestris* Extract improves human sperm parameters in vitro. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(3), 407-412.

Khani, B., Bidgoli, S.R., Moattar, F., Hassani, H. (2013), Effect of sesame on sperm quality of infertile men. *J Res Med Sci*, 18(3), 184-187.

Khayatnouri, M., Safavi, S.E., Safarmashaei, S., Babazadeh, D., Mikailpourardabili, B. (2011), The effect of Saffron Orally Administration on Spermatogenesis Index in Rat. *Advances in Environmental Biology*, 5(7), 1514-1521.

Kochhar, S.P. (2000), Sesame Oil- A Powerful antioxidant, *Lipid Technology Newsletter*, April, 35-39.

Kolahdooz, M., Nasri, S., Modarres, S.Z., Kianbakht, S., Huseini H.F. (2014), Effects of *Nigella Sativa* L. seed oil on abnormal semen quality in infertile men: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine*, 21, 901-905.



Kontogianni, V.G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., et al. (2013), Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136(1), 120-129.

Kumar, M., Sharma, M.K., Saxena, P.S., Kumar, A. (2003), Radioprotective effect of *Panax ginseng* on the phosphatases and lipid peroxidation level in testes of Swiss albino mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(3), 308-312.

Lamfon, H.A. (2012), Effect of fenugreek seed extract on carbendazim-inhibited spermatogenesis in albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(04), 09-13.

Latti, A.K., Riihinen, K.R., Jaakola, L. (2011), Phenolic compounds in berries and flowers of a natural hybrid between bilberry and lingonberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe). *Phytochemistry*, 72(8), 810-815.

Lenzi, A., Gandini, L., Picardo, M. (1998), A rationale for glutathione therapy. *Hum Reprod*, 13(6), 1419-22.

Lenzi, A., Sgro, P., Salacone, P., Paoli, D., Gilio, B., et al. (2004), A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril*, 81, 1578-84.

Lewin, A., Lavon, H. (1997), The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med*, 18, 213-9.

Lewis, S.E., Boyle, P.M., McKinney, K.A., Young, I.S., Thompson, W. (1995), Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril*, 64, 868-70.

Lu, Y.R., Foo, L.Y. (2001), Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75(2), 197-202.

MacLeod, J., Wang, Y. (1979), Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present, *Fertil Steril*, 31, 103-16.

Mavi, A., Terzi, Z., Ezgen, U., Yildirim, A. (2004), Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae). *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 702-705.

Meachem, S., von Schonfeldt, V., Schlatt, S. (2001), Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reproduction*, 121, 825-834.

Means, A.R., Fakunding, J.L., Huckins, C. (1976), Follicle stimulating hormone, Sertoli cell and spermatogenesis, *Res Prog Horm Res*, 32, 447-527.

Modaresi, M., Mesripour, M., Asadi, M.M.M., Hamedanian, M.K. (2008), Effect of Saffron (*Crocus Sativus*) extract on level of FSH, LH and testosterone in mice. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences and Health Services*, 16(63), 11-17.

Moein, M.R., Dehghani, V.O. (2007), Reactive Oxygen Species(ROS) Level in Seminal Plasma of Infertile Men And Healthy Donors. *Iranian J Reprod Med*, 5(2), 51-55.

Mohammad, M.A., Mohamad, M.M.J., Dradka, H. (2009), Effects of Black Seeds (*Nigella Sativa*) on Spermatogenesis and Fertility of Male Albino Rats. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(2), 386-390.

Monton, A., Gil, L., Malo, C., Olecieregvi, M., Gonzalez N. Sage (*Salvia officinalis*) and fennel (*Foeniculum vulgare*) improve cryopreserved boar epididymal semen quality study. *Cryo Letters*, 36(2), 83-90.

Moore, K.L., Persaudi T.V.N. (2002), İnsan Embriyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

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.

Mortimer D. (2000), Sperm preparation methods. *J Androl*, 21(3), 357-65.

Moubasher, A.E., El Din, A.M., Ali, M.E., El-sherif, W.T., Gaber, H.D. (2013), Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia*, 45, 135-9.

Nadjarzadeh, A., Shidfar, F., Amirjannati, N., Vafa, M., Motevalian, et al. (2014), Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. *Andrologia*, 182, 237-48.

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.

Nawar, W.W. (1996), Lipids. In: Food Chemistry. 3rd ed. Fennema O. R, (ed), New York: Marcel Dekker, s: 225-319.

Nouri, M., Khaki, A., Fathi, Azad F., Rashidi, M.R. (2009), The Protective Effects of Carrot Seed Extract on Spermatogenesis and Cauda Epididymal Sperm Reserves in Gentamicin Treated Rats. *Yakhteh Medical J*, 11(3), 327-33.

Ola-Mudathir, K.F., Suru, S.M., Fafunso, M.A., Obioha, U.E., Faremi, T.Y. (2008), Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3604-3611.

Oyeyem, M., Olukole, S., Esan, O. (2008), Sperm morphological studies of West African Dwarf Bucks treated with pumpkin plant (*Cucurbita pepo*). *Int J Morphol*, 26, 121-126.

Parandin, R., Yousofvand, N., Ghorbani, R. (2012), The enhancing effects of alcoholic extract of *Nigella Sativa* seed on fertility potential, plasma gonadotropins and testosterone in male rats. *Iran J Reprod Med*, 10(4), 355-362.

Park, J.S., Hwang, S.Y., Lee, W.S., Yu, K.W., Paek, K.Y. (2006), The therapeutic effect of tissue cultured root of wild *Panax ginseng* CA Meyer on spermatogenic disorder. *Archives of pharmacal research*, 29(9), 800-807.

Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. (2003). Prospects for spermatogenesis *in vitro*. *Theriogenology*, 259: 73-86.

Pasqualotto, F.F., Sharma, R.K., Kobayashi, H., Nelson, D.R., Thomas A.J. Jr. (2001), Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl*, 22, 316-22.

Plante, M., de Lamirande, E., Gagnon, C. (1994), Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril*, 62, 387-393.

Rayner, J.A., McLachlan, H.L., Forster, D.A., Cramer, R. (2009), Australian women's use of complementary and alternative medicines to enhance fertility: exploring the experiences of women and practitioners. *BMC Complement Altern Med*, 9, 52.

Ross, C., Morriss, A., Khairy, M., Khalaf, Y., Braude, P., et al. (2010), A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 20, 711-723.

Ross, M.H., Pawlina, W. (2010), *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th ed: Lippincott Williams & Wilkins/Sadler.

Rubio, J., Riqueros, M.I., Gasco, M., Yucra, S., Miranda, S. (2006), *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-damage on reproductive function in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), 1114-1122.

Sandhu, R.S., Wong, T.H., Kling, C.A., Chohan, K.R. (2014), In vitro effects of coital lubricants and synthetic and natural oils on sperm motility. *Fertility and Sterility*, 101(4), 941-944.

Sarma, A.D., Mallick, A.R., Ghosh, A.K. (2010), Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Int J Pharm Sci Res*, 1(3), 185-192.

Seçkin, İ. (2008), *Özel Histoloji Ders Kitabı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi

Shah, A., Al-Shareef, A.H., Ageel, A.M., Qureshi, S. (1998), Toxicity studies in mice of common spices, *Cinnamomum zeylanicum* bark and *Piper longum* fruits. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 52(3), 231- 239.

Shalaby, M., Mounair, S.M. (2010), Effect of *Zingiber officinale* Roots and Cinnamon *zeylanicum* Bark on Fertility of Male Diabetic Rats. *Global Vet*, 5(6), 341-347.

Shi, G.J., Zheng, J., Wu, J., Qiao, H.Q., Chang, Q., et al. (2017), Beneficial effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on spermatogenesis by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in streptozotocin-induced diabetic male mice. *Food Funct*, 8(3), 1215-1226.

Shittu, L.A., Bankole, M.A., Oguntola, J.A., Ajala, O., Shittu R.K., et al. (2007), Sesame leaves intake improve and increase epididymal spermatocytes reserve in adult male Sprague Dawley rat. *Sci Res*, 2, 319-324.

Sikka, S.C. (2004), Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*, 25, 1.

Sikka, S.C., Rajasekaran, M., Hellstorm, W.J. (1995), Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl*, 16, 464-8.

Silver, E.W., Eskenazi, B., Evenson, D.P., Block, G., Young, S., et al. (2005), Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl*, 26, 550-556.

Slama, R., Eustache, F., Ducot, B., Jensen, T.K., Jorgensen, N., et al. (2002), Time to pregnancy and semen parameters: across-sectional study among fertile couples from four European cities, *Hum Reprod*, 17, 503-15.

Sprando, R., Collins, T.F.X., Wiesenfeld, P., Babu, U.S., Rees, C. (2000), Testing the potential of flaxseed to affect spermatogenesis: morphometry. *Food and Chemical Toxicology*, 38(10), 887-892.

Sultana, S., Ahmed, S., Jahangir, T., Sharma, S. (2005), Inhibitory effect of celery seeds extract on chemically induced hepatocarcinogenesis: modulation of cell proliferation, metabolism and altered hepatic foci development. *Cancer Letters*, 221(1), 11-20.

Takenaka, M., Horiuchi, T., Yanagimachi, R. (2007), Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 14289-93.

Tarin, J.J., Brincs, J., Cano, A. (1998), Is antioxidant therapy a promising strategy to improve debate antioxidants may protect against infertility. *Hum Reprod*, 13(6), 1415-24.

Thakur, M., Thompson, D., Connellan, P., Deseo, M.A., Morris, C. (2011), Improvement of penile erection, sperm count and seminal fructose levels in vivo and nitric oxide release in vitro by ayurvedic herbs. *Andrologia*, 43(4), 273-7.

Verma, A., Kanwar, K.C. (1998), Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an in vitro analysis. *Andrologia*, 30, 325-9.

Verma, A., Kanwar, K.C. (1999), Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl*, 1, 151-154.

WHO (2010). World Health Organization Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus Intraction. 4th Ed. New York: Cambridge University Press.

Wittayarat, M., Ito, A., Kimura, T., Namula, Z., Luu, V.V., et al. (2013), Effects of green tea polyphenol on the quality of canine semen after long-term storage at 5 °C. *Reproductive Biology*, 13(3), 251-254.

Wright, C., Milne, S., Leeson, H. (2014), Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male fertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 28, 684-703.

Wu, X., Cao, G., Prior, R.L. (2002) Absorption and Metabolism of Anthocyanins in Elderly Women after Consumption of Elderberry or Blueberry. *The Journal of Nutrition, ProQuest Agriculture Journals*, 132(7), 1865-1871.

Yusuf, M.K., Ibegbu, A.O., Agbon, A.N., Evang A. (2017), Determination of Median Lethal Dose of Ethanolic Extract of *Sesamum indicum* seeds in adult Wistar Rats. *African Journal of Cellular Pathology*, 9, 73-76

Yu, L.L., Zhou, K.K., Parry, J. (2005), Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. *Food chemistry*, 91(4), 23-729.

Zheleva-Dimitrova, D., Obreshkova, D., Nedialkov, P. (2012), Antioxidant activity of Tribulus terrestris- natural product in infertility therapy. *Int J. Pharm Pharm Sci*, 4, 508-511.

Zini, A., Fischer, M.A., Nam, R.K., Jarvi, K. (2004), Use of alternative and hormonal therapies in male infertility. *Urology*, 63(1), 141-3.

Zini, A., San Gabriel, M., Baazeem, A. (2009), Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet*, 26, 427-32.

Zivkovic, J., Ristic, M., Kschonsek, J., Westphal, A., Mihailovic, M., et al. (2014), Comparison of chemical profile and antioxidant capacity of seeds and oils from *Salvia sclarea* and *officinalis*. *Chem Biodivers*, 14(12).

Zülfikaroğlu, G., Özgür, H., Polat, S. (2010), Kapasitasyonun moleküler temelleri, *Arşiv*, 19, 12.

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/sesamum-indicum> (03.06.2019)

<https://www2.palomar.edu/users/warmstrong/ecoph44.htm> (03.06.2019)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124081178000040> (03.06.2019)



## 9.EKLER

### BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

#### “GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR”

#### İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

**Araştırma Projesinin Adı:** Türkiye’de halk arasında yaygın olarak kullanılan adaçayı, susam ve yaban mersini bitkilerinin *in vitro* koşullarda sperm fonksiyonu parametrelerine etkisi

Sizi “Türkiye’de halk arasında yaygın olarak kullanılan adaçayı, susam ve yaban mersini bitkilerinin *in vitro* koşullarda sperm fonksiyonu parametrelerine etkisi” başlıklı bir araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Bu anket çalışmasına katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama hakkına sahiptir. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

**Sorumlu Araştırmacı:** CEMİLE YILMAZ

### **Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?**

Sizi davet ettiğimiz çalışmanın amacı halk arasında yaygın olarak kullanılan adaçayı, susam ve yaban mersini bitkilerinin, insan vücudu dışındaki koşullarda sperm hücrelerine pozitif ya da negatif bir etkisinin olup olmadığını incelemektir. Spermogram tahlili amacıyla vermiş olduğunuz semen örneği değerlendirildikten sonra kalan örneğiniz araştıma için kullanılacak ve sonrasında imha edilecektir. Örneğinizin değerlendirme sonrası kalan materyaliyle çalışılması planlandığı için sizin sağlık durumunuza ve spermogram analizinize herhangi bir negatif etkisinin olması öngörülmemektedir. Çalışmaya yaklaşık 40 kişinin katılması planlanmaktadır.

### **Bu çalışmaya katılmalı mıyım? (Bu bölüm aynen korunacaktır)**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, vermiş olduğunuz semen örneğinin analiziyle ilgili süreç rutin olarak devam edecek ve analiz sonucunuzu yine planlanan tarihte almış olabileceksiniz. Kısacası bu çalışmaya katılıp katılmamanız analiz sürecini pozitif ya da negatif herhangi bir şekilde etkilemeyecektir.

### **Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?**

Bu çalışmaya katılmanız halinde herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

### **Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak? (Bu bölüm aynen korunacaktır)**

Araştırma sorumlusu, kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde yalnızca bu araştırmada olmak üzere tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

### **Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?**

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Cemile YILMAZ

GÖREVİ : Araştırma sorumlusu

TELEFON : 05432449119

Medical Park Bahçelievler Hastanesi Tüp Bebek Bölümün’de Biyolog Cemile YILMAZ tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı

konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sorun ile karşılaştığımda; Bio. Cemile Yılmaz'ı 05432449119 nolu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:



**Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu**

26.04.2017

*Sayın:* Cemile Yılmaz

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda "Türkiye'de halk arasında yaygın olarak kullanılan adaçayı, susam ve yabamersini bitkilerinin in vitro koşullarda sperm fonksiyonu parametrelerine etkisi" isimli araştırmanın kurulumuzun 26/04/2017 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

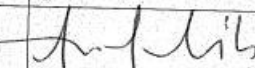

Etik Kurul Başkanı  
**Prof.Dr.Tülay İrez**



T.C.  
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Tarih:26.04.2017 Toplantı Sayısı:5	Karar No: 2017/5-3  Araştırmacı Cemile Yılmaz'ın planladığı "Türkiye'de halk arasında yaygın olarak kullanılan adaçayı, susam ve yabamersini bitkilerinin in vitro koşullarda sperm fonksiyonu parametrelerine etkisi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.
---------------------------------------	--

**ÜYELER**

Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Tülay İrez	Temel Tıp Bilimleri	Histoloji ve Embriyoloji	Etik kurul Başkanı	
Doç.Dr.Leman Şenturan	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof.Dr.Fatma Çelik	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik	üye	
Doç.Dr.Şölen Himmetoğlu	Tıp Fakültesi Temel Bilimler	Tıbbi Biyokimya	Raportör	
Yrd.Doç.Dr.Ayşe Tuğba Ceyhan Duman	Eğitim Fakültesi	Zihin Engelliler	üye	
Yrd.Doç.Dr.Belen Şirinoğlu Çapan	Diş Hekimliği Fakültesi	Pedodonti	üye	

## 10. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Cemile YILMAZ

**Doğum Tarihi ve Yeri :** 02.10.1985 - Biga

**Mail Adresi:** cemilekacar@mynet.com

**Unvanı:** Biyolog

**Öğrenim Durumu:** Lisans

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
3.09	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2007
	Çan İbrahim Bodur Anadolu Lisesi	2003

## ORJINALLIK RAPORU

%25

BENZERLİK ENDEKSİ

%24

İNTERNET  
KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%10

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%8
2	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%5
3	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
4	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
5	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
6	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1
7	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.kimyaders.com	