



T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**OLİGOASTENOTERATOZOOSPERMİLİ SUBFERTİL OLGULARDA
FİZİKSEL AKTİVİTE VE ANTİOKSİDAN GIDA DESTEĞİNİN SEMİNAL
ANTİOKSİDAN KAPASİTE, SPERM DNA FRAGMENTASYON İNDEKSİ
VE DNA KROMATİN NİTELİĞİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. MESUT ŞENGÜL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN - 2022



T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**OLİGOASTENOTERATOZOOSPERMİLİ SUBFERTİL OLGULARDA
FİZİKSEL AKTİVİTE VE ANTİOKSİDAN GIDA DESTEĞİNİN SEMİNAL
ANTİOKSİDAN KAPASİTE, SPERM DNA FRAGMENTASYON İNDEKSİ
VE DNA KROMATİN NİTELİĞİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Mesut ŞENGÜL
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ramazan AŞCI

SAMSUN - 2022

TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakóltesi Üroloji Anabilim Dalı Kliniđi'nde asistanlık eğitimim boyunca her alanda bilgi ve deneyimlerden yararlandığım, cerrahi disiplini ve sanatını öğrendiğim anabilim dalı öğretim üyelerinin tümüne, birlikte çalıőtım asistan arkadaşlarım başta olmak üzere, servis, poliklinik ve ameliyathane çalıőanlarına ve zorlu asistanlık sürecinde yanımda olan ve desteğini esirgemeyen eőtım Kübra GEYİK ŞENGÜL'e teőtekkür ederim.

Dr. Mesut ŞENGÜL

BEYAN

“Oligoastenoteratozoospermili subfertil olgularda fiziksel aktivite ve antioksidan gıda desteğinin seminal antioksidan kapasite, sperm DNA fragmantasyon indeksi ve DNA kromatin niteliği üzerine etkileri” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Mesut ŞENGÜL

ÖZET

OLİGOASTENOTERATOZOOSPERMİLİ SUBFERTİL OLGULARDA FİZİKSEL AKTİVİTE VE ANTIOKSİDAN GIDA DESTEĞİNİN SEMİNAL ANTIOKSİDAN KAPASİTE, SPERM DNA FRAGMENTASYON İNDEKSİ VE DNA KROMATİN NİTELİĞİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Amaç: Bilinen ve bilinmeyen birçok faktöre bağlı artmış reaktif oksijen türleri (ROS) spermatogenez ve sperm olgunlaşmasını etkileyerek erkek kısırlığına yol açmaktadır. Bu çalışmada idiyopatik subfertil olgularda egzersiz ve antioksidan gıda desteğinin seminal antioksidan kapasite, sperm DNA fragmentasyon indeksi, sperm kromatin niteliği ve sperm parametrelerine etkisi araştırılması amaçlanmıştır.

Olgular ve Yöntem: Çalışma, Mart-Kasım 2021 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde görülen idiyopatik oligoastenoteratozospemili subfertil erkekleri kapsadı. Tüm olgulara üç ay süreyle haftada 3-4 gün, en az 45 dakika (haftalık toplam en az 150 dk-600 MET) orta şiddette fiziksel aktivite önerildi. Toplam 48 olgu tam (basit) randomizasyon ile iki gruba ayrıldı. Birinci gruba (grup 1) günlük 2000 mg L-karnitin, 2000 mg fruktoz, 932 mg asetil L-karnitin, 225 mg vitamin C, 115 mg sitrik asit, 50 mg koenzim Q10, 14 mg çinko, 115 µg selenyum, 3750 µg vitamin B12, 500 µg folik asit içeren gıda desteği önerilirken, ikinci gruba (grup 2) antioksidan gıda desteği verilmedi. Tedavi öncesi ve sonrası semen analizi, hormonal değerlendirme, IPAQ anket formu ile fiziksel aktivite, Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ile seminal antioksidan kapasite, TUNEL yöntemi ile DNA fragmentasyon indeksi ve anilin mavisi boyaması ile sperm kromatin yapısı ölçüldü. İstatistiksel analiz Mann Whitney U ve Wilcoxon testler ile yapıldı

Bulgular: Grup1 ve 2' nin sırasıyla ortalama yaşları $33,54 \pm 3,6$ ve $32,8 \pm 6,8$, VKI $28,1 \pm 5,4$ ve $28,3 \pm 3,5$, 0. ay fiziksel aktivite değerleri $435,25 \pm 304,2$ ve $498,12 \pm 353,4$ 'dü. Değerler arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Tedavi sonrası grupların TAC değerleri arasında istatistiksel fark yoktu ($p = 0,972$). Antioksidan tedavi verilen olguların SDF indeksi ($p = 0,003$) ve histon/protamin oranı ($< 0,001$) önemli oranda azalırken, grup 2 deki azalma istatistiksel olarak önemli değildi.

Sonuç : İdiyopatik OAT'lı olgularda antioksidan tedavi DFİ ve histon/protamin oranlarında anlamlı iyileşmeler sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Egzersiz, antioksidan, idiopatik, infertilite, antioksidan kapasite, sperm DNA fragmantasyonu, histon, protamin

ABSTRACT

THE EFFECTS OF PHYSICAL ACTIVITY AND ANTIOXIDANT FOOD SUPPORT ON SEMINAL ANTIOXIDANT CAPACITY, SPERM DNA FRAGMENTATION INDEX AND DNA CHROMATIN QUALITY IN SUBFERTIL PATIENTS WITH OLIGOASTHENOZOOSPERMIA

Aim: Approximately 30% of the factors that cause male infertility are due to idiopathic causes. Increased reactive oxygen species (ROS) due to many known and unknown factors cause male infertility by affecting spermatogenesis and sperm maturation. In this study, the effects of physical activity and antioxidant food supplementation on seminal antioxidant capacity, sperm DNA fragmentation index, sperm chromatin quality and sperm parameters were investigated in infertile cases.

Material and Method: The study included subfertile men with idiopathic oligoasthenozoospermia seen at Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine between March 2021 and November 2021.

All subjects were recommended to do moderate physical activity for at least 45 minutes (at least 150 minutes-600 METs per week) 3-4 days a week for three months. A total of 48 cases were divided into two groups by computer-assisted (www.randomizer.org) complete (simple) randomization. In the first group (Group 1), 2000 mg L-carnitine, 2000 mg fructose, 932 mg acetyl L-carnitine, 225 mg vitamin C, 115 mg citric acid, 50 mg coenzyme Q10, 14 mg zinc, 115 µg selenium, 3750 µg Food supplement containing vitamin B12 and 500 µg folic acid was recommended as one sachet in the morning and evening, while antioxidant food supplement was not given to the second group (group 2). Before and after treatment, semen parameters, Hormone analyzes with ELISA method, physical activity evaluation with IPAQ questionnaire, seminal antioxidant capacity with Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) measurement method, DNA fragmentation index with TUNEL method. and sperm chromatin structure was evaluated by aniline blue staining.

Student's t test was used for the variables showing normal distribution in independent groups, and Mann Whitney U test was used for the variables that did not fit the normal distribution. Paired t test was used for the variables showing normal distribution in the

dependent groups, and Wilcoxon test was used for the variables that were found not to fit the normal distribution.

Results: The mean age of the groups, BMI and physical activity values there was no difference ($p>0.05$). There was no statistical difference between the TAC values of the post-treatment groups ($p=0.972$). While the SDF index ($p=0.003$) and histone/protamine ratio (<0.001) were significantly decreased in the subjects given antioxidant treatment, the decrease in group 2 was not statistically significant.

Conclusion: Antioxidant therapy provides significant improvements in DFI and histone/protamine ratios in patients with idiopathic OAT.

Keywords: Exercise, antioxidant, idiopathic, infertility, antioxidant capacity, sperm DNA fragmentation, histone, protamine

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
BEYAN.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VII
KISALTMA DİZİNİ.....	IX
TABLO DİZİNİ.....	X
ŞEKİL DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Erkek üreme fizyolojisi	4
2.2. İnfertilite tanım ve etyolojisi	7
2.3. İnfertil erkeğin değerlendirilmesi	9
2.3.1. Öykü.....	9
2.3.2. Fizik bakı.....	9
2.3.3. Semen analizi	9
2.3.4. Endokrin değerlendirme.....	11
2.3.5. İmmünolojik değerlendirme.....	12
2.3.6. Piyospermi ve semen kültürü	12
2.3.7. Radyolojik görüntüleme.....	12
2.3.8. Genetik testler	13
2.2.9. İleri semen değerlendirmeleri	13
2.4. İdiyopatik erkek infertilitesi	14
2.4.1. Genel Bilgiler	14
2.4.2. Serbest Oksijen radikalleri	15
2.4.3. İnsan ejakülatındaki ROS kaynakları.....	16
2.4.4. Diğer ROS kaynakları	18
2.4.5. Oksidatif stresin spermatozoa üzerindeki etkileri	19
2.4.6. İnsan semeninde oksidatif stres (OS) ölçümü	20
2.4.7. Semende antioksidan düzenekler	21
3. HASTALAR VE YÖNTEM.....	24
3.1. Çalışma tasarımı	24

3.2.	Hasta seçimi	25
3.3.	Antioksidan gıda desteği	26
3.4.	Semen analizi	26
3.5.	Hormon analizleri.....	26
3.6.	VKİ ve fiziksel aktivite ölçümü	26
3.8.	Seminal total antioksidan kapasite ölçümü	27
3.9.	Sperm DNA fragmantasyon indeksi (DFI) ölçümü	29
3.10.	Sperm Kromatin Yapısının Değerlendirilmesi / Protaminasyon Oranının Belirlenmesi.....	30
3.11.	İstatistiksel Analiz.....	31
4.	BULGULAR.....	32
4.1.	Demografik bulgular	32
4.2.	Semen parametreleri.....	33
4.3.	Hormon değerleri	33
4.4.	Total Antioksidan kapasite	34
4.5.	DFİ bulguları	35
4.6.	Sperm kromatin yapı bozuklukları	36
5.	TARTIŞMA.....	39
	<i>Limitasyonlar.....</i>	<i>42</i>
6.	SONUÇLAR.....	43
7.	KAYNAKLAR	44
8.	EKLER	52
	Ek 1. Uluslararası Fiziksel Aktivite Anketi Kısa formu (7 soru)	52
	Ek 2. Etik Kurul Onayı.....	54
	Ek 3. Tez İntihal Raporu	55
	Ek 4. Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur form	56

KISALTMA DİZİNİ

ASA	: Antisperm antikor
CAT	: Katalaz
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran regülatör
DFİ	: DNA fragmantasyon indeksi
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
EAU	: Avrupa Üroloji Derneği
ETZ	: Elektron transport zinciri
GPx	: Glutasyon peroksidaz
İEİ	: İdiyopatik erkek infertilitesi
LAC	: L-asetil karnitin
LC	: L-karnitin
LPO	: Lipit peroksidasyon
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OAT	: Oligoastenoteratozoospermi
OS	: Oksidatif stres
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
ROS	: Reaktif oksijen ürünü
SDF	: sperm DNA fragmantasyonu
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAC	: Total antioksidan kapasite
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP-çentik uç etiketleme
VKİ	: Vücut kitle indeksi

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Antioksidanların genel etkileri,	2
Tablo 2. Erkek infertilitesi nedenleri (EAU guidelines, 2021) [2]	8
Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü 2010 ve 2021 kılavuzuna göre semen analizi değerleri (WHO-2010 ve 2021)[17].....	10
Tablo 4. Semen analizi sonucu bulunan semen parametre bulgularının isimlendirmeleri	11
Tablo 5. Endokrin değerlendirme	12
Tablo 6. İdiopatik erkek infertilitesi için risk faktörleri.....	14
Tablo 7. Aktif oksijen türleri.....	15
Tablo 8. ROS'un fizyolojik etkileri	16
Tablo 9. İnsan ejakülatındaki ROS kaynakları	17
Tablo 10. Serbest oksijen radikallerinin spermatozoa üzerinde etkileri	19
Tablo 11. Sperm OS ölçüm yöntemleri.....	20
Tablo 12. Antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler.....	20
Tablo 13. Seminal antioksidanlar.....	21
Tablo 14: Çalışma tasarımı	25
Tablo 15. Fiziksel aktivite ortalama MET değerleri	27
Tablo 16. Trolex standartlarının kayıtlanması	28
Tablo 17. Olguların yaş, testis volümü, fiziksel aktivite değerleri	32
Tablo 18. Grupların başlangıç ve üçüncü aydaki VKİ ve fiziksel aktivite değerleri ..	32
Tablo 19. Grup 1 ve 2’de semen parametre değişimleri	33
Tablo 20. Grup 1 ve 2’de hormonal değerlendirme.....	33
Tablo 21. Grup 1 ve 2’de total antioksidan kapasite değerleri	34
Tablo 22. Gruplar arası total antioksidan kapasite karşılaştırması	34
Tablo 23. Grup 1 ve 2’nin DFİ değerleri	35
Tablo 24. Gruplar arası DFİ değerleri karşılaştırması	36
Tablo 25. Grup 1 ve 2’de sperm kromatin yapısındaki değişiklikler.....	37
Tablo 26. Grupların sperm kromatin yapısındaki değişikliklerin karşılaştırılması....	37

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Oksidatif stresin kaynakları	2
Şekil 2. Erkek hipotalamo-hipofizer-gonadal aks (GnRH; gonadotropin serbestleştirici hormon, FSH; folikül uyarıcı hormon; LH; Luteinize edici hormon) .	5
Şekil 3. Spermatogenez.....	6
Şekil 4. Erkek üreme potansiyelini etkileyen durumlar	14
Şekil 5: İnsan spermatozoasında ROS artış nedenleri.....	18
Şekil 6. Plate Set Up (A-G: standartlar, S1-S41: örnekler).....	28
Şekil 7. TUNEL analiz ekim işlemi	29
Şekil 8. 22.02.2022 (a) ve 23.02.2022 (b) TAC çalışma kuyucukları	35
Şekil 9. DNA fragmantasyonu az (A) ve fazla (B) olan örneklerin DAPI (a,c) ve FITC (b,d) görüntüsü	36
Şekil 10. Kontrol (A) ve OAT (B) grubuna ait spermelerin anilin mavisi boyaması görüntüsü (A'da anilin negatif ve B'de anilin pozitif boyanan spermeler gösterildi)	38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, cinsel aktif bir çiftin bir yıl süreyle korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememe durumu olarak tanımlanmaktadır [1, 2]. İnfertilitenin dünya genelinde çiftlerin %8-15'ini etkilediği tahmin edilmektedir. Erkek faktörünün bu sorunun yaklaşık %50'sinden sorumlu olduğu görülmektedir [3]. Eşi normal olmasına karşın, normal yoldan, korunmasız ve yeterli sıklıkta cinsel ilişkiye rağmen bir yıl içinde çocuk sahibi olamayan erkeklerde kısırlıktan söz edilir.

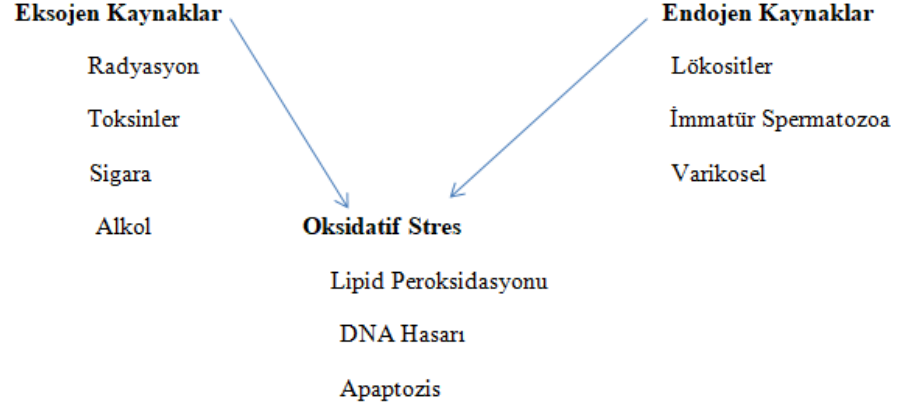
Erkek infertilitesine pre-testiküler (endokrin), testiküler ve post-testiküler nedenler yol açar. İdiyopatik erkek infertilitesi (İEİ) ise olgularda hiçbir nedenin ortaya konulmadığı, kadın faktörünün olmadığı, bilinmeyen etiyojolojiye bağlı semen anormalliklerinin varlığı ile karakterizedir. Prevalansı %30-58 arasında değişmektedir [4].

İdiyopatik erkek infertilitesi genetik, çevresel ve hormonal faktörlere bağlı gelişebilir. Yapılan birçok araştırmaya rağmen tanısı ve yönetilmesi zor bir durum olmaya devam etmektedir. Artan kanıtlar, oksidatif stresin (OS) erkek kısırlığının etiyojisinde bağımsız rol oynadığını ve infertil erkeklerin %30-80'inde yüksek seminal reaktif oksijen tür (ROS) seviyeleri bulunduğunu göstermektedir [5-9]. İdiyopatik infertil erkeklerde fertilite için gerekli olan ROS ile antioksidanlar arasındaki dengenin ROS lehine bozulması sonucunda oksidatif stresin arttığı düşünülmektedir.

Reaktif oksijen türleri olarak bilinen süperoksid, hidrojen peroksit, nitrik oksit gibi maddeler hücrelerde oksidasyon reaksiyonlarında doğal olarak oluşan ürünlerdir. Lökositler ve olgunlaşmamış spermatozoalar seminal ROS'un ana kaynağıdır. Radikaller hücre içi ve dışında bulunan enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan moleküler sistem ile dengelenmeye çalışılır. Bu dengenin reaktif okijen türevleri yönünde artması veya antioksidan özellikteki moleküllerin azalması ile hücrel protein, lipid ve DNA yapılarında hasar oluşturmaktadır.

Spermatogenez, sperm matürasyonu, sinyal iletimi, motilite, sperm aktivasyonu, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi döllenmeden önceki çeşitli sperm fonksiyonları ve normal hücrel fizyolojik fonksiyonlar için bir miktar ROS gereklidir. Sigara, yetersiz beslenme, aşırı alkol tüketimi gibi olumsuz yaşam biçimi faktörleri; kimyasal madde ve ağır metal maruziyeti gibi çevresel faktörler; varikosel,

inmemiş testis ve orşit gibi testiküler nedenler ROS artışına neden olabilmektedir [10-12] (Şekil 1).



Şekil 1. Oksidatif stresin kaynakları

ROS seviyeleri patolojik düzeye yükseldiğinde, vücut sistemi dengeyi sağlayabilmek için diyetle alınan ve endojen olarak üretilen antioksidanları kullanır. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, C ve E vitaminleri, ferritin ve karnitinler, koenzim Q10, transferrin, çinko, selenyum, N-asetil L-sistein, L-arginin ve folik asit başlıca antoksidan moleküllerdir [6, 9, 13]. Bu antioksidan moleküllerin erkek fertilitesi üzerine başlıca etkileri tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 1: Antioksidanların genel etkileri,

Spermatozoayı ROS üreten anormal spermatozoalardan korur
Lökositlerin ürettiği ROS’u temizler
DNA kırılmalarını önler
Sigara içenlerde semen kalitesini arttırır
Soğğun spermatozoaya olan etkisini azaltır
Erken sperm olgunlaşmasını engeller
Spermatozoayı destekleyerek yardımla üreme tekniklerinin başarısını arttırır

Artmış ROS, sperm plazma membranındaki doymamış yağ asitlerine yüksek afinite ile bağlanarak membran lipid peroksidasyonuna, mitokondrial ve sperm DNA hasarına neden olmaktadır. Füzyon ve akrozom reaksiyonlarında bozukluk oluşturarak sperm fertilitite potansiyelini azaltmaktadır [5, 14].

Klinikte OS'yi ölçmek için tercih edilecek yöntemler veya bu durumu tanımlamak için tanı terminolojisi hakkında henüz bir fikir birliğine varılamamıştır. Bu nedenle, daha önce idiyopatik erkek kısırlığı olarak sınıflandırılan anormal semen özelliklerine ve OS'ye sahip infertil erkekler için Erkek Oksidatif Stres Kısırlığı tanımı önerilmiştir [15, 16].

Erkek kısırlığının tanı ve tedavisindeki önemli gelişmelere rağmen, idiyopatik erkek kısırlığı için kanıta dayalı tedavi kılavuzları mevcut değildir. Klinisyenler idiyopatik infertil erkekler için antioksidanları ampirik tedavi olarak kullanmaktadır. Birçok çalışmada antioksidan tedavi ile sperm parametrelerinde iyileşme olduğu rapor edilmiştir [17, 18]. Ayrıca antioksidan tedavi ve yaşam biçimi değişiklikleri geleneksel semen parametrelerinin yanısıra seminal antioksidan kapasitede artış ve sperm DNA fragmentasyon (SDF) oranında azalma sağlayabilmektedir [19, 20].

Antioksidan tedavinin seminal antioksidan kapasiteyi artırdığını ve sperm DNA fragmentasyonunu azalttığını gösteren çalışma sayısı sınırlıdır. Dolayısıyla antioksidan tedavinin kanıta dayalı etkinliğini araştıran daha çok çalışmaya gereksinim vardır.

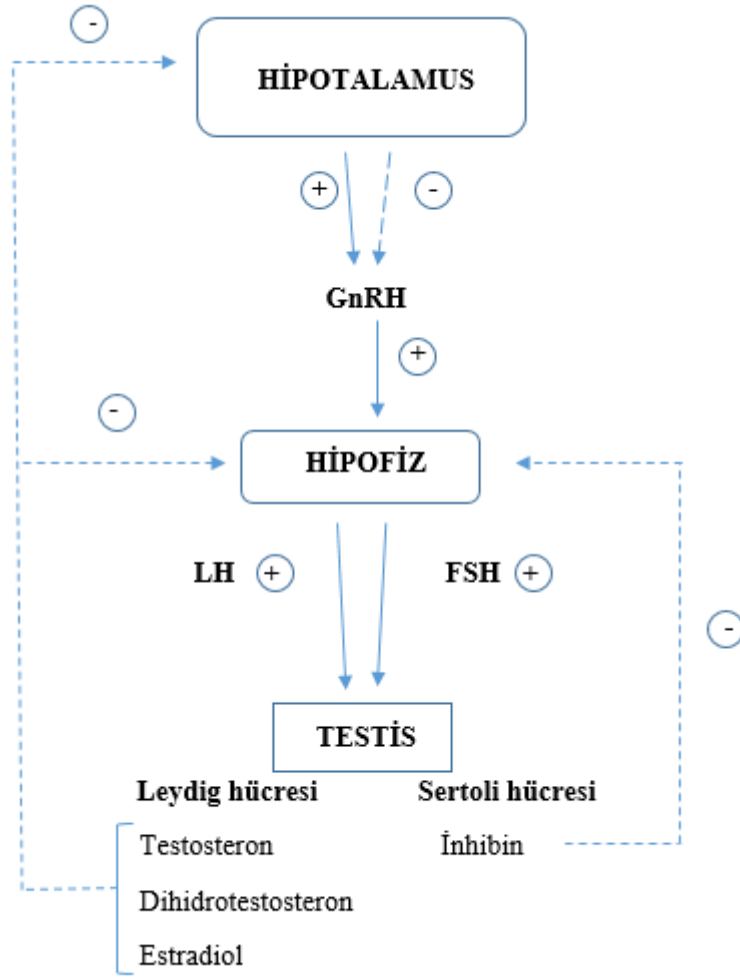
Bu prospektif randomize tek kör çalışmada idiyopatik OAT'lı subfertil erkeklerde yaşam biçimi değişikliği ve antioksidan gıda desteğinin etkinliği konvansiyonel semen parametreleri, seminal antioksidan kapasite ve sperm DNA fragmentasyon indeksi, sperm DNA protaminasyon ölçümleri ile araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek üreme fizyolojisi

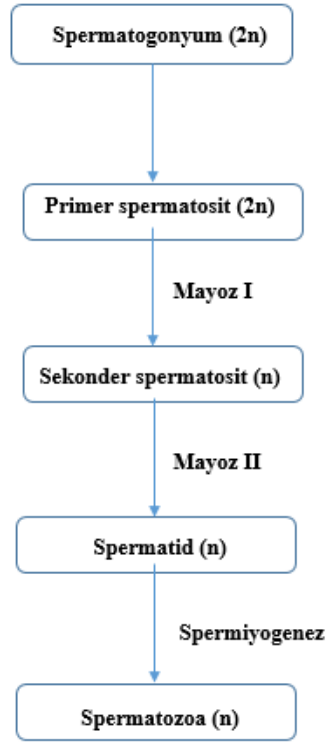
Erkek üreme sistemi skrotum içinde asılı bulunan iki adet testis, epididimis, genital kanallar, yardımcı üreme bezleri ve penisten oluşur. Yardımcı üreme bezleri seminal veziküller, prostat ve bulbouretral bezleri (Cowper bezleri) kapsamaktadır.

Spermatogenezin hormonal kontrolü hipotalamohipofizer gonadal aks tarafından sağlanır (Şekil 2) Hipotalamustan salgılanan GnRH, ön hipofizden FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını sağlar. FSH, testisteki sertoli hücrelerini uyararak spermatogenezini indükler. LH, Leydig hücrelerinde testosteron sentezlenmesini ve spermatogenezin sürekliliğini ve kalitesini sağlar. Ön hipofizden salgılanan prolaktin, LH'nin Leydig hücreleri üzerindeki etkisini artırır. Erkeklerde testosteronun aromataz enzimi ile estradiole dönüşür. Estradiol, LH sentezini hipofiz üzerinden kontrol eder. Spermatogenezin olgun spermatid aşamasına geldiğinde Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin, FSH salınımını negatif feedbackle engeller.



Şekil 2. Erkeklerde hipotalamo-hipofizer-gonadal aks (GnRH; gonadotropin serbestleştirici hormon, FSH; folikül uyarıcı hormon; LH; Luteinize edici hormon)

Spermatogenez insanda ortalama 64 gün süren oldukça kompleks bir süreçtir. Amitotik amplifikasyon fazı, mayotik faz, spermiyogenez (post-mayotik faz) olmak üzere üç fazdan oluşmaktadır. Diploid spermatogonial kök hücreler kendilerini yenileme ve farklılaşma yetenekleri sayesinde sonuçta haploid yapıda spermatozoa hücresine dönüşürler (Şekil 3).



Şekil 3. Spermatogenez

Spermatozoalar döllenme yetenekleri için gerekli olan ileri hızlı motilite, morfoloji ve fertilité olgunlaşmasını epididimal geçiş sırasında tamamlar. Olgunlaşmış spermiler epididim kuyruğunda ve vaz deferensin proksimal kıvrımlı kısmında depolanır. İnsanda epididimal sperm olgunlaşması için ortalama 2-3 gün gereklidir. Yedi güne kadar epididimde kalan spermatozoaların fertilité ve motilite özellikleri değişmez.

Vaz deferensler spermatozoayı epididimden üretraya iletme görevini yapar. Dışta ve içte longutinal, ortada siküler kas yapısından oluşmuştur. Ejakulasyon sırasında adrenerjik uyarımla epididimal içeriği vaz deferenslerin ampullasına ve oradan ejakulator kanallar ile prostatik üretraya dökülmesini sağlar. Seminal kese salgıları da epididimal içeriği takiben üretraya dökülür.

Epididim, duktus (vaz) deferens ve ampullası, seminal keseler ve prostatın salgılarından oluşan semenin, posterior uretraya dökülmesine ve birikmesine emisyon denir. Emisyonun iskiokavernöz, bulbospongiöz ve diğer perineal çizgili kasların ritmik kasılmaları ile üretral meatustan dışarıya atılmasına ejeksiyon denir. Bu süreçte hem somatomotor hem de otonom sinir sistemi sinerjistik katkı sağlamaktadır.

Ejakulatın %60-65'ini seminal keseler, %25-30'unu prostat ve %5-10'unu epididimal içerik oluşturur.

Döllenme, spermin oosite ulaşmasıyla başlayan çok aşamalı bir süreçtir. Kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu, spermin zona pellucida'ya (ZP) bağlanması ve penetrasyonu, spermin oosit plazma zarı ile füzyonu ve oosit aktivasyonundan oluşur [21]. Spermatozoalar kadın genital sisteminde 72 saate kadar canlı kalabilmektedir, ancak fertilizasyon için ilk 24 saatte daha etkindirler. Ovulasyon ile atılan Oosit II ise ancak 18-24 saat canlı kalabilir. Dolayısı ile fertilizasyon için ilişki zamanlaması önemlidir. Döllenme tuba uterin ampullasında oluşur ve döllenmiş Oosit II metafazını tamamlayarak mitoz ile bölünür yaklaşık üç günün sonunda ve tubalar aracılığı ile endometriuma ulaşarak implante olur.

2.2. İnfertilite tanımı ve etyolojisi

İnfertilite, cinsel aktif ve kontrasepsiyon uygulamayan bir çiftin bir yıl içerisinde gebelik elde edememesidir [3]. Çiftleri yaklaşık %15'i bir yıl içerisinde gebelik geliştirememekte ve infertilite için tedavi arayışına girmektedir [22]. Çoğu infertil çiftte erkek ve kadına ait faktörler bir arada saptanır. İnfertil çiftlerin %50'sinde sorun erkeklerde dir. Bir erkek için kısırlık tanımı normal bir kadın eş ile normal yoldan (vajinal), normal sıklıkta (haftada 2-4 kez) ve korunmasız ilişkiye rağmen bir yıl içinde eşinde gebelik oluşturamaması şeklinde tanımlanır [23-26]. Bir erkek ilk çocuğundan sonra ikinci çocuğunu yapamıyor ise sekonder infertiliteden söz edilir. Kadın eş ve erkeğin normal olmasına rağmen bebek sahibi olunamamasına açıklanamayan infertilite denir. Sperm DNA hasarı ve antisperm antikorları açıklanamayan infertil çiftlerde erkek faktörler olarak öne çıkmaktadır [27]. İdiyopatik erkek infertilitesi ise infertiliteye neden olabilecek herhangi bir hastalık veya hormonal bozukluk saptanamamasına rağmen, semen parametrelerinde bozukluklar bulunması ile tanımlanır.

Erkek kısırlığının edinsel-konjenital ürogenital anomaliler, maligniteler, ürogenital sistem enfeksiyonu, yüksek skrotal sıcaklık, endokrin bozukluklar, immunolojik faktörler, genetik, yaşam biçimi, tıbbi hastalıklar, çevresel faktörler ve ilaçlar gibi birçok nedeni vardır (Tablo 2).

Tablo 2. Erkek infertilitesi nedenleri (EAU guidelines, 2021) [2]

Tanımlar	Hasta (%)
Sık görülen nedenler	42,6
- İnmemiş testis	8,4
- Varikosel	14,8
- Antisperm antikorlar	3,9
- Testis tümörü	1,2
- Diğerleri	5,0
İdiyopatik infertilite	30,0
Hipogonadizm	10,1
- Klinefelter sendromu (47, XXY)	2,6
- XX erkek	0,1
- Primer hipogonadizm	2,3
- Sekonder hipogonadizm	1,6
- Kallman sendromu	0,3
- İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm	0,4
- Hipofiz cerrahisi sonrasında rezidü	<0,1
- Diğerleri	0,8
- Geç başlangıçlı hipogonadizm	2,2
- Yapısal puberte gecikmesi	1,4
Sistemik hastalıklar	2,2
Malign hastalıklar	7,8
- Testis tümörü	5
- Lenfoma	1,5
- Lösemi	0,7
- Sarkom	0,6
Ereksiyon/ejakülasyon bozuklukları	2,4
Obstrüksiyon	2,2
Vazektomi	0,9
Kistik fibrozis	0,5
Diğerleri	0,8

2.3. İnfertil erkeğin değerlendirilmesi

İlk değerlendirme öykü, fizik muayene semen analizi ve gerektiğinde hormonal inceleme ile yapılır.

2.3.1. Öykü

Öykü alırken erkeklerin normal üreme fizyolojisi ve spermin kadın genital sistemine ulaşması, döllenme ve embriyo gelişimi bir bütün halinde düşünülerek sorgulama yapılır [28]. Hastada üreme öyküsü alınırken koitus sıklığı ve zamanlaması, önceki/sonraki eşinden çocuğunun olup olmaması, çocuğu olmamışsa süresi, adölesan yaşı, çocuklukta geçirilen hastalıklar, mevcut sistemik hastalıklar, travma ve önceki cerrahiler, ilaçlar ve alerji, cinsel yaşam öyküsü (libido, ereksiyon ve ejakulasyon ile cinsel yolla bulaşan hastalıklar) ayrıntılı sorgulanmalıdır.

2.3.2. Fizik bakı

Fizik bakı genital muayeneyi de kapsamalıdır. Genel fizik bakı ile olgunun vücut kitle oranı, iskelet yapısı, sekonder seks karakterlerinin gelişme durumu, jinekomasti varlığı, testislerin lokalizasyonu, epididim, vaz deferens, varikosel, penis, prostat ve seminal veziküller bir bütün halinde değerlendirilir. Gerdirilmiş penis boyu ve uretral meatusun yerinin olup olmadığı, testislerin volümleri orşidometri ile ölçülerek not edilir.

Skrotal muayenede vaz deferens ve epididimler palpe edilir ve varikosel varlığı değerlendirilir. Gerdirilmiş penis boyu ölçülür, epispadiyas ve hipospadiyas değerlendirilir. Nörolojik hastalığı ve cinsel işlev bozukluğu olanlarda parmakla rektal tuşe ile birlikte nörolojik bakı yapılmalıdır.

2.3.3. Semen analizi

Fertilite değerlendirilmesinde öykü ve fizik muayeneden sonra yapılacak ilk inceleme semen analizidir. DSÖ 2021 yılında yeni kılavuz yayımlamasına rağmen, son 10 yılda tüm dünyada 2010 yılında yayınladığı kılavuza göre semen analizleri yapılmıştır. DSÖ 2010 ve 2021 kılavuzlarına göre semen analizi alt limit değerleri tablo 2'de gösterilmiştir. Semen analizi değerlendirilirken değerler normal ise yeni semen analizi gerekmemektedir. Anormal değerler saptanırsa bir ay ara ile en az iki analiz yapılmalıdır. Farklı zamanlarda yapılan semen analizlerinde sperm konsantrasyonu, morfolojisi, ileri sperm motilitesi oranlarında değişkenlikler görülebilmektedir [29].

Semen analizi genital ve testiküler işlevlerin belirlenmesinde özellikle azospermi, astenozospermi, nekrospermi, globozospermi gibi patolojik durumların varlığında değer taşıırken, tüm parametrelerin normal sınırlarda olduğu infertil erkeklerde (açıklanamayan infertilitede) tanı ve tedavi kararını vermede yetersiz kalmaktadır [30]. Rutin semen analizi sperm fertilizasyon potansiyelini ölçemez [31]. Geleneksel semen analizi sperm DNA fragmantasyonu ve DNA hasarı gibi patolojileri değerlendiremez [21].

Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü 2010 ve 2021 kılavuzuna göre semen analizi değerleri (WHO-2010 ve 2021)[17]

Parametreler	2010 Kılavuzuna Göre Alt Limit değerleri	2021 Kılavuzuna Göre Alt Limit değerleri
Volüm (ml)	1.5 (1,4-1,7)	1,4 (1,3-1,5)
Total sperm sayısı (10 ⁶)	39 (33-46)	39 (35-40)
Sperm sayısı (10 ⁶ /ml))	15 (12-16)	16 (15-18)
Total motilite (hızlı ileri + yerinde motil sperm sayısı, %)	40 (38-42)	42 (40-43)
İleri motil sperm sayısı (%)	32 (31-34)	30 (29-31)
İmmotil sperm (%)		20
Vitalite (%)	58 (55-63)	54 (50-56)
Morfoloji (normal %)	4 (3-4)	4 (3,9-4)
Ph	≥ 7,2	≥7,2
Yuvarlak hücre (10 ⁶)	5	5
Peroksidaz (+) lökosit (10 ⁶ /ml)	<1	<1

DSÖ kılavuzlarında semen parametre bozuklukları tanımlanmıştır (Tablo 4). Bunlar; sperm sayısında azalma (oligospermi), sperm motilitesinde azalma (astenozospermi) ve

anormal şekilli sperm (teratospermi) formlarıdır. Bu sperm anormallikleri genelde birlikte görülür ve oligo-asteno-teratospermi (OAT) sendromu olarak adlandırılır [32].

Tablo 4. Semen analizi sonucu bulunan semen parametre bulgularının isimlendirmeleri

Normozoospermi	Sperm sayısının, motilitesinin ve morfolojisinin normal olması
Oligozoospermi	Sperm sayısının normal değerlerden düşük olması
Astenozoospermi	Sperm motilitesinin normal değerlerden düşük olması
Teratozoospermi	Normal morfolojiye sahip sperm oranının normal değerlerden düşük olması
Oligoastenoteratozoospermi	Sperm sayı, motilite ve morfolojisinin normal değerlerden düşük olması
Şiddetli oligoastenoteratozoospermi	Sperm sayısının <5 milyon/mL'den düşük olması aynı zamanda sperm motlitesinin ve morfolojisinin düşük olması

2.3.4. Endokrin değerlendirme

Endokrin değerlendirmede FSH, LH, estradiol, prolaktin ve testosteron ilk istenecek hormonlardır [33]. Normal semen analizi değerleri olan erkeklerde düşük LH ve yüksek FSH düzeylerinin klinik önemi yoktur. Ölçümler sabah saat 7-11 arasında alınan periferik kan örneğinde yapılmalıdır [34]. FSH spermatogenezin, T ise Leydig hücre işlevinin göstermektedir. Testosteron değerlerinde anormallik saptandığında, hormonal değerlendirme tekrar edilmelidir [25].

Testiküler yetmezlik düşünülen hastalar primer/sekonder yetmezlik açısından değerlendirilir. Primer testiküler yetmezliği olanlarda yüksek gonadotropin değerleri tespit edilir [35] (Tablo 5).

Tablo 5. Endokrin değerlendirme

Durum	TT	FSH	LH	PRL
Normal	N	N	N	N
Primer testiküler yetmezlik (hipergonadotropik hipogonadizm)	Düşük	Yüksek	N/Yüksek	N
Sekonder testiküler yetmezlik (hipogonadotropik hipogonadizm)	Düşük	Düşük	Düşük	N
Hiperprolaktinoma	Düşük	Düşük/N	Düşük	Yüksek
Androjen rezistansı	Yüksek	Yüksek	Yüksek	N

2.3.5. İmmünolojik değerlendirme

Antisperm antikorlar sperm motilitesini bozar, sperm servikal mukus penetrasyonunu azaltır, sperm kapasitasyonunu bozarak fertilizasyonu engelleyebilir [36]. Antisperm antikor (ASA) semen analizinde sperm motilitesinin %30'un altında olması, sperm aglutinasyonu ve piyospermi varlığı, vazal agenezisi ve açıklanamayan infertilite durumlarında araştırılır [37].

Kan-testis bariyerinin bozulması, enfeksiyonlar, orşit, kanal obstrüksiyonu, testiküler travma, spermatik kord torsiyonu ve varikosel antisperm antikor (ASA) gelişimine neden olabilir [38, 39].

2.3.6. Piyospermi ve semen kültürü

Semen kültüründe bakteri üremesi genital sistem enfeksiyonu olarak değerlendirilerek uygun tedavi uygulanmalıdır [40]. İnfertite değerlendirilmesinde semptomatik genitoüriner enfeksiyon ve piyospermi saptanmadığında rutin semen kültürü alınmasına gerek yoktur [41]. Piyospermi seminal sıvıdaki ROS'un önemli kaynaklarından birisidir.

2.3.7. Radyolojik görüntüleme

İnfertil erkeğin ilk değerlendirmesinde radyolojik görüntülemeler rutin kullanılmamaktadır.

Ejakulator kanal obstrüksiyonu düşünülen azospermik olgularda ejakulator kanal çapını, seminal keselerin genişliğini ve prostat kistlerini tanımlamak için TRUS uygulanır [42]. Skrotal ultrasonografi öykü, fizik inceleme ve hormonal değerlerinde

testiküler tümör şüphesi olan olgularda en yararlı görüntüleme yöntemidir [43]. Varikozel tanısını güçleştiren skrotal duvar kalınlığı, kramasterik spazm, testiküler hipersensitivite ve kord lipomu gibi durumlarda skrotal Doppler ultrasonografi gerekebilir [44]. Palpe edilemeyen bir vaz deferensi olan infertil erkeklerde renal agenezisi araştırmak için abdominal ultrasonografi kullanılabilir [45].

2.3.8. Genetik testler

Şiddetli oligospermi saptanan (<5 veya 10 milyon/ml) ve ÜYT endikasyonu olan veya non-obstrüktif azospermili olgularda karyotip ve Y kromozom mikrolelesyon araştırılmalıdır [46-48]. Palpe edilemeyen vaz deferensi olan erkeklerde ve kadın eşlerinde kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) gen mutasyonu araştırılmalıdır [49]. Eşlerin ikisinde de pozitiflik saptanırsa genetik danışma verilmelidir [50].

2.2.9. İleri semen değerlendirmeleri

Reaktif oksijen türleri (ROS)

Seminal sıvıda düşük miktarlarda bulunan ROS'lar fertilizasyon için gerekli iken, yüksek düzeylerde sperm kromatin ve membran hasarı oluşturarak infertiliteye yol açabilir. Kılavuzlarda infertil erkeğin değerlendirilmesinde seminal ROS düzeylerinin rutin ölçümleri önerilmemektedir [6].

Sperm DNA hasarı ölçümü

Sperm DNA hasarı multifaktöryeldir. Spermatogenez sırasında protamin eksikliği veya mutasyonuna bağlı olarak DNA'nın paketlenmesinde bozukluklar oluşabilir. Oksidatif stres artışı, tütün, kemoterapi, testis tümörü ve sistemik kanserler de sperm DNA hasarı yapabilir [51].

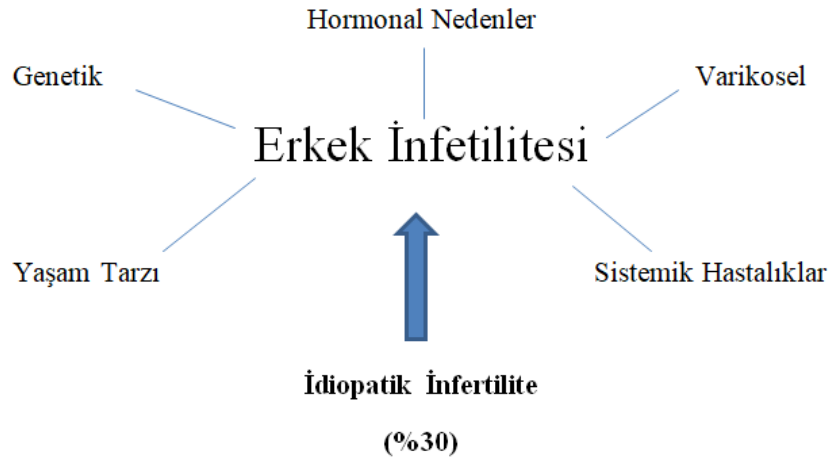
Klinikte sperm DNA fragmentasyon ölçümü için 2022 yılında bir kılavuz geliştirilmiştir [52]. Buna göre açıklanamayan veya idiyopatik erkek infertilitesi, tekrarlayan gebelik kaybı, klinik varikozel, yaşam biçimi risk faktörleri, ART-IUI, IVF, ICSI başarısızlığından önce veya sonra sperm DNA fragmentasyon indeksine bakılması önerilmektedir [52].

Sperm DNA hasar ölçümü çiftlerin yaşam biçimi değişikliklerine ve hangi tip fertilitte tedavisine karar vermelerine yardım edebilir [53].

2.4. İdiyopatik erkek infertilitesi

2.4.1. Genel Bilgiler

İnfertil erkeklerin %30'unda (Şekil 4) anormal semen bulgularını açıklayacak bir neden bulunamaz [3]. İdiyopatik erkek infertilitesi (İEİ) olarak adlandırılan bu grupta infertiliteye neden olabilecek herhangi bir hastalık öyküsü veya hormonal bozukluk olmamasına rağmen, semen analizlerinde bozukluklar bulunmaktadır [54].



Şekil 4. Erkek üreme potansiyelini etkileyen durumlar

İdiyopatik erkek infertilitesinin etiyolojisinde kronik stres, çevresel kirlenmeye bağlı endokrin bozukluklar, oksidatif stres ve henüz testler ile ortaya konulamayan genetik bozukluklar rol oynar (Tablo 6). Her ne kadar moleküler mekanizması açık olarak tanımlanmamış olsa da idiyopatik infertilitenin en önemli nedeninin oksidatif stres olduğu düşünülmektedir [55].

Tablo 6. İdiyopatik erkek infertilitesi için risk faktörleri

Sigara
Alkol
Bağımlılık Yapıcı Maddeler
Obezite
Psikolojik stres
İleri baba yaşı
Diyet Faktörleri
Toksinlere çevresel veya mesleki maruziyet

İdiopatik erkek infertilitesinin etyolojisinde reaktif oksijen radikalleri (ROS) ve oluşturduğu oksidatif stres önemli rol oynar.

2.4.2. Serbest Oksijen radikalleri

Serbest radikal, dış moleküler yörüngesinde bir veya daha çok sayıda eşlenmemiş elektron bulunan atom ya da moleküllerdir. Aerobik metabolizmanın kısa ömürlü toksik yan ürünleridir. Reaktif olmaları nedeniyle tepkimelerde oksidan ve redüktan olarak görev yaparlar. Kovalen bağın molekülün her bir parçasında eşleşmiş elektronlardan bir tanesi kalacak şekilde (homolitik) bölünmesiyle, tek bir elektron kaybıyla veya tek bir elektron eklenmesiyle oluşabilirler. Bu moleküller oksijen içeriyorsa reaktif oksijen türleri olarak adlandırılır (O_2^- , OH , H_2O_2). Süperoksit anyonları (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH) iyonları ile nitrik oksit (NO) en iyi bilinen ROS'lardır [56-58]. Oksijen ve nitrojen içeren NO, $ONOO^-$ gibi reaktif yapılar ise reaktif nitrojen oksijen türleri (RNOS) olarak isimlendirilir. ROS ve RNOS molekülleri, aktif oksijen türleri olarak bilinir (Tablo 7).

Tablo 7. Aktif oksijen türleri

Reaktif oksijen türleri (ROS)
Süperoksit anyonu (O_2^-)
Hidroksil (OH)
Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Reaktif nitrojen oksijen türleri (RNOS)
Nitrik oksit (NO)
Peroksinitrit ($ONOO^-$)

Canlılarda en önemli serbest radikaller süperoksit ve hidroksiperoksittir. Bu radikaller hücrede oluştuğunda bunları hızlıca etkisiz hale getiren güçlü savunma sistemleri devreye girmektedir. Bu radikaller hücre içinde dengelendiği sürece hücre fonksiyonlarda herhangi bir hasara neden olmaz. Homeostatik redoksa duyarlı hücre sinyal basamakları ve hücre fonksiyonlar, fizyolojik oksidan seviyeleri ile modüle

edilir. Antioksidan savunma mekanizmaları zayıfladığında ROS miktarı göreceli olarak artar ve zararlı etkileri oluşmaya başlar [13, 59].

İnfertil erkeklerin %30-80'i ejakülatlarında ROS seviyeleri yüksek bulunmuştur [7, 60]. Anormal ve olgunlaşmamış spermatozoa ve lökositler aşırı ROS üretimine neden oldukları için seminal sıvıda oksidatif strese (OS) yol açarlar. OS sadece aşırı ROS üretiminden değil, aynı zamanda düşük antioksidan kapasiteden de kaynaklanır [61].

Spermatogenez, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi döllenmeden önceki çeşitli sperm fonksiyonları için ve normal hücrel fizyolojik fonksiyonları sağlamak için fizyolojik miktarlarda ROS gereklidir [62] (Tablo 8). Ancak ROS üretimi arttığında antioksidan savunmalar yetersiz kalır ve OS indüklenir [63].

Tablo 8. ROS'un fizyolojik etkileri

Sperm maturasyonu
Sinyal iletimi
Motilite ve kapasitasyon
Akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon

2.4.3. İnsan ejakülatındaki ROS kaynakları

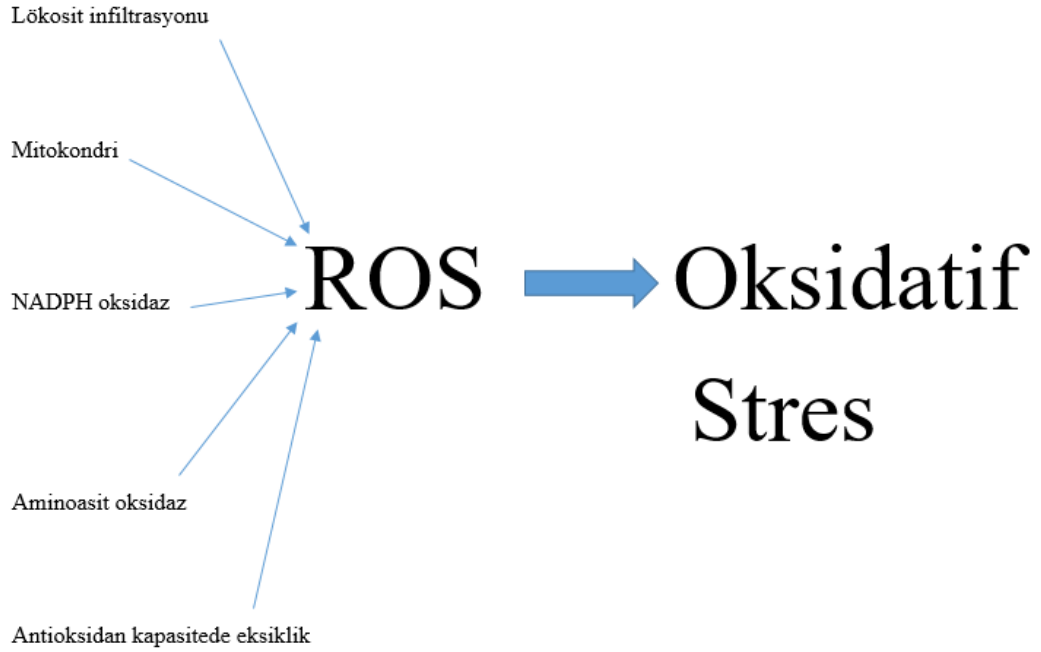
Reaktif oksijen türleri fizyolojik hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak üretilir. ROS ayrıca sperm hücresi mitokondrilerinde adenosin trifosfat üretiminin doğal bir yan ürünüdür. Reaktif oksijen ürünleri tüm hücrelerde sentezlenebilirler ancak seminal sıvıdaki ROS'un ana kaynağı lökositler ve olgunlaşmamış spermatozoalardır [64] (Tablo 9).

Tablo 9. İnsan ejakülatındaki ROS kaynakları

Lökositler
Olgunlaşmamış Spermatozoa
1- Sperm mitokondrisi
a) Elektron taşıma zincirinde (ETZ) elektron kaçakları
b) Lipid peroksidasyon süreci sırasında üretilen lipid aldehitler
c) Elektrofiller
d) Östrojen benzeri bileşikler
e) Elektromanyetik enerji türleri (ısı, görünür ışık, radyofrekans radyasyon)
f) İntrensek yolak ile apopitoz
2- NADPH oksidazlar (NADPH'ın NADPH oksidaz ile oksitlenmesi)
3- Amino asit oksidazlar

Erkek genital sistemindeki inflamasyon veya enfeksiyon lökosit kemotaksisini uyarır ve lökositleri aktive eder. Bu aktif lökositler, heksoz monofosfat şantı yoluyla nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) üretimini artırarak, aktif olmayan lökositlerden 100 kat daha fazla ROS üretimine neden olur [60, 65]. Artmış ROS üretimi de seminal sıvıda OS'ye yol açar [66, 67].

Olgunlaşmamış spermatozoada hücre içi ROS artışının en önemli nedeni elektron taşıma zincirindeki (ETZ) elektron kaçaklarıdır [68]. Enerji üretimi için mitokondriyal elektron taşıma zinciri boyunca elektronların sitokrom oksidaza düzenli akışı olmaktadır. İç mitokondriyal zar da elektron taşınmasının bozulması ile Kompleks I ve III'te elektron sızıntısı olur ve böylece süperoksit dismutaz ile güçlü bir oksidan olan H₂O₂ ortaya çıkar [69]. H₂O₂, önemli oranda sperm DNA hasarına neden olur [70]. Mitokondriyal artmış ROS üretimi, spermatozoada motilite kaybına [71] ve interensek yolak ile apopitoz indüksiyonuna neden olur [72-74]. Ayrıca olgunlaşmamış spermatozoa sitozolik glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi içerir ve bu enzim ile hücre içi NADPH üretir. NADPH iç membranda bulunan NOX5 adı verilen NADPH oksidaz yoluyla ROS üretimine neden olur [75]. Normal insan spermatozoasında enzim L-amino asit oksidaz sperm mitokondrisinde redoks regülasyonunda rol alır. Canlılığını yitirmiş hücrelerde L-amino asit oksidaz plazma membranının parçalanması sonucu açığa çıkan aromatik amino asitlerden H₂O₂ üretimine neden olur. Dolayısı ile canlılığını yitirmiş hücreler, ROS üretimini artırarak canlı spermatozoaların motilitesini ve fertilizasyon potansiyelini düşürür [76] (Şekil 4).



Şekil 5: İnsan spermatozoasında ROS artış nedenleri

2.4.4. Diğer ROS kaynakları

Yaşam biçimi faktörlerinden sigara tüketimi, yetersiz beslenme, obezite, alkol tüketimi ve ileri yaş ROS üretiminde artışa neden olabilir. Sigara içerdiği nikotin, katran, karbon monoksit ve ağır metallerin oksitleyici etkisi ile SDF'yi indükler [77, 78]. Ayrıca, sigara içenlerin seminal plazmasında C ve E vitaminleri gibi endojen antioksidanların seviyeleri azalmıştır, bu da spermatozoayı OS'ye karşı daha korumasız hale getirmektedir [79].

Alkol tüketenlerde artmış ROS üretiminin başlıca nedenleri yetersiz beslenme ve artmış apoptozistir [80, 81].

Obezite ile bozulmuş spermatogenez arasındaki ilişki adipoz fibroblastlardaki artmış aromataz aktivitesi ile açıklanabilir [82]. Ayrıca, obezitede artmış sitokin üretimi proinflamatuvar lökositlerin kemotaksisi ve artmış NADPH oksidaz aktivitesi üzerinden OS'ye neden olur [83].

Egzersiz, hipofiz aktivitesini artırarak leydig hücre fonksiyonu destekler ve testosteron klirensinde azalma yaratarak serum T seviyesinde artışa neden olur. Düzenli orta dereceli fiziksel aktivitenin semen parametreleri üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir

[84-86], buna karşın düşük ve şiddetli fizik aktivite azalmış testosteron düzeyleri üzerinden sperm parametrelerini olumsuz etkilemektedir [85].

2.4.5. Oksidatif stresin spermatozoa üzerindeki etkileri

Spermatozoa membranındaki yağların yaklaşık %60'nı çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) oluşturur ve ROS'un etkilerine daha duyarlıdır [87, 88]. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile membran akışlığını kaybeder. Artmış ROS seviyeleri sperm DNA bütünlüğünü bozar ve gen ekspresyonuna zarar verir [89]. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile membran akışlığını kaybeder. Artmış ROS seviyeleri sperm DNA bütünlüğünü bozar ve gen ekspresyonuna zarar verir [90]. Yüksek ROS düzeyleri mitokondriyal membranlarda hasar oluşturarak mitokondriden hücre içine sitokrom-C'yi salınımı ile kaspaz zincirinin aktivasyonuna ve apoptoza yol açar. Seminal plazmadaki yüksek sitokrom-C seviyeleri mitokondriyal hasarın önemli bir göstergesidir. Apoptoz süreci ROS seviyelerini daha da artırır. DNA hasarının artışı da apoptotik döngüyü devam ettirir [91] (Tablo 10).

Tablo 10. Serbest oksijen radikallerinin spermatozoa üzerinde etkileri

• Hücre ve organel zarlarına saldırarak lipit peroksidasyonu
• Sperm DNA hasarı
• Protein ve peptitlerde hidroksil radikali etkisi ile parçalanma
• Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz inhibisyonu
• Apoptoz

Sperm DNA'sının korunmasında histonların protamine dönüşüm oranı önemli rol oynar. Protaminler arjininden zengin, çekirdek proteinleridir. Spermin olgunlaşması ve fertilizasyon için çok önemlidirler [92]. Histon protamin değişimi kademeli bir süreçtir [93]. Erken spermatid aşamasından itibaren, histonların %85'i sperm DNA'sından sistematik olarak serbestlenir ve spermatogenezin son aşamasında, protamin ile değiştirilir [94]. Protamin paketlenmesi ile DNA stabilizasyonu sağlanır. Histonlar daha bazik olması nedeniyle anilin mavisi ile ışık mikroskobu altında daha koyu, protaminler ise daha soluk boyanır. Böylece kalitatif olarak histon/protamin oranı hakkında fikir sahibi olunabilir ve bu ölçüm anormal sperm kromatini ve erkek infertilitesi hakkında bilgi verebilir [92].

2.4.6. İnsan semeninde oksidatif stres (OS) ölçümü

İnsan seminal sıvısında OS, serbest radikal aktivitesinin doğrudan ölçümü veya serbest radikal aktivitesinin dolaylı göstergelerinin ölçümü ile belirlenebilir.

Doğrudan ölçüm testleri, sperm hücre zarı içindeki oksidasyon derecesini ölçer [95]. Bu testlerin güvenilirliği yüksek olsa da ROS'un yarılanma ömrünün kısa olması ve yöntemin pahalı olması gibi nedenlerle rutin olarak kullanılmaz [96]. Dolaylı ölçüm testleri, DNA hasarını veya lipid peroksidasyon (LPO) seviyelerini saptama temeline dayanır (Tablo 11)

Tablo 11. Sperm OS ölçüm yöntemleri

Doğrudan ölçüm testleri	Dolaylı ölçüm testleri
Kemilüminesans	Miyeloperoksidaz
Flow sitometri	Lipid peroksidasyon
Elektron Spin Rezonans (ESR)	ORP (oksidasyon redüksiyon potansiyeli)
NBT test	Kemokinler
Sitokrom-C redüksiyonu	Total antioksidan kapasite

Oksidatif stres, düşük seminal total antioksidan kapasite (TAC) ile ilişkilidir ve erkek kısırlılığının önemli nedenidir [97]. TAC ölçümü, tek tek antioksidan moleküllerin ölçümü yerine hepsinin toplam kapasitesini kapsamaktadır [98] (Tablo 12).

Tablo 12. Antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler

<i>Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar</i>	Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC) (antioksidan radikal süpürücü kapasitesi)
	Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP)
<i>Elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET)</i>	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)
	Folin-Ciocalteu yöntemi (FCR) (antioksidanın indirgeme kapasitesi)
	Demir ⁺³ iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)
	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi
	Cu ⁺² 'nin oksidan olarak kullanıldığı toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC)

2.4.7. Semende antioksidan düzenekler

Oksidatif stres, antioksidan korumadaki eksiklikten de kaynaklanabilir. ROS formlarına karşı savunma hattını oluşturan antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesindeki azalması OS'nin önemli nedenleridir [99].

Erkek üreme hücrelerinin ROS'un oksidatif etkisine karşı özel duyarlılığı nedeniyle, seminal plazmada ve sperm hücrelerinin içinde lokalize olan ROS fazlalığını nötralize eden çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan bileşiklerle donatılmıştır [61, 100]. Antioksidanlar radikal detoksifikasyonu (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz), radikal reaksiyonlarını sonlandırma (C ve E vitamini), radikal oluşumunu sınırlandırma (Serüloplazmin, ferritin), oksidatif hasara uğramış yapıları onarma ve uzaklaştırma ile etki ederler. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PO), glutatyon redüktaz enzimatik antioksidanlardır. Karnitin, Koenzim Q10, miyoinozitol, vitamin C, vitamin E, lökopenler, selenyum ve çinko enzimatik olmayan antioksidanlardır (Tablo13).

Tablo 13. Seminal antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz	Birinci sıra savunma antioksidanları
Katalaz	Birinci sıra savunma antioksidanları
Glutatyon peroksidaz	Lipid peroksitleri ve hidrojen peroksiti temizler
Glutatyon redüktaz	Lipid peroksitleri ve hidrojen peroksiti temizler
Enzimatik olmayan antioksidanlar	
C vitamini	Serbest radikalleri nötralize eder
E vitamini	Serbest radikalleri nötralize eder
Ferritin ve karnitinler	Serbest radikalleri nötralize eder ve bir enerji kaynağı görevi görür
Koenzim Q-10	İndirgenmiş formunda, mitokondriyal elektron taşıma sistemindeki serbest radikalleri temizler
Çinko	Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve sperm kromatin stabilitesi

Selenyum	Sperm hareketliliği ve OS homeostazı
N-asetil L-sistein	Serbest radikal süpürücü aktivite
L-arginin	Serbest oksijen radikallerinin oluşumu engeller
Folik asit	Sperm DNA bütünlüğünü koruma
Transferrin	Sperm canlılığı, DNA bütünlüğü ve OS homeostazı

Endojen enzimatik antioksidanlar

1. Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksidi hidrojen perokside dönüştürür.
2. Katalaz (CAT): Hidrojen peroksidi suya indirger.
3. Glutatyon peroksidaz (GPx): Glutatyon (GSH) varlığında H₂O₂ ve lipit peroksidlerin parçalayarak lipit peroksidasyonunu inhibe eder.
4. Glutatyon redüktaz (GR): Lipit peroksidasyonu inhibe eder.

Endojen non-enzimatik antioksidanlar

1. Koenzim Q10 (Co-Q10): Mitokondride üretilen ROS'u temizleyen güçlü bir antioksidandır. Hücre zarında ve lipoproteinlerde bulunur [101]. Co-Q10 total antioksidan kapasiteyi önemli ölçüde artırır [102]. Toplam antioksidan kapasite arttığından, Co-Q10 konsantrasyonunun sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji gibi temel semen parametrelerinde anlamlı iyileşmeler sağlar.[103].
2. Selenyum: Selenoenzimlerin ana bileşenidir ve zar yapısını stabilize eder. Ayrıca testosteron üretiminde önemli bir eser elementtir [104]. Selenyum takviyesi infertil erkeklerde sperm sayısını, konsantrasyonunu, hareketliliğini ve morfolojisini ve ayrıca sperm konsantrasyonunu iyileştirir [105].
3. Çinko: Spermatogenezde önemli rolleri vardır. Eksikliğinde sperm olgunlaşma aşamasında spermatogenez inhibe olur [106]. Çinko takviyesi semen hacmini, ilerleyici sperm motilite yüzdesini ve toplam normal sperm sayısını artırır [107]. Erkek üreme durumu, çinko veya selenyum gibi sperm sayısı ve hareketliliğinde olumlu değişikliklere neden olan faydalı elementlerin eklenmesiyle iyileştirilebilir [108]. Diyetle alımının eksikliğinde spermatozoada OS yaratır ve erkek doğurganlığını azaltır [109].

Eksojen vitamin antioksidanlar

1. α -Tokoferol (Vitamin E): Peroksinitritten türeyen serbest radikalleri temizler. Çoklu doymamış yağ asidinden lipit hidroperoksitlerinin oluşumunu ve ROS üretimini engeller [110].
2. Askorbik asit (Vitamin C): Askorbat ve ondan türeyen askorbil radikalının düşük tek-elektron indirgeyici potansiyele sahiptir. Seminal plazmadaki konsantrasyonu arttıkça DNA hasarını önler [111]. C vitamini alım eksikliğinde, spermatozoadaki oksidatif DNA hasarı seviyelerinde artış görülür. Diyetle alınması ile DNA hasarı önemli ölçüde azalır [112]
3. Karnitinler [L-Karnitin (LC) ve L-Asetil Karnitin (LAC)]: Epididimdeki sperm olgunlaşma sürecinde yer alır. Uzun zincirli yağ asitlerinin açıl karnitin esterlerinin oluşumunda önemli bir role sahip olduğu için biyoenerjik süreçler için gereklidir [113]. Karnitin erkeklerde özellikle epididimde yüksek konsantrasyonlarda bulunur [114].
4. Folik asit: Semende yuvarlak hücrelerin (ROS' un ana kaynaklarından biri) sayısını azaltır ve sperm sayısını artırır [115].

İdiopatik erkek inferilitesinin etiolojisinde ROS artışına bağlı oksidatif stres ve sperm DNA bütünlüğündeki bozulma öne çıkmaktadır. Semen analizi gibi konvansiyonel yöntemlerle açıklanmayan idiyopatik erkek infertilitesinde ampirik antioksidan gıda desteğinin semen parametrelerine, sperm DNA yapısı ve hasarına ve seminal total antioksidan kapasitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Çalışma tasarımı

Çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar ve Etik Kurulu'nun 25.02.2021 tarih ve 2021/108 sayılı kararı ile etik kurul onayı alındı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Üroloji Polikliniğinde değerlendirilen idiopatik infertil erkekler çalışmaya alındı. Olgular araştırma konusunda bilgilendirildi ve yazılı onamları alındı.

Tüm olguların medikal, cerrahi ve üreme öyküleri alındı ve Prader orşidometresi ile testis volümleri ölçümü dahil fizik bakı ve semen analizleri yapıldı.

OAT tanısı Dünya Sağlık Örgütü 2010 kılavuzuna göre yapılan iki adet semen analiziyle konuldu. Sperm konsantrasyonunun 15 milyon/mL'nin, sperm motilitesinin %40'ın ve sperm morfolojisinin %4'ün altında olması OAT olarak kabul edildi. İnfertiliteye yol açabilecek herhangi bir etyolojik neden bulunmayan olgular idiopatik infertil olarak kabul edildi.

Aydınlatılmış onamlarıyla çalışmaya katılmayı kabul eden olgular bilgisayar destekli (www.randomizer.org) tam (basit) randomizasyon ile iki gruba ayrıldı. Birinci gruba (Grup 1) antioksidan gıda desteği önerilirken, ikinci gruba (grup 2) antioksidan gıda desteği verilmedi. Tüm olgulara üç ay süresince haftada 3-4 gün, en az 45 dakika süreyle (haftalık toplam en az 150 dk-600 MET) orta şiddette bir fiziksel aktivite önerildi. Egzersiz önerileri Ek. 1' de gösterildi.

Tüm hastaların 0. ve 3. aylarda VKİ'leri hesaplandı ve fiziksel aktivite değerlendirmesi IPAQ anket formu ile yapıldı [116, 117].

OAT tanısı konulmuş çalışmaya katılan tüm hastalardan 0. ve 3. ay ziyaretlerinde semen analizi için elde edilen ejakulatın bir kısmı seminal antioksidan kapasite ölçümü, sperm DNA fragmantasyon indeksi ve sperm DNA kromatin yapısının değerlendirilmesi için ayrıldı.

Tablo 14: Çalışma tasarımı

Poliklinik başvurusu	<ul style="list-style-type: none">• Öykü• Fizik muayene• Semen analizi• Hormonal inceleme
Gözlem Viziti 1 (0. ay)	<ul style="list-style-type: none">• Aydınlatılmış Onam• Randomizasyon• VKİ hesaplanması• Uluslararası fiziksel aktivite anketi (Kısa) (IPAQ) doldurulması• Seminal total antioksidan kapasite• Sperm DNA fragmantasyon indeksi• DNA kromatin niteliğinin çalışılması
Gözlem Viziti 2 (3. ay)	<ul style="list-style-type: none">• VKİ hesaplanması• Uluslararası fiziksel aktivite anketi (Kısa) (IPAQ) doldurulması• Semen analizi• Hormonal değerlendirme• Seminal total antioksidan kapasite• Sperm DNA fragmantasyon indeksi• DNA kromatin niteliğinin çalışılması

3.2. Hasta seçimi

Çalışma, Mart 2021 ile Kasım 2021 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji polikliniğine 12 ay ve daha uzun süre düzenli cinsel ilişkilerine rağmen çocuk sahibi olamayan, eş muayeneleri normal olan erkekleri kapsadı. Fizik bakı bulguları, hormonal ve genetik değerlendirmeleri normal sınırlarda olan, son altı ay içinde iki semen analizinde üç adet anormal semen parametresi olan (OAT) ve 18 yaşından büyük olgular çalışmaya dahil edildi.

Vazektomi gibi sterilizasyon işlemleri uygulanan olgular, sperm konsantrasyonu <5 milyon/mL olanlar, üreme fonksiyonunu veya metabolizmayı etkileyecek bir tedavi veya ilacın alımı, multivitamin veya bitkisel ürün tüketenler (1 ay önce bırakmış

olması gereklidir), kanser, kalp hastalığı veya siroz gibi ciddi tıbbi hastalıkları olanlar, antikoagülanların kullanımını, tedavi edilmeyen hipotiroidizm, kontrolsüz diyabetes mellitus ve çalışmaya uyum sorunu yaşayan olgular çalışma dışı tutuldu.

3.3. Antioksidan gıda desteği

Antioksidan gıda desteği olarak T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının 30.04.2009 tarihli izni ile ithal edilmekte olan, İyi İmalat Uygulamalarına (GMP) uygun olarak üretilmiş (Proceed Plus™, AlfaSigma HealthScience Trento/İtalya) ve iki şasesinde 2000 mg L-karnitin, 2000 mg fruktoz, 932 mg asetil L-karnitin, 225 mg vitamin C, 115 mg sitrik asit, 50 mg koenzim Q10, 14 mg çinko, 115 µg selenyum, 3750 µg vitamin B12, 500 µg folik asit içeren gıda desteği sabah akşam birer şase olarak verildi.

3.4. Semen analizi

Semen analizleri DSÖ'nin 2010 yılı yayınladığı kılavuza uygun olarak 2-7 günlük cinsel yoksunluktan sonra mastürbasyonla elde edilen ejakulatın değerlendirilmesi ile yapıldı. İnkübatörde 37°C'de likefiye edilen örneklerin likefaksiyon süresi, viskozite, renk, hacim, değerlendirmesi yapıldı. Sperm sayımı Improved Neubauer sayım kamarası ile yapıldı. İlk önce motil spermeler hızlı motil ve yerinde motil şeklinde sayıldı. Sonra immotil spermeler sayılarak yüzdesi hesaplandı. Morfoloji için en az 100 sperm sayıldı. Her semen analizinde en az iki kez dilue edilmiş semen hazırlandı ve sayım yapıldı.

3.5. Hormon analizleri

Hormon analizleri ELISA yöntemi kullanılarak sabah 07-11 saatleri arasında hastalardan en az 12 saatlik açlığı takiben periferik venöz kan örnekleri alınarak çalışıldı.

3.6. VKİ ve fiziksel aktivite ölçümü

Vücut kitle indeksleri kilogram olarak ağırlığın metre cinsinden boy uzunluğunun karesine bölünmesiyle (kg/m^2) hesaplandı.

Tüm olgulara üç ay süresince haftada 3-4 gün, en az 45 dakika süreyle (haftalık toplam en az 150 dk-600 MET) orta şiddette bir fiziksel aktivite önerildi. (1 MET'=bazal metabolik hız için harcanan değer) Fiziksel aktivite, uluslararası fiziksel aktivite

anketi (IPAQ) kısa formu (7 soru) ile ölçüldü [118] (Ek 1). Anketin toplam skoru yürüme, orta şiddetli aktivite ve şiddetli aktivitenin süre (dakikalar) ve frekans (günler) toplamını kapsamaktadır. Aktiviteler için harcanan enerji MET-dakika skoru ile hesaplanmıştır. Bu aktiviteler için standart MET değerleri tablo 15’de gösterildi.

Tablo 15. Fiziksel aktivite ortalama MET değerleri

Oturma	1.5 MET
Yürüme	3.3 MET
Orta Şiddetli Fiziksel Aktivite	4.0 MET
Şiddetli Fiziksel Aktivite	8.0 MET

3.8. Seminal total antioksidan kapasite ölçümü

TEAC yöntemi bir numunede bulunan antioksidanlar tarafından ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonunun temizlenmesi esasına dayanır [119]. ABTS⁺ radikali mavimsi yeşil bir renge sahiptir [120]. Antioksidanlar reaksiyon ortamında serbest radikali yakalar, renk kaybına ve absorbansta bir azalmaya neden olurlar [121-123].

Seminal total antioksidan kapasiteyi ölçmek için Antioxidan Assay kiti (Cayman, USA) kullanıldı. ABTS substratını içeren Ellman’s solüsyonu mikrotitrasyon kuyucuklarına konulduktan sonra 50 µl seminal plazma eklendi. Kuyucuklarda meydana geleceken enzimatik reaksiyon sonucu sarımsı renkte ürün oluştu. Bu rengin yoğunluğu kuyucuklardaki serbest ABTS miktarı ile ters orantılı olarak değerlendirildi ve 405 ve 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi. (Multiskan GO, ThermoFisherScientific, Finland).

Assayın Hazırlanması

- 1- Troleks standartları 7 ayrı tüp içerisinde, kitin protokolü değrultusunda aşağıda gösterilen konsantrasyonlarda hazırlandı (Tablo 16).

Tablo 16. Trolex standartlarının kayıtlanması

Tüp	Trolex (µl)	Assay Tamponu	Konsantrasyon
A	0	1000	0
B	30	970	0,045
C	60	940	0,090
D	90	910	0,135
E	120	880	0,180
F	150	850	0,225
G	220	780	0,330

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34
B	B	B	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
C	C	C	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
D	D	D	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
E	E	E	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
F	F	F	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
G	G	G	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
H	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41

Şekil 6. Plate Set Up (A-G: standartlar, S1-S41: örnekler)

- 2- Trolex standart kuyuları: Her kuyuya 10 µl troleks standartı (A-G), 10µl metmyoglobulin, 10 µl kromogen konuldu.
- 3- Örnek kuyuları: Çalışma öncesi tüm örnekler 1:10-1:20 oranlarında sulandırıldı. 10 µl örnek, 10 µl metmyoglobulin, 150 µl chromogen kuyuya konuldu. Sonuçların anlamlı olması için antioksidan düzeyi standart eğrinin sınırları içerisinde yazıldı. Gerektingide assay tampon ile sulandırıldı.
- 4- Reaksiyon 40 µl H₂O₂ çalışma solüsyonu ile başlatıldı. H₂O₂ tüm kuyulara mümkün olduğunca aynı anda hızlıca eklendi.

- 5- Platein üzerini kapatılarak, çalkalayıcıda 5 dk oda ısısında çalkalandı. Süre sonunda örneklerin ve standartların absorbansı, Multiskan GO mikropate okuyucuda, 750 nm ve 405 nm dalga boyunda okutuldu.
- 6- Çıkan sonuçlar aşağıdaki formülde yerine konarak antioksidan seviyeleri belirlendi:

$$\text{Antioksidan (mM)} = [(\text{Örnek ortalama absorbansı}) - (\text{y-intersept})] / \text{Slope} \times \text{Dilüsyon}$$

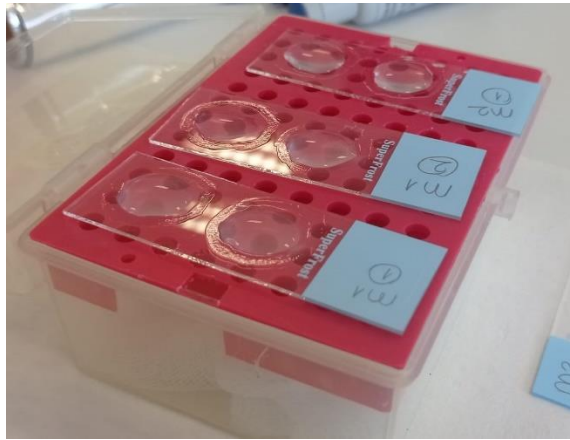
(mM Trolox equiv)

3.9. Sperm DNA fragmentasyon indeksi (DFI) ölçümü

TUNEL reaksiyonu ticari kitin (*In situ* cell death detection kit, Fluoescein kit, Roche, Mannheim, Almanya) çalışma koşulları doğrultusunda ve karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Hazırlık Aşaması:

- a) Etiket solüsyonunun bulunduğu mor kapaklı tüp üzerine enzim solüsyonunun hepsi eklendi. Pipetaj yaparak iyice karıştırıldı. Tüm işlemler buz üstünde gerçekleştirildi.
- b) Lamlar üzerinde belirlenen alanlara 45 µl etiket ve enzim solüsyonu karışımı ilave edildi.
- c) Slaytlar karanlık ve nemli ortam içinde 37 °C’de bir saat inkübe edildi.
- d) İşlem sonunda tüm örnekler 3 kez 1xPBS ile yıkandı.



Şekil 7. TUNEL analiz ekim işlemi

Görüntüleme

Görüntüleme OMÜ Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda bulunan floresan mikroskopta (Olympus BX-51) ve 40X büyütme altında yapıldı. Slaytlarda aynı alanların uygun filtrelerle hem DAPI hem FITC sinyallerinin fotoğrafları çekildi.

Görüntülerin Analizi

Her örnek için minimum 500 hücre ve en az üç ayrı alanın fotoğrafı çekildi. Bu fotoğraflardaki spermatozoa, Image J programı kullanılarak sayıldı. Fotoğrafların analizinde her alan için DAPI ve FITC sinyalleri ayrı ayrı olacak şekilde değerlendirildi. Her örneğin DFI aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DFI (DNA fragmentasyon indeksi)} = (\text{FITC} / \text{DAPI}) \times 100$$

3.10. Sperm Kromatin Yapısının Değerlendirilmesi / Protaminasyon Oranının Belirlenmesi

Sperm kromatin yapısı ve protaminasyon oranı anilin boyama yöntemi ile değerlendirildi. Anilin boyama yönteminin esası lizin bakımından zengin olan histonların ve arjinin bakımından zengin olan protaminlerin ayırımına dayanmaktadır. Asidik anilin mavisi ile boyama yöntemi lizin aminoasiti için pozitif bir reaksiyon verir ve semende bulunan sperm örneklerinin nükleer protein kompozisyonundaki farklılıkları ortaya çıkarır. Olgunlaşmamış sperm nükleusu histon açısından (lizin) zengindir ve boyama sonucu koyu mavi-lacivert renk alır. Olgun sperm nükleusu ise protamin açısından dolayısıyla arjinin ve sistein açısından zengindir ve anilin mavisi zayıf boyanır.

Anilin Boya Solüsyonunun ve Fiksatifin Hazırlanması

%5'lik anilin solüsyonu, cam şale içinde hazırlandı. Glutaraldehit solüsyonu %3'lük konsantrasyonda sulandırıldı. Boya solüsyonu analiz işlemine kadar ışık almayacak şekilde oda ısısında bekletildi [124].

Hücrelerin İncelenmesi

Semen örnekleri önce 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Seminal plazma ayrıldıktan sonra 1 kez daha 1xPBS ile yıkandı. Elde edilen semen pelletinden 15 µl'si

temiz lam üzerine yayıldı ve havada kurutuldu. Ardından lamlar %3'lük glutaraldehit solüsyonu ile fikse edildi. Son aşamada ise %5'lik anilin mavisi solüsyonunda 5 dakika bekletilerek boyandı. Boyama sonucunda olgunlaşmamış çekirdek kromatini içeren sperm koyu mavi, lacivert olacak şekilde boyanırken, olgun çekirdekiçeren spermler soluk mavi olacak şekilde boyandı. Slaytlar ışık mikroskobu altında incelenerek 200 sperm sayıldı ve anilin mavisi ile boyanan sperm yüzdesi belirlendi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Güç analizi G*Power 3.1.9.4 programı kullanıldı. TwoSample T-test poweranalysis testi ile (Alfa 0.05) (Power 0.90) çalışmaya katılması gereken hasta sayısı 46 olarak hesaplandı. Çalışmalardan elde edilen veriler IBM SPSS Statistics Version 22.0 (Armonk, NY, ABD) programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Çalışmada kullanılan bağımlı ve bağımsız sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov Smirnov testi ile analiz edildi. Bağımsız gruplarda (antioksidan alan ve almayanlar) aritmetik ortalamalarının karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenler için Student's t test, normal dağılıma uymadığı tespit edilen değişkenler için Mann Whitney U test kullanıldı. Bağımlı gruplarda (tedavi öncesi ve tedavi sonrası) aritmetik ortalamalarının karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenler için Paired t test, normal dağılıma uymadığı tespit edilen değişkenler için Wilcoxon test kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Demografik bulgular

Birinci ve ikinci grup arasında yaş, testis volümleri ve fiziksel aktivite 0. ay ve 3. ay değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 17).

Tablo 17. Olguların yaş, testis volümü, fiziksel aktivite değerleri

	Grup 1 (n=24)		Grup 2 (n=24)		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
Yaş	33,54	5,4	32,8	6,8	0,42	0,674
Sağ testis (mL)	23,3	2,9	22,7	2,9	0,24	0,811
Sol testis (mL)	22,3	4,0	21,6	2,8	1,01	0,313
VKİ (0. ay) kg/m^2	28,1	3,6	28,3	3,5	0,24	0,811
VKİ (3. ay) kg/m^2	27,2	3,2	27,4	3,4	0,32	0,713
Fiziksel aktivite (IPAQ) (0. ay) (MET)	435,25	304,2	498,12	353,4	1,07	0,353
Fiziksel aktivite (IPAQ) (3. ay) (MET)	852,5	434,5	835,1	469,6	1,09	0,284

Grupların 0. ay ve 3. ayda ölçülen VKİ değerleri arasında fark yoktu ($p>0.05$). Her iki grubun 3. aydaki fiziksel aktivite puanları, 0. ay ki puanlarından istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($<0,001$) (Tablo 18).

Tablo 18. Grupların başlangıç ve üçüncü aydaki VKİ ve fiziksel aktivite değerleri

	0. ay		3. ay		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
Grup 1 VKİ	28,1	3,6	27,2	3,2	0,24	0,811
Grup 2 VKİ	28,3	3,5	27,4	3,4	0,32	0,713
Grup 1 Fiziksel aktivite (IPAQ)	435,25	304,2	852,5	434,5	1,07	$<0,001$
Grup 2 Fiziksel aktivite (IPAQ)	498,12	353,4	835,1	469,6	1,09	$<0,001$

4.2. Semen parametreleri

Grupların üçüncü aydaki sperm konsantrasyonlarında anlamlı artış bulunurken ($p<0,001$), diğer parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı ($p>0,05$) Tablo (19).

Tablo 19. Grup 1 ve 2’de semen parametre değişimleri

	0. ay		3. ay		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
Grup 1 (n=24)						
Sperm konsantrasyonu	7,2	3,1	13,8	6,6	5,2	<0,001
Total sperm sayısı	20,9	12,1	22,3	13,1	0,62	0,539
İleri hareket	13,2	9,9	16,9	9,9	1,61	0,122
Motilite	21,8	18,6	22,8	9,7	0,34	0,740
Grup 2 (n=24)						
Sperm konsantrasyonu	7,04	3,113	12,2	6,6	6,08	<0,001
Total sperm sayısı	21,0	14,629	20,9	12,8	0,06	0,949
İleri hareket	13,1	10,4	14,3	9,8	0,53	0,602
Motilite	18,4	11,2	19,6	10,3	0,47	0,644

4.3. Hormon değerleri

Grup 1 ve grup 2’de başlangıç ve üçüncü ayda ölçülen hormonal değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 20).

Tablo 20. Grup 1 ve 2’de hormonal değerlendirme

	0. ay		3. ay		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
Grup 1 (n=24)						
FSH	6,1	3,2	6,2	3,2	0,25	0,806
LH	5,6	1,6	5,8	1,8	0,65	0,522
Prolaktin	12,1	5,7	13,9	5,9	1,03	0,313
Estradiol	28,6	7,1	29,7	6,8	0,62	0,542
Testosteron	454,0	164,8	498,4	154,4	1,34	0,194
Grup 2 (n=24)						
FSH	6,3	2,8	6,8	3,7	0,74	0,465
LH	5,8	2,2	6,9	2,6	2,04	0,053
Prolaktin	12,2	4,2	4,2	0,65	0,39	0,703
Estradiol	28,3	5,6	30,9	7,6	1,25	0,225
Testosteron	419,2	122,9	435,5	125,4	0,64	0,531

4.4. Total Antioksidan kapasite

Grup 1’de üçüncü ay sonunda antioksidan kapasitenin bir miktar arttığı, ancak artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). Grup 2’de üçüncü ayda antioksidan kapasitenin başlangıca göre bir miktar azaldığı, ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). (Tablo 23)

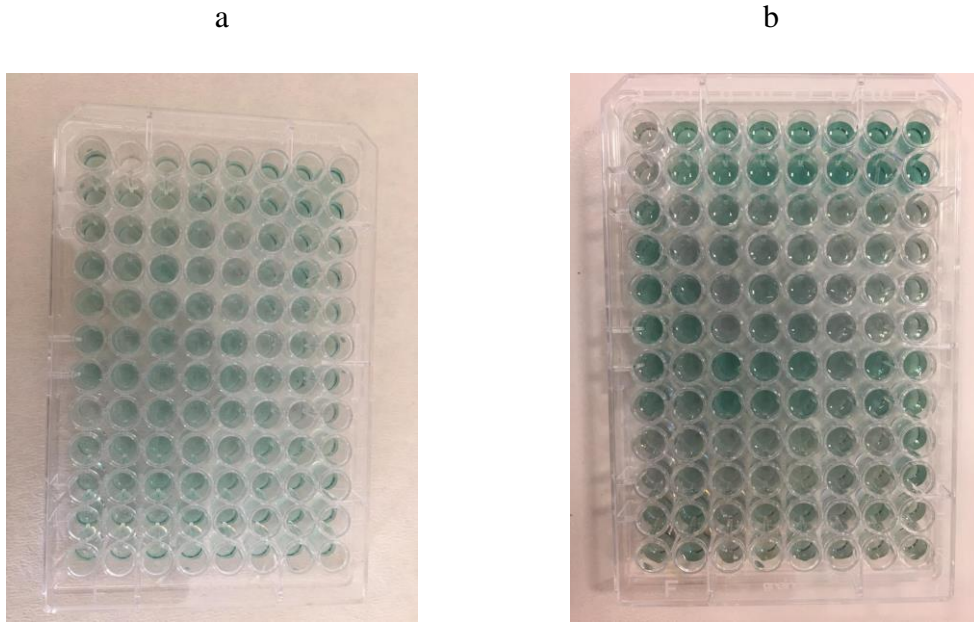
Tablo 21. Grup 1 ve 2’de total antioksidan kapasite değerleri

	0. ay		3. ay		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
Grup 1 (n=24)	1,6	0,9	2,1	1,2	1,15	0,263
Grup 2 (n=24)	2,3	0,9	2,0	1,3	0,68	0,501

Grupların başlangıçtaki total antioksidan kapasite değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunurken($p=0,027$), üçüncü ayda bu fark anlamlı değildi ($p=0,972$). (Tablo 25)

Tablo 22. Gruplar arası total antioksidan kapasite karşılaştırması

	Grup 1 (n=24)		Grup 2 (n=24)		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
0. ay	1,6	0,9	2,3	0,9	2,29	0,027
3. ay	2,1	1,2	2,0	1,3	0,04	0,972



Şekil 8. 22.02.2022 (a) ve 23.02.2022 (b) TAC çalışma kuyucukları

4.5. DFİ bulguları

Antioksidan gıda desteği alan Grup 1’de DNA fragmentasyon indeksinde önemli oranda azalma bulundu ($p=0,003$). Buna karşın grup 2’de DNA fragmentasyon indeksindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,078$). (Tablo 26)

Tablo 23. Grup 1 ve 2’nin DFİ değerleri

	0. ay		3. ay		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
Grup 1 (n=24)	22,5	11,3	14,7	7,8	3,34	0,003
Grup 2 (n=24)	21,3	7,8	17,1	7,4	1,85	0,078

Grupların 0. ay ve 3. aydaki DFİ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$) (Tablo 24).

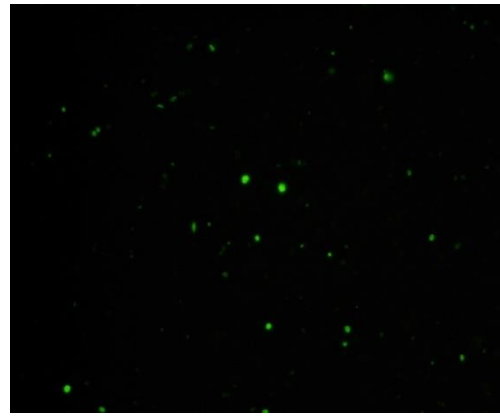
Tablo 24. Gruplar arası DFİ değerleri karşılaştırması

	Grup 1 (n=24)		Grup 2 (n=24)		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
0. ay	22,5	11,3	21,3	7,8	0,19	0,853
3. ay	14,7	7,8	17,1	7,4	1,28	0,201

A)

a

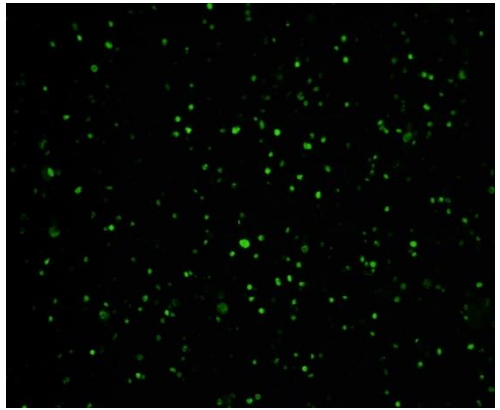
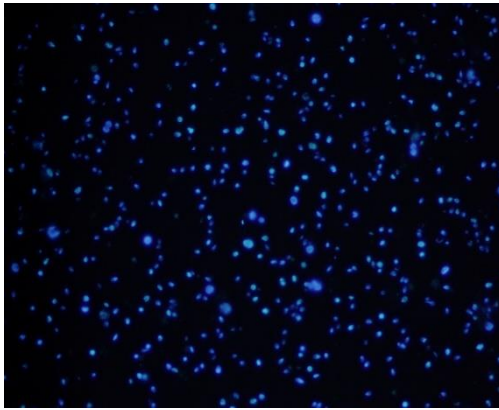
b



B)

c

d



Şekil 9. DNA fragmantasyonu az (A) ve fazla (B) olan örneklerin DAPI (a,c) ve FITC (b,d) görüntüsü

4.6. Sperm kromatin yapı bozuklukları

Antioksidan gıda desteği alan Grup 1’de üçüncü ayda anilin mavisi ile koyu boyanan (histondan zengin) sperm yüzdesinde başlangıca göre anlamlı derecede azalma

saptandı ($p<0,001$). Buna karşın grup 2’de sperm kromatin yapısında anlamlı değişiklik görülmedi ($p=0,670$) (Tablo 29).

Tablo 25. Grup 1 ve 2’de sperm kromatin yapısındaki değişiklikler

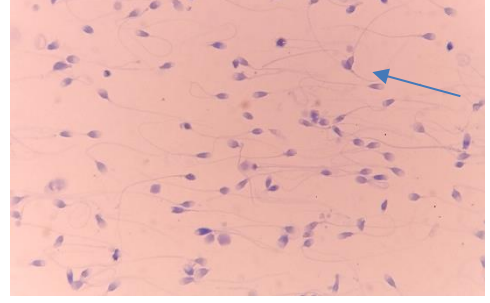
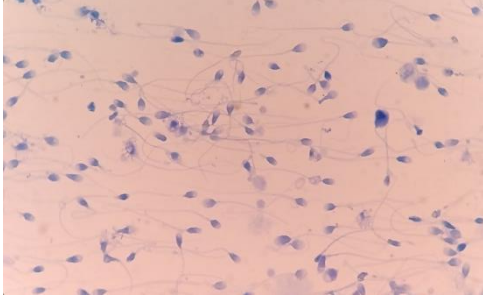
	0. ay		3. ay		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
Grup 1 (n=24)	46,2	14,6	26,1	11,8	6,59	<0,001
Grup 2 (n=24)	31,3183	15,7	32,799	15,8	0,43	0,670

Başlangıçta Grup 1’deki olguların sperm kromatin yapısındaki bozukluk grup 2’ye göre daha yüksek bulunurken ($p<0,001$), üçüncü ayda her iki grubun sperm kromatin yapısındaki bozukluk oranları arasında fark yoktu ($p=0,149$). (Tablo 31)

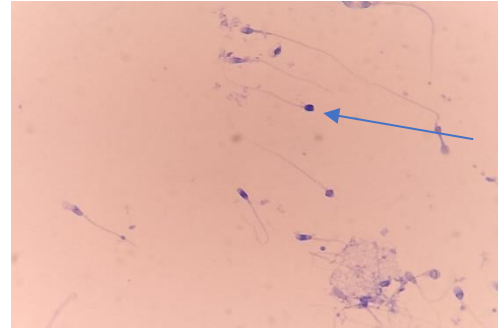
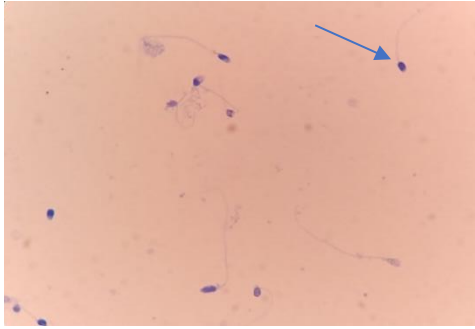
Tablo 26. Grupların sperm kromatin yapısındaki değişikliklerin karşılaştırılması

	Grup 1 (n=24)		Grup 2 (n=24)		test	p
	ORT	SD	ORT	SD		
0. ay	46,2	14,6	31,3183	15,7	3,61	<0,001
3. ay	26,1	11,8	32,7992	15,8	1,44	0,149

A)



B)



Şekil 10. Kontrol (A) ve OAT (B) grubuna ait spermlerin anilin mavisi boyaması görüntüsü (A'da anilin negatif ve B'de anilin pozitif boyanan spermler gösterildi)

5. TARTIŞMA

İnfertilitenin %50'sinden erkek faktörü sorumludur ve olguların %30'unda erkek kısırlılığının nedeni bilinmemektedir [3, 125]. Spermatozoa yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içeren hücre zarı nedeniyle somatik hücrelere göre ROS'un zararlı etkilerine karşı daha duyarlıdır [126]. Erkek infertilitesi nedenlerinden biri de artmış ROS üretimidir [127] ve infertil erkeklerin yaklaşık %30-80'ı yüksek seminal ROS'a sahiptir [128]. Fizyolojik kabul edilen miktarda ROS varlığı spermatogenetik süreçte (sperm hiperaktivasyonu, kapasitasyon ve fertilizasyon sırasında akrozom reaksiyonu) gereklidir [129]. Ancak, ROS seviyesi patolojik düzeyde yükseldiğinde spermatogenetik süreç olumsuz etkilenmeye başlar [130]. Seminal antioksidanlar ROS'u nötralize ederek ve spermatogenetik aktiviteyi korur [131].

Standart bir semen analizi anormal sperm DNA'sı hakkında bilgi vermediğinden sadece OAT olguları değil normospermik olanlar da açıklanamayan erkek infertilitesi ile başvurulabilir [132]. İdiyopatik erkek infertilitesinin tedavisi, hormonal ve hormonal olmayan ampirik tıbbi tedavilerden oluşur. Hormonal tedaviler arasında en etkili olanları SERM'ler ve FSH'dir. Hormonal olmayan başlıca ajanlar arasında karnitinler, koenzim Q10, miyoinositol, bazı vitaminler ve eser elementler (selenyum, çinko) sayılabilir. Ancak bunların kullanım süresi, dozajı, kombinasyonu ve bunların hangi subfertil hasta gruplarında kullanılacağına daire literatürde henüz fikir birliği sağlanamamıştır [133]. Antioksidanlar semen parametrelerinden en çok sperm motilitesinde iyileşme sağlamaktadır [134].

Literatürde antioksidan ajanların semen parametreleri üzerine düzeltici etkisini gösteren çalışmaların yanısıra [135-137], anlamlı düzelmenin gösterilemediği kısıtlı sayıda çalışmalar da mevcuttur [138].

Erkek infertilitesinin yönetiminde antioksidan destek tedavisine yönelik son on yılda yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda antioksidan kapasitede anlamlı iyileşmeler rapor edilmiştir [139]. Alahmar ve arkadaşları Co-Q10 200 mg/gün vererek 65 oligoastenozoospermik hasta üzerinde yaptığı çalışmada üç ay sonunda seminal parametrelerde düzelme ve TAC düzeylerinde artış tespit etmiştir [140]. Benzer olarak farklı çalışmalarda farklı sürelerde ve farklı kombinasyonlarda verilen antioksidan gıda desteğinin infertil erkeklerde sperm sayısı, hareketlilik, total antioksidan kapasite

artışını sağladığı ve ROS seviyelerinde anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir [141]. Sadece varikozel tanısı konmuş infertil erkeklerin dahil edildiği başka bir çalışmada tedavi sonunda sperm konsantrasyonlarında, progresif sperm hareketlerinde ve TAC düzeylerinde artış gösterilmiştir [142]. N-asetilsistein verilerek sperm parametrelerinin incelendiği bir başka çalışmada astenozoospermik erkeklerde sperm morfolojisinin iyileştiği ve motilitesinin arttığı, MDA ve DFİ seviyelerinin azaldığı, bunun yanısıra, protamin eksikliğinin giderilerek TAC düzeylerinin artışı gösterilmiştir [143]. Farklı olarak antioksidan tedavi desteğine rağmen TAC düzeylerinde değişiklik olmadığını gösteren az sayıda çalışma da yayınlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde varikozeli olan infertil hastalara altı ay süreyle verilen destek tedavisinin TAC düzeylerinde etkisi olmadığı gösterilmişse de bunun nedeni devam eden varikozel ile ilişkili olabilir [144]. Bu sonuç Festa ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyuşmamaktadır. Bunun muhtemel sebebi çalışmaya dahil edilen hasta sayılarının azlığı olabilir. Bizim çalışmamızın sonuçları da destek tedavisi alan grupta almayanlara göre TAC düzeyinin istatistiksel olarak anlamsız yükseldiğini göstermiştir. Bunun nedeni hasta sayısının kısıtlı olmasından ve verilerin homojen dağılmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Artmış ROS üretiminden etkilenen bir diğer önemli parametre sperm DNA bütünlüğüdür [145]. İdiyopatik infertiliteye sahip çiftlerin %39'unda yüksek sperm DNA hasarı vardır [146]. İnfertil erkeklerde fertil olanlara kıyasla ROS seviyeleri daha yüksek buna karşın antioksidan kapasite daha düşük bulunmuştur [147, 148]. Nitekim Iommiello ve ark. artmış semen ROS düzeyi ile artmış sperm DNA fragmentasyonu arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit etmişlerdir [149]. Seminal OS'nin spermatogenezis üzerine olan etkileri daha iyi anlaşıldıkça, yüksek antioksidan içeren doğal takviyelere ilgi de giderek artmaya başlamıştır. Buradan yola çıkılarak antioksidan destek tedavilerinin klinik kullanımına ilişkin çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır [150]. ROS düzeyini düşürmeye yönelik antioksidan destek tedavilerine yönelik çalışmaların çoğu DFİ düşüşünü göstermiştir [151-153]. Micic ve ark. idiyopatik oligostenozoospermik 175 hastada üç aylık 1.000 gr LC, 0.5 gr ALC, 0.725 gr fumarat, 1 g fruktoz, 50 mg sitrik asit, 10 mg çinko, 20 mg koenzim Q10, 50 µg selenyum, 90 mg vitamin C, 200 µg folik asit 1.5 µg B12 kombine antioksidan gıda desteği kullanımının progresif sperm motilitesi, sperm canlılığında artış ve DFİ'de

azalma yaptığını göstermiştir [154]. Antioksidan destek tedavisinin ROS üzerine iyileştirici ve DFİ'yi azaltıcı etkisinin gösterildiği tüm bu çalışmalara benzer olarak bizim çalışmamızda da anlamlı DFİ düşüşü gözlenmiştir. Çalışmamızda antioksidan gıda desteği almayan Grup 2'nin DFİ oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,078$). Grup 1'de DFİ'de istatistiksel olarak anlamlı düşüşe rağmen ($p=0,003$), TAC seviyesinde anlamlı düzelme gözlenmemiş olması Grup 1 hastalarda tedavi başlangıcındaki ortalama TAC düzeyinin Grup 2'ye göre daha düşük olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca burada antioksidan paradoks akla gelmektedir. Olgular antioksidanları aşırı dozda tüketmiş olabilir. Antioksidan aşırı kullanımını ve buna bağlı yan etkileri değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bir derlemede altı aya uzayan antioksidan tedavinin ROS miktarını önemli oranda azaltarak hücre işlevinde gerekli ROS miktarının da altında bir ROS konsantrasyonu sağlayarak sperm işlevini bozabileceği bildirilmiştir [16]. Bir meta analizde varikosektomi sonrası üç aylık antioksidan tedavinin altı aylık tedaviye göre daha etkili olduğu gösterilmiştir [155].

Antioksidan destek tedavisinin başarısızlığını gösteren ve altı ay süreyle antioksidan gıda desteği uygulanan, eşleri sağlıklı astenozoospermik infertil erkeklerin incelendiği bir çalışmada sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi ve canlı gebelik oranlarında plasebo gruba göre istatistiksel fark göstermediği ve gruplar arasında DFİ oranlarının benzer olduğu gösterilmiştir [156]. Başka bir çalışmada ise ampirik antioksidan tedavinin sperm konsantrasyonu ve DFİ üzerine etkili olmadığı ve buna karşın sperm motilite ve morfolojisinde düzeltici etkisi olduğu gösterilmiştir [157]. Bizim çalışmamızda ise her iki grupta da (antioksidan alan ve almayan) sperm konsantrasyonunda iyileşme saptanırken, diğer sperm parametrelerinde anlamlı değişiklik gözlenmedi.

Bildiğimiz kadarıyla literatürde antioksidan gıda desteği tedavisi sonrası histon/protamin oranlarını inceleyen herhangi bir klinik çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda antioksidan gıda desteği alan Grup 1'de üçüncü ayda anilin mavisi ile koyu boyanan (histondan zengin) sperm yüzdesinde başlangıca göre anlamlı derecede azalma saptandı ($p<0,001$). Buna karşın grup 2'de sperm kromatin yapısında anlamlı değişiklik görülmedi ($p=0,670$).

İnsan sperm hücrelerinin olgunlaşması sürecinde sperm DNA'sının paketlenmesi %10-15 histonlarla; %85-90 ise daha stabil özelliği olan protaminlerle gerçekleşir ve bu süreç protaminasyon olarak adlandırılır. Bu paketlenme oranının histonlar lehine artışı (anormal protaminasyon) DNA stabilizasyonunda azalmaya yol açar ve DFİ artışı görülür. Anormal protaminasyon kolaylıkla anilin boyama tekniği ile gösterilmektedir. Bu teknik, histonların anilin boyasını kuvvetli alması ve ışık mikroskobu altında bunun koyu renkle gözlenmesi esasına dayanır. Koyu boyanan histon proteinlerinin açık boyanmış olan protaminlere oranının kalitatif ya da kantitatif olarak ölçülmesiyle anormal protaminasyon saptanır. Anormal protaminasyonun fertilitite kapasitesini düşürdüğü gösterilmiştir [158-160].

Son olarak antioksidan gıda desteğinin kullanım süresi değerlendirildiğinde çalışmamızdaki üç aylık süre yeterli görülmektedir. Bir derleme de altı aya uzayan antioksidan tedavinin ROS miktarını önemli oranda azaltarak hücre işlevinde gerekli ROS miktarının da altında bir ROS konsantrasyonu sağlayarak sperm işlevini bozabileceği bildirilmiştir [16]. Başka bir meta analizde de varikosektomi sonrası üç aylık antioksidan tedavinin altı aylık tedaviye göre daha etkili olduğu gösterilmiştir [155].

Limitasyonlar

İdiyopatik erkek infertilitesinde antioksidan tedavi protokolleri hastaya göre kişiselleştirilmelidir. Örneğin ROS seviyesinin ölçülmesi ve buna göre antioksidan titrasyonunun ayarlanması tedavi sonucunu etkileyebilir. Çalışmamızda ROS düzeyinin bakılmamış olması bu bakımdan sınırlayıcı bir faktör olabilir. Hasta sayısının kısıtlı olması ve non homojen dağılım gösteren değişkenler sperm motilitesine, morfolojisine ve TAC değerlerine ait sonuçları etkileyebilir. İdiyopatik infertiliteye neden olabilecek bir çok predispozan faktörlerin olabileceği ve bunların da ampirik antioksidan tedavi sonuçlarını etkileyeceği düşünülebilir. Son olarak bu tedavi yönteminin her ne kadar sperm konsantrasyonu, DFİ ve protaminasyon üzerine olumlu etkileri gösterilmiş olsa da bunun gebelik ve canlı doğum oranlarına etkisinin araştırılmaması bir başka kısıtlayıcı faktördür.

6. SONUÇLAR

1. İdiopatik erkek infertilitesinde antioksidan gıda desteği sperm konsatrasyonunu önemli oranda artırmaktadır.
2. Antioksidan gıda desteği seminal TAC'yi artırmaktadır, ancak istatistiksel anlamlı değildir.
3. Sadece orta düzeydeki fiziksel aktivite idiyopatik infertil erkeklerde sperm konsantrasyonunu artırmaktadır.
4. Sadece orta düzey fiziksel aktivitenin seminal TAC, SDF ve protaminasyona önemli etkisi gösterilememiştir.
5. Antioksidan gıda desteği sperm kromatin bütünlüğünü korumaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild, F., et al., *The international glossary on infertility and fertility care, 2017*. Human reproduction, 2017. 32(9): p. 1786-1801.
2. Dohle, G., et al., *EAU guidelines on male infertility*. European urology, 2005. 48(5): p. 703-711.
3. Agarwal, A., et al., *Male infertility*. Lancet, 2021. 397(10271): p. 319-333.
4. Moghissi, K.S. and E.E. Wallach, *Unexplained infertility*. Fertil Steril, 1983. 39(1): p. 5-21.
5. Agarwal, A., et al., *Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility*. World J Mens Health, 2019. 37(3): p. 296-312.
6. Agarwal, A., et al., *Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility*. Andrologia, 2018. 50(11): p. e13126.
7. Takeshima, T., et al., *Oxidative stress and male infertility*. Reprod Med Biol, 2021. 20(1): p. 41-52.
8. Ritchie, C. and E.Y. Ko, *Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility*. Andrologia, 2021. 53(1): p. e13581.
9. Mannucci, A., et al., *The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility*. Front Mol Biosci, 2021. 8: p. 799294.
10. Durairajanayagam, D., *Lifestyle causes of male infertility*. Arab J Urol, 2018. 16(1): p. 10-20.
11. Amorini, A.M., et al., *Antioxidant-Based Therapies in Male Infertility: Do We Have Sufficient Evidence Supporting Their Effectiveness?* Antioxidants (Basel), 2021. 10(2).
12. Torres-Arce, E., et al., *Dietary Antioxidants in the Treatment of Male Infertility: Counteracting Oxidative Stress*. Biology (Basel), 2021. 10(3).
13. Dutta, S., A. Majzoub, and A. Agarwal, *Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management*. Arab J Urol, 2019. 17(2): p. 87-97.
14. Ilacqua, A., et al., *Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility*. Reprod Biol Endocrinol, 2018. 16(1): p. 115.
15. Agarwal, A., et al., *Proteomics, oxidative stress and male infertility*. Reprod Biomed Online, 2014. 29(1): p. 32-58.
16. Henkel, R., I.S. Sandhu, and A. Agarwal, *The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility?* Andrologia, 2019. 51(1): p. e13162.
17. Majzoub, A. and A. Agarwal, *Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate*. Arab J Urol, 2018. 16(1): p. 113-124.
18. Creta, M., et al., *Toxicity of Antioxidant Supplements in Patients with Male Factor Infertility: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. Antioxidants (Basel), 2021. 11(1).
19. Salvio, G., et al., *Coenzyme Q10 and Male Infertility: A Systematic Review*. Antioxidants (Basel), 2021. 10(6).
20. Smits, R.M., et al., *Antioxidants for male subfertility*. Cochrane Database Syst Rev, 2019. 3(3): p. Cd007411.
21. Cannarella, R., et al., *Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility*. Int J Mol Sci, 2020. 21(5).
22. Choy, J.T. and M.L. Eisenberg, *Male infertility as a window to health*. Fertil Steril, 2018. 110(5): p. 810-814.

23. Bisht, S., et al., *Oxidative stress and male infertility*. Nat Rev Urol, 2017. 14(8): p. 470-485.
24. Barratt, C.L.R., et al., *The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities*. Hum Reprod Update, 2017. 23(6): p. 660-680.
25. Zambrano Serrano, C.A. and A. Carvajal Obando, *Diagnosis and hormonal treatment of male infertility*. Actas Urol Esp (Engl Ed), 2020. 44(5): p. 321-327.
26. Chalyi, M.E., N.D. Akhvlediani, and R.R. Kharchilava, [*Male infertility*]. Urologiia, 2016(1 Suppl 1): p. 2-16.
27. Aitken, R.J., *The Male Is Significantly Implicated as the Cause of Unexplained Infertility*. Semin Reprod Med, 2020. 38(1): p. 3-20.
28. Mazur, D.J. and L.I. Lipshultz, *Infertility in the Aging Male*. Curr Urol Rep, 2018. 19(7): p. 54.
29. Barbăroșie, C., A. Agarwal, and R. Henkel, *Diagnostic value of advanced semen analysis in evaluation of male infertility*. Andrologia, 2021. 53(2): p. e13625.
30. Baskaran, S., et al., *Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology*. Andrologia, 2021. 53(2): p. e13614.
31. Agarwal, A., et al., *Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility?* Ther Adv Urol, 2016. 8(5): p. 302-318.
32. Tüttelmann, F. and E. Nieschlag, *Classification of andrological disorders*, in *Andrology*. 2010, Springer. p. 87-92.
33. Kathrins, M. and C. Niederberger, *Diagnosis and treatment of infertility-related male hormonal dysfunction*. Nat Rev Urol, 2016. 13(6): p. 309-23.
34. Madhukar, D. and S. Rajender, *Hormonal treatment of male infertility: promises and pitfalls*. J Androl, 2009. 30(2): p. 95-112.
35. Casarini, L., et al., *FSH for the Treatment of Male Infertility*. Int J Mol Sci, 2020. 21(7).
36. Silva, A.F., J. Ramalho-Santos, and S. Amaral, *The impact of antisperm antibodies on human male reproductive function: an update*. Reproduction, 2021. 162(4): p. R55-r71.
37. Shibahara, H., et al., *Anti-sperm antibodies and reproductive failures*. Am J Reprod Immunol, 2021. 85(4): p. e13337.
38. Gupta, S., et al., *Antisperm antibody testing: a comprehensive review of its role in the management of immunological male infertility and results of a global survey of clinical practices*. The World Journal of Men's Health, 2021. 40.
39. Gupta, S., et al., *Antisperm Antibody Testing: A Comprehensive Review of Its Role in the Management of Immunological Male Infertility and Results of a Global Survey of Clinical Practices*. World J Mens Health, 2022.
40. Bar-Chama, N. and H. Fisch, *Infection and pyospermia in male infertility*. World J Urol, 1993. 11(2): p. 76-81.
41. Bar-Chama, N., E. Goluboff, and H. Fisch, *Infection and pyospermia in male infertility. Is it really a problem?* Urol Clin North Am, 1994. 21(3): p. 469-75.
42. Lotti, F. and M. Maggi, *Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health*. Hum Reprod Update, 2015. 21(1): p. 56-83.
43. Studniarek, M., K. Skrobisz-Balandowska, and E. Modzelewska, *Scrotal imaging*. J Ultrason, 2015. 15(62): p. 245-58.
44. Sánchez Guerrero, A., R. Villor Esnal, and M. Pamplona Casamayor, [*Radiological diagnosis: scrotal ultrasound and Doppler ultrasound in the diagnosis of male infertility*]. Arch Esp Urol, 2004. 57(9): p. 905-20.
45. Niederberger, C., *Male Infertility*. J Urol, 2021. 206(6): p. 1499-1501.

46. Liu, J.L., et al., *Genetic testing in male infertility - reassessing screening thresholds*. *Curr Opin Urol*, 2020. 30(3): p. 317-323.
47. Gunes, S. and S.C. Esteves, *Role of genetics and epigenetics in male infertility*. *Andrologia*, 2021. 53(1): p. e13586.
48. Jungwirth, A., et al., *European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update*. *European urology*, 2012. 62(2): p. 324-332.
49. Punab, M., et al., *Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts*. *Human reproduction*, 2017. 32(1): p. 18-31.
50. Bieniek, J.M., C.D. Lapin, and K.A. Jarvi, *Genetics of CFTR and male infertility*. *Transl Androl Urol*, 2021. 10(3): p. 1391-1400.
51. Oliva, R., *Protamines and male infertility*. *Hum Reprod Update*, 2006. 12(4): p. 417-35.
52. Agarwal, A., et al., *Sperm DNA fragmentation: a critical assessment of clinical practice guidelines*. *The world journal of men's health*, 2022. 40(1): p. 30.
53. Hamilton, T. and M. Assumpção, *Sperm DNA fragmentation: causes and identification*. *Zygote*, 2020. 28(1): p. 1-8.
54. Bracke, A., et al., *A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility*. *Reprod Biomed Online*, 2018. 36(3): p. 327-339.
55. Krzastek, S.C., et al., *Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential*. *Transl Androl Urol*, 2020. 9(6): p. 2797-2813.
56. Yang, B., Y. Chen, and J. Shi, *Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine*. *Chem Rev*, 2019. 119(8): p. 4881-4985.
57. Bugger, H. and K. Pfeil, *Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020. 1866(7): p. 165768.
58. Yang, S. and G. Lian, *ROS and diseases: role in metabolism and energy supply*. *Mol Cell Biochem*, 2020. 467(1-2): p. 1-12.
59. Henkel, R., U. Offor, and D. Fisher, *The role of infections and leukocytes in male infertility*. *Andrologia*, 2021. 53(1): p. e13743.
60. Iwasaki, A. and C. Gagnon, *Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients*. *Fertility and sterility*, 1992. 57(2): p. 409-416.
61. Sanocka, D., et al., *Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility*. *International Journal of Andrology*, 1997. 20(5): p. 255-264.
62. Aitken, R.J., M.A. Baker, and B. Nixon, *Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress?* *Asian Journal of Andrology*, 2015. 17(4): p. 633.
63. Aitken, R.J. and J.R. Drevet, *The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: a two-edged sword*. *Antioxidants*, 2020. 9(2): p. 111.
64. Aitken, R.J. and J.S. Clarkson, *Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa*. *Reproduction*, 1987. 81(2): p. 459-469.
65. Plante, M., E. de Lamirande, and C. Gagnon, *Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility*. *Fertility and sterility*, 1994. 62(2): p. 387-393.
66. Shekarriz, M., et al., *Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1995. 12(2): p. 70-74.

67. Wallach, E.E. and H. Wolff, *The biologic significance of white blood cells in semen*. Fertility and sterility, 1995. 63(6): p. 1143-1157.
68. Gibb, Z., S.R. Lambourne, and R.J. Aitken, *The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress*. Biology of reproduction, 2014. 91(3): p. 77, 1-10.
69. Aitken, R.J., et al., *Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. 21(4): p. 495-504.
70. Oehninger, S., et al., *Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa*. Journal of assisted reproduction and genetics, 1995. 12(1): p. 41-47.
71. Koppers, A.J., et al., *Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. 93(8): p. 3199-3207.
72. Mupfiga, C., et al., *The relationship between seminal leukocytes, oxidative status in the ejaculate, and apoptotic markers in human spermatozoa*. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2013. 59(6): p. 304-311.
73. Koppers, A.J., et al., *Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa*. Biochemical Journal, 2011. 436(3): p. 687-698.
74. Aitken, R.J., et al., *Evidence that extrapancreatic insulin production is involved in the mediation of sperm survival*. Molecular and cellular endocrinology, 2021. 526: p. 111193.
75. Williams, A. and W. Ford, *Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm*. Biology of reproduction, 2004. 71(4): p. 1309-1316.
76. Aitken, J.B., et al., *Characterization of an L-amino acid oxidase in equine spermatozoa*. Biology of reproduction, 2015. 92(5): p. 125, 1-13.
77. Hengstler, J.G., et al., *Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected*. Carcinogenesis, 2003. 24(1): p. 63-73.
78. Arabi, M., *Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa*. Andrologia, 2004. 36(5): p. 305-310.
79. Mostafa, T., et al., *Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males*. Andrologia, 2006. 38(6): p. 221-224.
80. Maneesh, M., et al., *Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males*. Indian journal of physiology and pharmacology, 2006. 50(3): p. 291.
81. Sabeti, P., et al., *Etiologies of sperm oxidative stress*. International Journal of Reproductive Biomedicine, 2016. 14(4): p. 231.
82. Hammoud, A.O., et al., *Obesity and male reproductive potential*. Journal of andrology, 2006. 27(5): p. 619-626.
83. Singer, G. and D.N. Granger, *Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance*. Microcirculation, 2007. 14(4-5): p. 375-387.
84. Gaskins, A.J., et al., *Physical activity and television watching in relation to semen quality in young men*. Br J Sports Med, 2015. 49(4): p. 265-70.
85. Vaamonde, D., et al., *Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men*. European journal of applied physiology, 2012. 112(9): p. 3267-3273.

86. Hajizadeh Maleki, B., et al., *Comparison of seminal oxidants and antioxidants in subjects with different levels of physical fitness*. *Andrology*, 2013. 1(4): p. 607-614.
87. Aitken, R.J., et al., *Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006. 91(10): p. 4154-4163.
88. Calamera, J., et al., *Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenozoospermic, and polyzoospermic semen samples*. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 2003. 66(4): p. 422-430.
89. Darbandi, M., et al., *Reactive oxygen species-induced alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites, and semen quality*. *J Assist Reprod Genet*, 2019. 36(2): p. 241-253.
90. Jones, R., T. Mann, and R. Sherins, *Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma*. *Fertility and sterility*, 1979. 31(5): p. 531-537.
91. Dorostghoal, M., et al., *Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men*. *Andrologia*, 2017. 49(10): p. e12762.
92. Hamad, M.F., *Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity*. *Reprod Biol*, 2019. 19(1): p. 6-13.
93. Steger, K., *Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids*. *Anatomy and embryology*, 1999. 199(6): p. 471-487.
94. Balhorn, R., *The protamine family of sperm nuclear proteins*. *Genome biology*, 2007. 8(9): p. 1-8.
95. Agarwal, A., E. Tvrda, and R. Sharma, *Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014. 12: p. 45.
96. Cocuzza, M., et al., *Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis*. *Int Braz J Urol*, 2007. 33(5): p. 603-21.
97. Sharma, R.K., et al., *The reactive oxygen species—total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility*. *Human reproduction*, 1999. 14(11): p. 2801-2807.
98. Pasqualotto, F.F., et al., *Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility*. *Urologia internationalis*, 2008. 81(3): p. 263-270.
99. Al-Attar, A.M., *Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice*. *Saudi J Biol Sci*, 2011. 18(1): p. 63-72.
100. Gałecka, E., et al., *[Antioxidative enzymes--structure, properties, functions]*. *Pol Merkur Lekarski*, 2008. 25(147): p. 266-8.
101. Ernster, L. and P. Forsmark-Andrée, *Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms*. *Clin Investig*, 1993. 71(8 Suppl): p. S60-5.
102. Nadjarzadeh, A., et al., *Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial*. *Andrologia*, 2014. 46(2): p. 177-83.
103. Thakur, A.S., et al., *Effect of Ubiquinol Therapy on Sperm Parameters and Serum Testosterone Levels in Oligoasthenozoospermic Infertile Men*. *J Clin Diagn Res*, 2015. 9(9): p. Bc01-3.
104. Flohé, L., *Selenium in mammalian spermiogenesis*. *Biol Chem*, 2007. 388(10): p. 987-95.

105. Safarinejad, M.R. and S. Safarinejad, *Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study*. J Urol, 2009. 181(2): p. 741-51.
106. Ebisch, I.M., et al., *The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility*. Hum Reprod Update, 2007. 13(2): p. 163-74.
107. Hadwan, M.H., L.A. Almashhedy, and A.R.S. Alsalman, *Oral zinc supplementation restore high molecular weight seminal zinc binding protein to normal value in Iraqi infertile men*. BMC urology, 2012. 12(1): p. 1-6.
108. Atig, F., et al., *Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men*. BMC Urol, 2012. 12: p. 6.
109. Atig, F., et al., *Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men*. BMC urology, 2012. 12(1): p. 1-8.
110. Ross, C., et al., *A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility*. Reprod Biomed Online, 2010. 20(6): p. 711-23.
111. Colagar, A.H. and E.T. Marzony, *Ascorbic Acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality*. J Clin Biochem Nutr, 2009. 45(2): p. 144-9.
112. Fraga, C.G., et al., *Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. 88(24): p. 11003-11006.
113. Arduini, A., et al., *Carnitine in metabolic disease: potential for pharmacological intervention*. Pharmacol Ther, 2008. 120(2): p. 149-56.
114. Cooper, T., W. Weidner, and E. Nieschlag, *The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers α -glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid*. International journal of andrology, 1990. 13(5): p. 329-336.
115. Aitken, R.J. and G.N. De Iuliis, *On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa*. Mol Hum Reprod, 2010. 16(1): p. 3-13.
116. Roberts-Lewis, S.F., et al., *The validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) for adults with progressive muscle diseases*. Disabil Rehabil, 2021: p. 1-9.
117. Cleland, C., et al., *Validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) for assessing moderate-to-vigorous physical activity and sedentary behaviour of older adults in the United Kingdom*. BMC Med Res Methodol, 2018. 18(1): p. 176.
118. Meh, K., et al., *Validity and Reliability of IPAQ-SF and GPAQ for Assessing Sedentary Behaviour in Adults in the European Union: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Int J Environ Res Public Health, 2021. 18(9).
119. Zulueta, A., M.J. Esteve, and A. Frígola, *ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products*. Food chemistry, 2009. 114(1): p. 310-316.
120. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free radical biology and medicine, 1999. 26(9-10): p. 1231-1237.
121. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 2015: Oxford university press, USA.
122. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 1985, Pergamon.

123. Erel, O., *A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation*. Clinical biochemistry, 2004. 37(4): p. 277-285.
124. Emirzeoğlu, D., *Sperm Dna Fragmantasyonu, Dna Hasari ve Protamin Oranının Belirlenmesi ve Sperm Parametrelerine Etkisi in Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı*. 2019, Ondokuz Mayıs Üniversitesi.
125. Vander Borgh, M. and C. Wyns, *Fertility and infertility: Definition and epidemiology*. Clinical biochemistry, 2018. 62: p. 2-10.
126. Condorelli, R., et al., *Myo-inositol as a male fertility molecule: speed them up*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017. 21(2 Suppl): p. 30-35.
127. Kumar, N. and A.K. Singh, *Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility*. Journal of gynecology obstetrics and human reproduction, 2018. 47(10): p. 565-572.
128. Agarwal, A., et al., *Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility*. Fertility and sterility, 2006. 86(4): p. 878-885.
129. Conrad, M., et al., *ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2015. 1850(8): p. 1566-1574.
130. John Aitken, R., J.S. Clarkson, and S. Fishel, *Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function*. Biology of reproduction, 1989. 41(1): p. 183-197.
131. Tremellen, K., *Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective*. Hum Reprod Update, 2008. 14(3): p. 243-58.
132. Imani, M., et al., *Sperm parameters, DNA integrity, and protamine expression in patients with type II diabetes mellitus*. J Obstet Gynaecol, 2021. 41(3): p. 439-446.
133. Showell, M.G., et al., *Antioxidants for male subfertility*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(1): p. Cd007411.
134. Imamovic Kumalic, S. and B. Pinter, *Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic oligoasthenozoospermia*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 426951.
135. Mongioi, L., et al., *The role of carnitine in male infertility*. Andrology, 2016. 4(5): p. 800-807.
136. Alahmar, A.T., et al., *Coenzyme Q10 improves sperm parameters, oxidative stress markers and sperm DNA fragmentation in infertile patients with idiopathic oligoasthenozoospermia*. The world journal of men's health, 2021. 39(2): p. 346.
137. Kobori, Y., et al., *Antioxidant cosupplementation therapy with vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 in patients with oligoasthenozoospermia*. Archivio Italiano di Urologia e Andrologia, 2014. 86(1): p. 1-4.
138. Terai, K., et al., *Combination therapy with antioxidants improves total motile sperm counts: A Preliminary Study*. Reproductive medicine and biology, 2020. 19(1): p. 89-94.
139. Micic, S., et al., *Double-blind, randomised, placebo-controlled trial on the effect of L-carnitine and L-acetylcarnitine on sperm parameters in men with idiopathic oligoasthenozoospermia*. Andrologia, 2019. 51(6): p. e13267.
140. Alahmar, A.T., et al., *Coenzyme Q10 Improves Sperm Parameters, Oxidative Stress Markers and Sperm DNA Fragmentation in Infertile Patients with Idiopathic Oligoasthenozoospermia*. World J Mens Health, 2021. 39(2): p. 346-351.
141. Chattopadhyay, R., S. Yasmin, and B. Chakravarty, *Effect of continuous 6 months oral antioxidant combination with universally recommended dosage in idiopathic male infertility*. International Journal of Infertility & Fetal Medicine, 2016. 7(1): p. 0-0.

142. Festa, R., et al., *Coenzyme Q10 supplementation in infertile men with low-grade varicocele: an open, uncontrolled pilot study*. *Andrologia*, 2014. 46(7): p. 805-7.
143. Jannatifar, R., et al., *Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019. 17(1): p. 24.
144. Nematollahi-Mahani, S.N., et al., *Effect of folic acid and zinc sulphate on endocrine parameters and seminal antioxidant level after varicocelectomy*. *Andrologia*, 2014. 46(3): p. 240-5.
145. Lewis, S.E., et al., *The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment*. *Reproductive biomedicine online*, 2013. 27(4): p. 325-337.
146. Simon, L., et al., *Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF*. *Reproductive biomedicine online*, 2013. 26(1): p. 68-78.
147. Aitken, R.J., D.S. Irvine, and F.C. Wu, *Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility*. *Am J Obstet Gynecol*, 1991. 164(2): p. 542-51.
148. Sukcharoen, N., et al., *Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination*. *Fertil Steril*, 1995. 63(6): p. 1293-300.
149. Iommiello, V.M., et al., *Ejaculate oxidative stress is related with sperm DNA fragmentation and round cells*. *Int J Endocrinol*, 2015. 2015: p. 321901.
150. Abad, C., et al., *Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA*. *Andrologia*, 2013. 45(3): p. 211-216.
151. Gual-Frau, J., et al., *Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients*. *Hum Fertil (Camb)*, 2015. 18(3): p. 225-9.
152. Bejarano, I., et al., *Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa*. *J Pineal Res*, 2014. 57(3): p. 333-9.
153. Greco, E., et al., *Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment*. *J Androl*, 2005. 26(3): p. 349-53.
154. Micic, S., et al., *Double-blind, randomised, placebo-controlled trial on the effect of L-carnitine and L-acetylcarnitine on sperm parameters in men with idiopathic oligoasthenozoospermia*. *Andrologia*, 2019. 51(6): p. e13267.
155. Wang, J., et al., *Efficacy of antioxidant therapy on sperm quality measurements after varicocelectomy: A systematic review and meta-analysis*. *Andrologia*, 2019. 51(10): p. e13396.
156. Steiner, A.Z., et al., *The effect of antioxidants on male factor infertility: the Males, Antioxidants, and Infertility (MOXI) randomized clinical trial*. *Fertil Steril*, 2020. 113(3): p. 552-560.e3.
157. Williams, E.A., et al., *A randomized placebo-controlled trial to investigate the effect of lactolycopene on semen quality in healthy males*. *Eur J Nutr*, 2020. 59(2): p. 825-833.
158. Oliva, R., *Protamines and male infertility*. *Human reproduction update*, 2006. 12(4): p. 417-435.
159. Fortes, M.R., et al., *Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in Bos indicus bulls*. *Andrology*, 2014. 2(3): p. 370-8.
160. De Yebra, L., et al., *Complete selective absence of protamine P2 in humans*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. 268(14): p. 10553-10557.

8. EKLER

Ek 1. Uluslararası Fiziksel Aktivite Anketi Kısa formu (7 soru)



Hastanın adı-soyadı:
Tarih:

Uluslararası Fiziksel Aktivite Anketi (Kısa)

Günlük yaşam içerisinde yaptığınız aktiviteler hakkında bilgi edinmek istiyoruz. Aşağıda son 7 gün içerisinde fiziksel olarak harcanan zaman hakkında sorular bulunmaktadır. Lütfen kendinizi çok hareketli, bir kişi olarak görmesiniz dahi her soruyu cevaplayın. Ev ve bahçe işlerinizi, iş yerinde yaptığınız aktiviteleri, bir yerden bir yere gitmek için yaptıklarınızı, boş zamanlarınızda yaptığınız egzersiz veya spor gibi aktiviteleri düşünün.

Son 7 gün içerisinde 10 dakika veya üzerinde süren nefesini hızlandıran, kuvvet gerektiren tüm yoğun faaliyetleri göz önünde bulundurun.

1. Son bir hafta içinde kaç gün ağır kaldırma, kazma, aerobik, basketbol, futbol veya hızlı bisiklet çevirme gibi şiddetli bedensel güç gerektiren faaliyetlerden yaptınız?

- Haftada..... gün
 Şiddetli fiziksel aktivite yapmadım. (Bu şıkla işaretlediyseniz 3. Soruya geçiniz.)

2. Bu günlerin birinde şiddetli fiziksel aktivite yaparak genellikle ne kadar zaman harcadınız?

- Bilmiyorum / Emin değilim
 Günde..... dakika
 Günde..... saat

Geçen bir hafta içinde yaptığınız orta dereceli fiziksel aktiviteleri düşünün. Bunlar 10 dakika veya daha uzun süren, orta derece fiziksel güç gerektiren ve normalden biraz sık nefes almaya neden olan aktivitelerdir.

3. Son bir hafta içinde kaç gün hafif yük taşıma, normal hızda bisiklet çevirme, halk oyunları, dans, bowling veya tenis gibi orta dereceli bedensel güç gerektiren faaliyetlerden yaptınız? (Yürüme hariç.)

- Haftada..... gün
 Orta dereceli fiziksel aktivite yapmadım. (Bu şıkla işaretlediyseniz 5. Soruya geçiniz.)



4. Bu günlerin birinde orta dereceli fiziksel aktivite yaparak genellikle ne kadar zaman harcadınız?
- Bilmiyorum / Emin değilim
- Günde..... dakika
- Günde..... saat

Geçen bir hafta içinde yürüyerek geçirdiğiniz zamanı düşünün. Bu; işyerinde, evde, bir yerden bir yere ulaşım amacıyla veya sadece dinlenme, spor, egzersiz veya hobi amacıyla yaptığınız yürüyüş olabilir.

5. Geçen 7 gün içerisinde, bir seferde en az 10 dakika yürüdüğünüz gün sayısı kaçtır?
- Haftada..... gün
- Yürümedim (Bu şıkla işaretlediyseniz 5. Soruya geçiniz.)
6. Bu günlerden birinde yürüyerek genellikle ne kadar zaman geçirdiniz?
- Bilmiyorum / Emin değilim
- Günde..... dakika
- Günde..... saat

Son soru, son bir hafta içinde oturarak geçirdiğiniz zamanlarla ilgilidir. İşte, evde, çalışırken ya da dinlenirken geçirdiğiniz zamanlar dahildir. Bu masanızda, arkadaşınızı ziyaret ederken, okurken, otururken veya yatarak televizyon seyrettiğinizde oturarak geçirdiğiniz zamanları kapsamaktadır.

7. Son bir hafta içinde oturarak günde ne kadar zaman harcadınız?
- Bilmiyorum / Emin değilim
- Günde..... dakika
- Günde..... saat

Oturma	1.5 MET
Yürüme	3.3 MET
Orta Şiddetli Fiziksel Aktivite	4.0 MET
Şiddetli Fiziksel Aktivite	8.0 MET

Ek 2. Etik Kurul Onayı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/120-157-352

16.03.2021

Sayın Prof. Dr. Ramazan AŞÇI

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **B Semen Analizinde Oligoastenoteratozoospermi Saptanan İnfertil Hastalarda Yaşam Tarzı Değişikliklerinin Ve Antioksidan Gıda Desteği Almanın Semen Antioksidan Kapasite, Dna Fragmentasyon İndeksi Ve Dna Kromatin Niteliği Üzerine Etkilerinin Araştırılması** başlıklı OMÜ KA EK 2021/108 Karar nolu iyokimya çalışması+ Anket çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 25.02.2021 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Ek 3. Tez İntihal Raporu

M.ŞENGÜL Tez 08.03.2022.docx

ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	www.androloji.org.tr Internet	263 words – 2%
2	acikerisim.baskent.edu.tr Internet	226 words – 2%
3	acikbilim.yok.gov.tr Internet	197 words – 2%
4	dergipark.org.tr Internet	101 words – 1%
5	tupbebek-genetik.com Internet	62 words – 1%
6	minimalinvazivurolojikongresi.org Internet	55 words – 1%
7	acikerisim.erbakan.edu.tr Internet	54 words – 1%
8	acikders.ankara.edu.tr Internet	42 words – < 1%
9	9lib.net Internet	39 words – < 1%
10	toad.halileksi.net Internet	

Ek 4. Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur form

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI)
OLİGOASTENOTERATOZOOSPERMİLİ SUBFERTİL OLGULARDA FİZİKSEL AKTİVİTE VE ANTİOKSİDAN GIDA DESTEĞİNİN SEMİNAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE, SPERM DNA FRAGMENTASYON İNDEKSİ VE DNA KROMATİN NİTELİĞİ ÜZERİNE ETKİLERİ
Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.
BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDA MIYIM?
Bu çalışmaya gönüllü olmanız durumunda katılımınız sağlanacaktır. Katılmaya karar vererseniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir.
ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?
Çocuk sahibi olamama nedeni ile başvuran ve semen analizinde sperm sayısının, şeklinin ve hareketliliğinin düşük olduğu saptanan hastalarda yaşam tarzı değişikliklerinin ve antioksidan gıda desteğinin çocuk sahibi olmaya etkileri araştırılacaktır.
ÇALIŞMA İŞLEMLERİ
0. ve 3. ayda kontrole gelmeniz istenecektir. Çalışma için sizden toplam ikişer defa olmak üzere 0. ve 3. ayda kan ve sperm örneği vermeniz, fiziksel aktivite anketini doldurulmanız istenecektir.
BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?
İlk poliklinik başvurunuzda bilgisayar destekli basit randomizasyon ile antioksidan desteği alıp almayacağınız size iletilecek. Egzersiz önerileri formunu inceleyerek size önerilen orta şiddetli egzersiz önerilerine uymanız beklenmektedir.
ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?
Olası yan etki ve riskler öngörülmemektedir.
GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ
ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?
Çalışmaya katılarak kısırılık konusunda daha fazla bilimsel bilgi sahibi olmanızı sağlayacak ve bilime katkı sağlamış olacaksınız.
GÖNÜLLÜ KATILIM
Bu çalışmaya gönüllü olmanız durumunda katılımınız sağlanacaktır.
ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?
Sizden çalışma boyunca herhangi bir ücret talep edilmeyecektir.
KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?
Özel kişisel bilgileriniz araştırma sorumlusu ve yardımcı araştırmacılar haricindeki kişilerle asla paylaşılmayacaktır. İsim ve soyisim belirtilmeden bilimsel makalelerde bilgileriniz kullanılabilir.
ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER
Dr. Mesut Şengül Tel No: 05535934599 Prof. Dr. Ramazan Aşçı Tel No: 05327887546

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR
Çalışmadan ayrılmanızı gerektirecek herhangi bir durum öngörülmemektedir.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR
Yeni bilgiler tarafınıza ivedilikle iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir

Gönüllünün Adı Soyadı / Tarih / İmzası			
Açıklamaları Yapan Adı Soyadı / Tarih / İmzası			
Olur İşlemine Tanık Olan Adı Soyadı / Tarih / İmzası			
Yasal Temsilcinin Adı Soyadı / Tarih / İmzası	/		