

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

**ASTHENOSPERMİA HASTALARINDA KETOTİFEN'İN  
İN VİTRO SPERM MOTİLİTESİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Oğuzhan BULDUK**

**Enstitü Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nureddin CENGİZ**

**HAZİRAN-2015**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

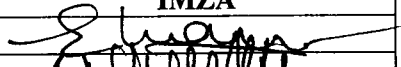
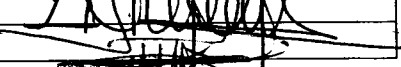

ASTHENOSPERMİA HASTALARINDA KETOTİFEN'İN  
İN VİTRO SPERM MOTİLİTESİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oğuzhan BULDUK

Enstitü Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji

“Bu tez 26/6/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oy çokluğu ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ ÜYESİ	KANAATI	İMZA
Prof. Dr. Elvan Özbek	BAŞARILI	
Doc. Dr. Nuraddin ÇEKİÇ	BAŞARILI	
Doç. Dr. Mehmet ÇEKİÇ	BAŞARILI	

## BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulu'ndan 02/12/2014 tarihinde onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışım olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

12/06/2015

Oğuzhan BULDUK

İmza 

## TEŞEKKÜR

Her koşulda yanımda olan, desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Hatice Bulduk, babam İbrahim Bulduk ve kardeşim Berkay Bulduk'a gönülden minnetlerimi sunmayı borç bilirim.

Tez konumu belirlememde ve devamını sağlamamda bilgi ve fikirleriyle yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Nureddin Cengiz, Üroloji Kliniği Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet Gökçe ve tez çalışmam için laboratuvarını açıp, çalışma boyunca fikirleriyle destek veren Androloji Laboratuvarı sorumlusu Uzm. Dr. Yasemin Nasır'a ve laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca gerek yüksek lisans eğitimim gerekse tez çalışmam boyunca sahip olduğu bilgi ve deneyimi ile desteğini esirgemeyip yanımda olan Histoloji ve Embriyoloji ABD. Başkanı Prof. Dr. Elvan Özbek'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Biyostatistik ABD. Başkanı Yrd. Doç. Dr. Ünal Erkorkmaz'a istatistik konusunda verdiği dersler ve tezimin istatistik bölümünün hazırlanmasında verdiği emekler için teşekkür ederim. Bununla birlikte yüksek lisans dönem arkadaşlarıma eğitim ve tez çalışmam süresince fikir paylaşımları için teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMA VE SİMGELER.....	v
ŞEKİLLER.....	viii
TABLOLAR.....	ix
RESİMLER.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ.....	3
2.1.1. Hipotalamo - Hipofizo - Gonadal Aks.....	3
2.1.2. Spermatogenez.....	5
2.1.3. Spermiojeniz.....	5
2.1.4. Olgun Spermium.....	6
2.1.5. Fertilizasyonda Sperm.....	6
2.1.6. Semen.....	7
2.2. İNFERTİLİTE.....	7
2.2.1. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri.....	8
2.2.1.1. Pretestiküler nedenler.....	8
2.2.1.2. Testiküler nedenler.....	8
2.2.1.2.1. Kromozom anomalileri.....	8
2.2.1.2.2. Genetik defektler.....	9
2.2.1.2.3. Kriptorşidizm.....	9
2.2.1.2.4. Gonadotoksinler.....	10
2.2.1.2.5. Varikosel.....	10
2.2.1.3. Posttestiküler nedenler.....	10
2.2.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi.....	11
2.2.2.1. Semen analizi.....	11
2.2.2.1.1. Semen toplaması.....	11

2.2.2.1.2. Semeninin makroskopik incelenmesi .....	12
2.2.2.1.3. Semeninin mikroskopik incelenmesi .....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	16
3.1. GEREÇLER .....	16
3.2. KİMYASALLAR .....	17
3.3. YÖNTEMLER .....	17
3.3.1. Hazırlık Aşaması.....	17
3.3.1.1. Hasta gruplarının belirlenmesi .....	17
3.3.1.2. Örneklerin toplanması.....	18
3.3.1.3. Solüsyon hazırlanması .....	18
3.3.2. Uygulama Aşaması.....	18
3.3.2.1. Solüsyon uygulanması .....	18
3.3.2.2. Motilite değerlendirmesi .....	19
3.3.2.3. Vitalite değerlendirmesi .....	20
3.3.3. İstatistiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. MOTİLİTE BULGULARI .....	22
4.2. VİTALİTE BULGULARI.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	28
6. ÖZET.....	40
KAYNAKLAR .....	42
EK .....	52
ÖZGEÇMİŞ .....	53

## KISALTMA VE SİMGELER

$\alpha$	Alfa
ATP	Adenozin Tri Fosfat
$\beta$	Beta
$Ca^{2+}$	Kalsiyum
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
cm	Santimetre
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
g	Reaktif Santrifüj Kuvveti
GIFT	Gamet Intrafallopian Transfer
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
$\mu g$	Mikrogram
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
HHG	Hipotalamus-Hipofiz-Testis
HOS	Hipo Osmotik Şişme
ICSI	İntra Sitoplazmik Sperm
I.U.	İnternasyonal Ünite
IUI	İntra Uterin İnseminasyon
IVF	İn Vitro Fertilizasyon

IVF-ET	İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi
LH	Luteinize Edici Hormon
MESA	Mikrocerrahi ile Epididimal Sperm Aspirasyonu
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
MIF	Müllerian İnhibitör Faktörü
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ m	Mikrometre
OAT	Oligo-Asteno-Teratozoospermi
Ort	Aritmetik Ortalama
PAF	Trombosit Aktive Edici Faktör
p	Anlamlılık Düzeyi
pH	Hidrojen Gücü
PGD	Preimplantasyon Genetik Tanı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Devir
SS	Standart Sapma
TGF- $\beta$ 1	Trombosit Büyüme Faktörü- $\beta$ 1
ÜYT	Üremeye Yardımcı Teknikler



VKI	Vücut Kitle İndeksi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZIFT	Zigot Intrafallopian Transfer
ZP	Zona Pellusida

## ŞEKİLLER

Şekil 1. A, B, C ortalama motilite karşılaştırması.....	24
---	----

## TABLULAR

Tablo 1. Hastaların pH, viskozite ve hacim ortalama değerleri.....	22
Tablo 2. Gruplar arası motilite karşılaştırması.....	23
Tablo 3. Gruplar arası vitalite karşılaştırması.....	25

## RESİMLER

Resim 1. Makler kamarası .....	19
Resim 2. Kamera ataçmanlı mikroskop .....	21
Resim 3. Kontrol grubu vitalite boyaması .....	26
Resim 4. Deney grubu vitalite boyaması .....	27

## **EK**

Ek.1. Etik Kurul Kararı .....	52
-------------------------------	----

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, günümüz evli çiftlerin %10 kadarını etkileyen uzun süren, maliyetli bir tedavi protokolü gerektiren ve giderek artan sağlık sorunudur. Anne, baba veya her ikisine bağlı olarak ortaya çıkabilen infertilitede baba faktörleri ürogenital sistem organlarının herhangi birinden kaynaklı olabilmektedir. Spermin yapısal (translokasyonlar) veya sayısal kromozomal (anöplidiler) bozuklukları, genetik mutasyonlar, geçirilmiş enfeksiyonlar, varikosel, azoospermi, oligospermi, astenospermi gibi olgular en sık karşılaşılan erkeğe bağlı infertilite sebepleri olarak sıralanabilmektedir.

İnfertilite tedavilerinde genellikle önce intrauterin inseminasyon (IUI) denenmekte, eğer başarı elde edilemezse tüp bebek olarak adlandırılan in vitro fertilizasyon tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Bu tedavi protokolleri için yapılması gereken uygulamalardan bir tanesi de sperm hazırlama işlemidir. Bu işlemde sperm sayısı, motilitesi (hareketliliği) ve morfolojisi temel parametrelerdir. Sperm motilitesi ise IUI uygulamalarının başarısını etkileyen en temel faktörlerin başındadır. Sperm motilitesinde yetersizlik veya yokluk olarak tanımlanan astenospermia (motilitenin %32'den az olması) erkek faktör kaynaklı infertilite olgularında büyük bir orana sahiptir. Laboratuvar koşullarında sperm parametrelerini geliştirmek için swim-up ve dansite gradiyent sistemleri gibi sperm hazırlama teknikleri rutin olarak kullanılan yöntemlerdir. Bunların yanı sıra sperm parametrelerini istenilen düzeylere getirebilmek amacıyla in vivo ve in vitro pek çok biyolojik veya kimyasal bileşenler de kullanılmaktadır.

Ketotifenin oral kullanımı ile sperm motilitesinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Astenospermili ve lökositospermili hastalarda yapılan çalışmalarda ketotifenin motilite ve normal morfoloji üzerindeki etkisinin değişkenliği gözlenmiştir. Ancak

ketotifen maddesinin sperm motilitesi üzerinde in vitro kullanımına dair bir çalışma henüz yapılmamıştır.

Çalışmamızda ketotifen etken maddesinin oral kullanımı ile sperm motilitisinde elde edilmiş olan olumlu etkilerin in vitro koşullarda semen örnekleri üzerine eklendiğinde elde edilip edilemeyeceğinin incelenmesi hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Erkek genital sistemini testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penis oluşturmaktadır. Testisler vücut dışarısında skrotum içinde yer alan tubulus rektus ve rete testisten oluşan sperm üreten, androjen salgılayan çift yönlü organlardır. Duktuli eferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius, üretra yapıları da dış kanalları oluşturmaktadır. Seminal veziküller, prostat bezi ve bulboüretral bezler yardımcı bezleri oluştururken; yapısında erektil doku bulunduran peniste çiftleşme organı olarak işlev görür (Kierszenbaum 2006, Junqueira and Carneiro 2009).

Genital kanallar ve yardımcı bezler, düz kas kasılması yoluyla spermatozoayı kanallara gönderen salgıları üretir. Bu salgılar aynı zamanda erkek üreme sistemi içinde bulunan spermatozoaların ihtiyaç duyduğu besin ihtiyacını karşılar. Spermatozoalar ile birlikte genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısı, penis yoluyla dışı üreme sistemine iletilecek olan semen sıvısını meydana getirir (Kierszenbaum 2006, Junqueira and Carneiro 2009, Ross and Pawlina 2009).

#### 2.1.1. Hipotalamo - Hipofizo - Gonadal Aks

Leydig hücre gelişiminden ve androjen sentezinden sorumlu insan koryonik gonadotropin (hCG) plasentadan salgılanması ile Leydig hücreleri gelişmeye başlar ve androjen sentezi meydana gelir (El Gehani, Zhang, Pakarinen, Rannikko and Huhtaniemi 1998). Erken gebelik döneminde fetal hipofiz sekresyon yeteneğine sahip durumdadır. Gebeliğin ortalarında FSH (Folikül Stimüle Edici Hormon) ve LH (Lüteinize Edici Hormon) yükselirken, gebeliğin son dönemlerinde hCG uyarısının kesilmesiyle birlikte Leydig hücrelerinde kısa süreli bir regresyon gözlenir. Bu regresyon FSH ve LH düzeylerinin düşmesine sebep olur (Majdic, Saunders and



Teerds 1998, Weinbauer, Gromoll, Simoni and Nieschlag 2000). Doğumun ardından 2-3. aylarda Leydig hücreleri tekrar farklılaşmaya başlar ve kısa süreli serum testosteron yükselmesi gözlemlenir (Main, Schmidt and Skakkebaek 2000). Bu yükselmenin ardından pubertal gelişime kadar Leydig hücreleri tekrar regresyona uğrar ve testisler ile hipotalamo-hipofizo-gonadal (HHG) aks sessiz bir döneme girer. Serum LH ve FSH düzeyleri 6-8, testosteron düzeyi 10-12 yaşlarında tekrar artış gösterirken, hipotalamustan Gonadotropin Releasing Hormonun (GnRH) pulsatil salınımı 12 yaşında başlar (Bradtke 1999).

GnRH, HHG aks ile hipofiz kan damarlarının yaptığı portal sistem içerisine salınır. Hipofiz hormonlarını düzenlemenin ve üreme fizyolojisinde önemli rol oynamanın yanı sıra ön hipofizden LH ve FSH salgılanmasını sağlar. LH ve FSH hormonları hücrel metabolizmayı uyarmak için Leydig ve Sertoli hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak, gonadal hormonların üzerinde inhibitör etkisi yaparlar. FSH Sertoli hücrelerini uyarak seminifer tübül epitelinde spermatogenezi başlatırken, LH intertisyumdaki Leydig hücrelerini uyarak testosteron üretimini sağlar. Testislerin önemli bir hormonu olan testosteron, erkeklerde LH sekresyonunun primer inhibitörüdür. Sertoli hücrelerinden sekrete edilen inhibin geri dönüş mekanizmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Bu inhibin form, inhibin B olarak adlandırılır. İnhibin, FSH'nin  $\beta$  subünitini kodlayan genlerin transkripsiyonunu inhibe ederek, gonadotroplarda FSH sekresyonunu engeller. Spermatogenetik aktivite düştüğünde inhibin konsantrasyonunu azalmasına neden olurken, FSH düzeyinde artışa neden olabilmektedir (de Krester and Robertson 1989, Clarke, Rao, Fallest and Shupnik 1993).

Diğer önemli hormonlardan biri ise prolaktindir. Gonadotropinlerle karmaşık bir ilişki içerisinde olan prolaktin, GnRH üretimini inhibe etmektedir. Yüksek prolaktin düzeyi androjen salgılamasını inhibe ettiği gibi merkezi sinir sistemini de doğrudan etkileyebilmektedir. Androjen verilen, yüksek prolaktin düzeyli bireylerde, prolaktin seviyeleri yüksek olduğu sürece libido ve cinsel fonksiyonun normale dönmediği gösterilmiştir (Bradtke 1999).

### **2.1.2. Spermatogenez**

Puberte ile birlikte başlayan spermatogenez olayı, spermatogoniumların spermatozoa haline dönüşmesini kapsayan olaylar bütünüdür. Puberteden hemen önce oluşan seminifer tübüllere eş zamanlı olarak germ hücreleri spermatogonial kök hücrelere dönüşürler. Bu dönüşümden sonra spermatogenezin başladığını işaret edecek olan Tip A spermatogonium üretimi meydana gelir. Kısıtlı mitotik bölünmelerle birlikte oluşan hücre kümelerinde Tip B spermatogonium oluşumu gözlenir. Ardından Tip B spermatogonium hücreleri de bölünerek primer spermatositleri meydana getirir. Primer spermatosit sürecinde 22 gün süren profaz evresi mevcuttur. Uzun süreli profaz evresinin ardından 1. Mayoz bölünme hızla tamamlanarak sekonder spermatositleri meydana getirir. Son olarak bu hücrelerden de 2. Mayoz bölünme esnasında 23 haploid kromozomlu spermatidler meydana gelir (De Jonge and Barratt 2006, Phillips, Gassei and Orwig 2010, Sadler 2012). Spermatogenezin hormonal kontrolünü hipofiz bezinden salgılanan LH sağlar. Hormonal süreç içerisinde LH leydig hücreleri reseptörlerine bağlanarak testosteron salınımını uyarır ve salınan testosteron hormonu sertoli hücrelerine bağlanarak spermatogenezini uyarır. Spermatogenezde ayrıca FSH testiküler sıvı yapımında önemli yer tutar (Tanagho and McAnnich 1992, Sadler 2012).

### **2.1.3. Spermiogenez**

Spermatogenez olayı ile primordial germ hücrelerinden farklı spermatidlerin, spermatozoonlara dönüşümü kapsayan olaylar bütünüdür. Bu dönüşüm esnasında akrozom oluşumu, çekirdeğin yoğunlaşması, baş, orta parça ve kuyruğun gelişimi, sitoplazmanın büyük bir kısmının dökülmesi gibi farklı değişimler meydana gelir. Bu değişimler yaklaşık olarak 74 gün sürer ve değişimlerin sonucunda ise spermatogonium olgun spermatozon haline dönüşmüş olur. Bu dönüşümle birlikte insanda her gün yaklaşık 300 milyon sperm üretilmiş olur. Sperm olgunlaşmasını tamamladıktan sonra seminifer tübül lümenine girer ve buradan duktus epididimise doğru iletilir. Sperm asıl motilitelerini duktus epididimiste kazanır (Tanagho and McAnnich 1992, Junqueira and Carneiro 2009, Sadler 2012).

#### **2.1.4. Olgun Spermium**

50–60 µm uzunluğunda hareketli bir hücre olan olgun sperm baş, orta kısım ve kuyruk olmak üzere 3 kısımdan oluşur;

- **Baş:** Akrozomla sarılı yassı oval biçimli bir çekirdekten meydana gelir. Çekirdeğin anterior (ön) yarısını akrozom örter ve bu kısımda proteazlar, asit fosfotazlar, hiyaluronidaz ve nöraminidaz gibi hidrolitik enzimler yer alır. Akrozomal enzimler görev olarak döllenme esnasında oositi saran korona radiata ve zona pellusidaya sperm girişini kolaylaştırmaktan sorumludurlar.
- **Orta parça:** Sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu bu tabakada, 9+2 mikrotübüler tabakada yer alır. Ayrıca orta parça ile baş arasında ikisini birbirine bağlayan bir çift sentriyolün bulunduğu kısa bir bölüm yer alır. Bu distal sentriyol orta parçanın merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapar. Orta parça mitokondriyel sarmalın annulusta bitmesiyle sonlanır.
- **Kuyruk:** Esas ve son parça olmak üzere iki kısımdan oluşan kuyruğun en uzun parçası esas parçadır. Esas parçada yedi dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonem ve fibröz yapıda kılıf yer alır. Son parça ise kısadır ve dış yoğun lifler ile fibröz kılıf sonlandığından sadece aksonem bulunur (Kierszenbaum 2006, Sofikitis et al 2008, Ross and Pawlina 2010).

#### **2.1.5. Fertilizasyonda Sperm**

Fertilizasyon öncesi gerçekleşmesi gereken iki önemli olay epididimlerde sperm maturasyonu ve dişi üreme kanallarında sperm kapasitasyonudur. Sperm epididimiste geçireceği 2 haftalık maturasyon sürecinden sonra ileri hareketlerini kazanırlar. Spermin uterusu kapasitasyon sürecine girmesi ise ejakülasyonla meydana gelir. Ejakülasyondan sonra uterusu kapasitasyonu gerçekleştiren sperm ovidukt kanalının ampulla bölgesinde ovum ile karşılaşarak, ovumun fertilizasyonunu gerçekleştirir. Korona radiata bölgesine yaklaşan sperm akrozomal reaksiyon sonucu hiyaluronidaz salgılar ve korona radiata hücreleri arası materyal erir. İlk sperm zona pellusidaya (ZP) ulaştığında ZP3 proteinine bağlanır. Bu bağlanma esnasında iç akrozomal membrandan akrozin salınımı meydana gelir ve ZP eritilir. Sperm oositin plazma zarıyla temasa geçer. Sperm zarındaki fertilin ile

oolemmadaki integrinler birbirine bağlanır. Spermin baş, orta ve kuyruk parçasının içeri girişi gerçekleşir ve bu olay zigot oluşumu ile sonlanır (Kierszenbaum 2006, Gedikli, Özbek ve Demirci 2013).

### **2.1.6. Semen**

Ejakülasyon sırasında semen, spermatozoanın konsantre süspansiyonundan oluşturulan vizköz, beyazımsı bir sıvıdır. İki epididimde depolanır, aksesuar cinsel organlardan gelen sıvı salgılarıyla karışır ve seyreltilir. İnsanda ejakülat miktarı ortalama 2-6 ml kadardır. Semen pH'sı 7,2-8,0 arasında değişkenlik gösterir. İnsan semeni ejakülasyonun hemen sonrasında koagule olur ve yaklaşık 20 dakika içinde yeniden çözülerek likefiye olur (World Health Organization, WHO 2010). Semen 300-500 bin sperm içeren %3-5 kadarlık kısmı testislerden; fruktoz, prostaglandinler, sitrat, magnezyum ve seminal veziküle özgü proteinler içeren %50-70 kadarlık kısmı seminal vezikülden; prostata özgün asit fosfataz, fibrinolizin, prostata özgün antijen, çinko, magnezyum ve amilaz içeren %15-30 kadarlık kısmı prostat bezinden; geriye kalan galaktoz, mukus ve siyalik asit içeren %3-5 kadarlık kısmı ise bulboüretal bezlerden üretilmektedir (Kierszenbaum 2006, Ross and Pawlina 2010, WHO 2010).

## **2.2. İNFERTİLİTE**

İnfertilite, bir çiftin cinsel yönden aktif olmasına ve doğum kontrol yöntemi uygulamamasına karşın bir yıl içerisinde gebelik elde edememesi durumudur ve giderek artan bir sağlık sorunudur. İnfertilite, çiftlerin yaklaşık olarak %25'inde erkeğe, kadına veya her ikisine bağlı nedenlerle meydana gelebilmektedir. Yalnızca kadın veya yalnızca erkeğe bağlı nedenlerden dolayı infertilite meydana gelmişse gebelik ihtimali yüksektir. Ancak sıklıkla görüldüğü gibi nedenler eşlerin her ikisinden kaynaklıysa gebelik ihtimali oldukça düşmektedir. İnfertil çiftlerin yaklaşık %15'i medikal tedavi arayışında buldukları halde, %5'i bu arayışa rağmen çocuk sahibi olamamaktadır. Daha önce hiç gebelik elde edilememişse primer infertilite, daha önce en az bir gebelik oluşmuş ancak infertilite meydana gelmişse sekonder infertilite olarak tanımlanmaktadır (WHO 2010, Jungwirth et al 2012).

### **2.2.1. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri**

Erkek infertilitesi; genital sistem enfeksiyonlarından, konjenital ya da kazanılmış ürogenital bozukluklardan, varikozel (skrotal ısı artımı), endokrin bozukluklardan, genetik hastalıklardan, immünolojik faktörlerden ve vücut kitle endeksinin (VKİ) artışından kaynaklı gerçekleşebilmektedir. İnfertil çiftlerin yaklaşık %30'unda erkeğe ait nedenler bulunmaktadır. Belirlenmiş bu nedenlere rağmen infertilite vakalarının yaklaşık olarak % 60-75'inde idiopatik (açıklanamayan) erkek infertilitesi de meydana gelebilir. İdiopatik infertiliteye; kronik stres, oksidatif stres, çevresel kirlenmeye bağlı endokrin bozukluklar ve genetik bozukluklar gibi çeşitli faktörler sebep olabilmektedir (Jungwirth et al 2012, Aktan ve ark 2013, Erdemir 2013).

#### **2.2.1.1. Pretestiküler nedenler**

Endokrin nedenler olarak da tanımlanabilen pretestiküler nedenlerde; hormon yetmezliği ya da hormonların aşırı salgılanması etkili olmaktadır.

- Adrenal bozukluklar: Testisin interstisyel hücre tümörlerinin tümü aralıklı olarak östrojen üretebilirler. Östrojen, primer olarak hipofizer gonadotropin salgılanmasını baskılayıp, testiküler yetmezliğe yol açabilmektedir.
- Hipofizer yetmezlik: Puberteden önce yetmezlik oluşursa, sürrenal ve tiroid yetmezliğiyle birlikte görülen büyüme geriliği tablosu meydana gelmektedir.
- Hipogonadotropik hipogonadizm: Hipotalamus ya da hipofizde anatomik veya fonksiyonel bir bozukluk sonucu LH ve FSH salınımının az olmasına bağlı endokrin yetmezlik ve spermatogenezin ve testesteron salınımının yokluğu ile kendisini gösterir. Cinsel açıdan gelişmiş erkeklerdeki hipogonadizm nedeninin çoğunlukla hipofizer bir tümördür (Jungwirth et al 2012).

#### **2.2.1.2. Testiküler nedenler**

##### **2.2.1.2.1. Kromozom anomalileri**

Kromozom anomalileri sayısal ya da yapısal olarak karşımıza çıkabilmektedir. Erkeklerde kromozom bozukluklarının %6,2 civarlarında olduğu ve erkeğin sperm sayısının 10 milyonun altına indiği durumlarda bu oranın %11 civarlarına kadar artış

gösterebildiği gözlemiştir. Aynı zamanda, azospermik hastaların da %21'inde önemli kromozomal bozuklukların olduğu belirlenmiştir. Klinefelter Sendromu, XX Hastalığı, XYY Sendromu, Noonan Sendromu, Miyotonik Distrofi, Bilateral Anorşi ve İzole Sertoli Hücresi Sendromu gibi kromozom anomalileri arasında gösterebilmek mümkündür (Jungwirth et al 2012).

#### **2.2.1.2.2. Genetik defektler**

En sık görülen genetik defektler;

- Kallmann sendromu: En yaygın X' e bağlı bozukluktur. Kallmann sendromlu hastalarda hipogonadotropik hipogonadizm mevcuttur; yarık damak, renk körlüğü, sağırılık, inmemiş testis ve renal anomaliler gibi vakalarla birlikte bulunabilir.
- Prader-Willi Sendromu: Kriptorşidizm (İnmemiş testis) ile karakterize olan bir defektir.
- Reifenstein sendromu (Androjen duyarsızlığı): Herhangi bir genital anomali olmamasına rağmen infertilite ile sonuçlanan androjen reseptör bozukluğudur.
- Kistik fibroz mutasyonları: Beyaz ırkta gözlenen en yaygın otozomal resesif genetik bozukluktur ve obstruktif azospermilerin (bilateral seminal kanal tıkanıklığına bağlı olarak semende ve ejakulasyon sonrası idrarda, hem spermatozoa ve hem de spermatogenetik hücrelerin bulunmama durumu) % 2' sinde bulunmaktadır (Hargreave 2000, Jungwirth et al 2012).

#### **2.2.1.2.3. Kriptorşidizm**

%2-5'lik oranıyla erkek genityasının en sık görülen doğumsal anomalisi kriptorşidizmdir. Yetişkin erkeklerde sık görülen, inmemiş testislerin 2 yaşından sonra deforme olduğu bir gelişme defektidir. Çift taraflı kriptorşidizm olgularında semen kalitesi bozuk olduğundan fertilite potansiyeli oldukça düşüktür (Chung and Brock 2011, Jungwirth et al 2012).

#### **2.2.1.2.4. Gonadotoksinler**

İlaçlar, testosteronu doğrudan engelleyerek androjen aktivitesini bloke edebilirler. Ayrıca hipofizer gonadotropinlerin salgılanmasını engelleyip östrojen seviyesini yükselterek infertiliteye neden olabilirler. Bunun yanı sıra az miktarda ışın, germ hücrelerini geri dönüşümlü şekilde hasara uğratarak, yüksek düzeyde ışın ise testislerde kalıcı zarar oluşturarak spermatogenezi etkiler. Bu kişilerin FSH seviyesi artar ve spermatogenez ancak 2-3 yılda normale döner. Bunların dışında çevresel toksinler, radyasyon, ağır metaller, organik çözücüler, pestisidler, mesleki kimyasal maruziyetler, alkol ve sigara kullanımı gonadotoksinler grubunda sayılabilir (American Society For Reproductive Medicine, ASRM 2008, Jungwirth et al 2012, Sezgin ve Hocaoglu 2014).

#### **2.2.1.2.5. Varikosel**

Varikosel, yetişkin erkek popülasyonunda %10-15, infertilite nedeniyle değerlendirilen bireylerde %21-41 arasında olmak üzere en sık görülen infertilite nedenidir. Spermatik venlerde kapakçıkların olmaması veya yetersiz olması yüzünden kanın reflüsü durumu oluşur. Bu durumda biriken kan ısı artışına neden olur ve testislerin fonksiyonu bozulmaya başlar. Diğer yandan testis içerisinde kan dolaşımı da bozularak, oksijen miktarındaki azalma nedeniyle iskemi (doku bozunması) gözlemlenir. Yinede varikosel ile erkek infertilite arasındaki ilişki tam olarak netleşmiş değildir. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) verilerine göre varikoselin fertilité üzerine etkileri semen anomalileri (sperm sayısı, motilité ve morfolojide bozulma), testiküler volümde azalma ve Leydig hücre fonksiyonunda azalmayla ilişkilidir (Jungwirth et al 2012, ASRM 2014).

#### **2.2.1.3. Posttestiküler nedenler**

Genital kanal obstrüksiyonları; enfeksiyon, immünolojik nedenler, cinsel fonksiyon bozuklukları veya vajen içine ejakulatın bırakılmasını önleyen anatomik deformasyonlar (Hipospadias, retrograd ejakulasyon, penil eğrilikler) neden olabilmektedir (Jungwirth et al 2012).

### **2.2.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi**

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde ilk ve temel yöntem spermiyogram (semen analizi) dır. Değerlendirme yapılırken tıbbi ve üreme öyküsü, fiziki muayene ve ilk semen analizinin normal olmadığı durumlarda ikinci kez semen analizi yapılması gereklidir. Bu değerlendirmeler sonucu oluşacak infertilitenin durumuna göre; ek semen analizi, endokrin değerlendirme, postejakulatuar idrar analizi, ultrasonografi ve genetik tarama testleri istenebilmektedir (WHO 2010, Satar ve Gençtar 2013).

#### **2.2.2.1. Semen analizi**

Erkeğe bağlı infertilitesinin araştırılmasındaki ilk adım olan semen analizi ilk etapta, en az 4 hafta ara ile 2 defa yapılmış olmalıdır. Semen, toplam spermatozoa sayısı ve bezlerin salgılama aktivitesini yansıtan ölçülebilir iki özelliğe sahiptir. Spermin; vitalite, motilite ve morfoloji özellikleri ve seminal sıvının bileşimi de sperm fonksiyonu için önemlidir. Semen analizi; semenin konsantrasyonu, kıvamı, pH'ı, likefaksiyon (erime) süresi, spermlerin sayısı, motilitesi, vitalitesi (canlılığı) ve morfolojisinin değerlendirilmesinde yardımcı olur (Eliasson 2003, De Jonge et al 2004, WHO 2010, Gökçe 2011, Satar ve Gençtar 2013).

##### **2.2.2.1.1. Semen toplaması**

Semen örneği geniş ağızlı, kapağı kilitlenebilen, steril ve polistrienden veya camdan yapılmış bir kaba ejakulatın tamamı kapta toplanacak şekilde mastürbasyon yoluyla verilmelidir. Semen toplamasında cinsel perhiz süresi en az 48 saat en fazla 7 gün arasına ayarlanmalıdır. Cinsel perhiz süresince gün başına sperm sayısında %25 artış meydana gelmektedir. Daha uzun perhiz sürelerinde ise semen volümünün ve yoğunluğunun artışı yanında; cansız, hareketsiz ve morfolojisi anormal sperm sayısında da bir artış olmaktadır. Sperm örneği dışarıdan laboratuvara getirilmesi pek önerilmemekle birlikte, eğer getirilecekse vücut ısısında ve 1 saat içinde ulaştırılmalıdır (Pellestor, Girardet and Andreo 1994, Delilbaşı 2008).



### 2.2.2.1.2. Semen makroskopik incelenmesi

- Likefaksiyon: Semen oda sıcaklığında yaklaşık olarak 60 dakika içinde likefiye olmaktadır. Likefaksiyon prostattan salgılanan proteolitik enzimler meydana gelir. Semen inkübatöre alınması durumunda 37°C'de 20 dakika içerisinde likefiye olabilmektedir. Likefaksiyon süresinin 60 dakikayı geçmesi veya olmaması patolojik olup, prostatik enzim eksikliğini veya prostat fonksiyonunun yetersiz olduğunu göstermektedir (Gökçe 2011, Tapısız, Altınbaş, Abike ve Göktolga 2012).
- Volüm: Semen volümü (hacim) için ortalama parametre değeri 1,5 ml'dir. Semen volümünün 1 ml'den az olması durumu hipospermik olarak tanımlanmaktadır. Düşük semen volümleri, ejakülatuar kanal obstrüksiyonu, örnek toplama problemi, retrograd ejakülasyon ve androjen eksikliğinin de belirtici olabilir. Yüksek semen volümleri, aksesuar bezlerin aktif inflamasyonunda gözlenen aktif eksudasyonun veya uzun cinsel perhiz süresinin bir yansıması olabilir (Delilbaşı 2008, Gökçe 2011).
- Renk: Normal semenin görünümü homojen, mat beyaz-gri ve opaktır. Cinsel perhiz süresinin uzamasına bağlı olarak ve pyospermide (semende 2 milyon/ml'nin üzerinde lökosit) renk sarıya dönebilir. Semen içinde eritrosit varlığında ise renk kırmızı-kahverengi bir görünümde olacaktır. Uzun süreli antibiyotik kullanımlarında veya şiddetli infertilite durumlarında semen transparan bir görünüm alabilmektedir (Gökçe 2011, Tapısız ve ark 2012).
- Koku: Semen kokusunun prostat salgılarından kaynaklanan sperm oksidasyonu sonucu ortaya çıktığı öngörülmektedir. Kokusu at kestanesi çiçeğine benzetilmektedir ancak kokusu da rengi gibi cinsel perhiz süresi ve enfeksiyon varlığına göre değişebilmektedir (Delilbaşı 2008, Tapısız ve ark 2012).
- pH: Normal semen pH'sı 7,2 ile 8 arasında kabul görmektedir. Likefaksiyon sonrası ortalama 30-60 dakika içerisinde pH değerlendirmesi yapılmalıdır. pH'ın 7,2'nin altında olması boşaltım kanalları obstrüksiyonu, aksesuar bez agenzisi yada idrarın semene karıştığı durumlarda meydana gelebilmektedir. Akut enfeksiyonlarda yada ölçümün geç yapılması gibi durumlarda pH 8'e kadar çıkabilmektedir (Delilbaşı 2008, Tapısız ve ark 2012).

- Viskozite: Normal semen hafifçe visközür. Vezikulo seminalisin hipofonksiyonundan kaynaklı olarak viskozitede artış meydana gelebilir. Yüksek viskozite sperm motilitesini ve konsantrasyonunu olumsuz yönde etkilerken intrauterin inseminasyon (IUI) ve in vitro fertilizasyon (IVF) başarısını da düşürebilmektedir. Likefaksiyondan sonra semen, geniş kalibreli tek kullanımlık plastik pipet içinden aspire edilerek, yerçekimiyle damlamaya bırakıldığında oluşan iplikçığı gözlemlenir. Normal semen pipetten belirgin küçük damlalar şeklinde düşer. Viskozite anormal ise damla 2 cm'den uzun iplikçik oluşturur. Bu sayede numunenin viskozitesi tahmin edilebilmektedir (Delilbaşı 2008, WHO 2010, Tapısız ve ark 2012).

#### **2.2.2.1.3. Semen mikroskopik incelenmesi**

- Sperm sayısı ve konsantrasyonu: Semende bulunan sperm sayılarını belirlemek için Neubauer hemositometre, Makler kamarası veya tek kullanımlık sayım cihazları kullanılabilir. WHO tarafından son olarak 2010 yılında belirlenen kriterlere göre normal değerler; spermatozoa/ml için  $15 \times 10^6$ , toplam sperm sayısı için ise  $39 \times 10^6$  olarak belirlenmiştir (WHO 2010, Tapısız ve ark 2012). Normalden az sperm konsantrasyonu olması durumu oligozoospermia, normalden fazla sperm konsantrasyonu ( $250 \times 10^6$ ) olması durumu ise polizoospermia olarak tanımlanmaktadır. Mikroskopik incelemede hiç sperm görülmemesi durumunda yeni preparat hazırlanması önerilmektedir (Delilbaşı 2008, WHO 2010, Tapısız ve ark 2012).
- Sperm motilitesi: Spermin ileri hareketlilik derecesi gebelik oranlarıyla ilişkilidir. Fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için spermatozoonların aktif hareketli olmaları gerekir. Semen içindeki sperm motilitesi, dehidratasyon, pH ve ısı değişikliklerinin motilite üzerine zararlı etkilerini sınırlandırmak için numunenin likefaksiyonundan sonra en kısa zamanda; tercihen 30 dakika, en fazla 1 saat içerisinde değerlendirilmelidir. Total hareketlilik için en düşük referans değer %40 iken, progresif hareketlilik için bu değer %32'dir. WHO tarafından motilitenin değerlendirilmesinde spermleri progresif hareketli, nonprogresif hareketli ve hareketsiz şeklinde sınıflandıran yöntem önerilmektedir. Sperm hücresinin doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde

hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket etmesi progresif hareket, çok küçük daireler şeklinde, kuyruğun hareketiyle baş kısmının çok zor olarak yer değiştirmesi ya da sadece kuyruğun hareket etmesi yani ilerleyici olmayan hareketlerin tamamı nonprogresif hareket ve hiç hareket olmaması ise hareketsiz olarak tanımlanmaktadır (Delilbaşı 2008, WHO 2010, Gökçe 2011, Tapısız ve ark 2012). Semen örneği motilite açısından değerlendirilirken kullanılan bazı terminolojiler mevcuttur. İleri hareketli spermilerin yüzdesinin alt referans limiti olan %32'nin altında olması durumu astenospermia olarak tanımlanmaktadır. Sperm hareket bozukluklarına enfeksiyon, bakteri ve bakteri ürünleri, sitokinler, anormal spermatozoa gibi pek çok faktör sebep oluşturabilmektedir. Hareketsiz spermeler de immotil sperm olarak tanımlanmaktadır ancak immotil spermelerin ölü olarak tanımlanması yanlıştır. İmmotil spermeler hareketsiz olmalarına karşı canlı olabilmektedirler (Curi et al 2003, Delilbaşı 2008, Ok, Özyurt ve Gülekli 2009, WHO 2010).

- Sperm morfolojisi: Spermin normal kabul edilebilmesi için, baş düzgün, düzenli sınırlı, genellikle oval şekilli olmalı ve baş alanının % 40–70'ini kaplayan akrozom bölgesi mevcut olmalıdır. Akrozom bölgesi; sperm başının % 20'sinden fazlasını kaplamamalı ve post-akrozomal bölgede herhangi bir vakuol bulunmamalıdır. Orta parça ince, düzenli sınırlı, yaklaşık sperm başı uzunluğunda olmalı ve ana eksenini sperm başının ana eksenine aynı hizada olmalıdır. Ana parça, uzunluğu boyunca aynı genişlikte olmalı, orta parçadan ince ve yaklaşık olarak baş uzunluğunun 10 katı civarında olmalıdır. Kuyruk kendi üstüne geriye doğru halka şeklinde kıvrılabilir. Normal şekilli spermin yapısında defektlere bağlı olarak baş, boyun-orta kısım, kuyruk ve sitoplazma kalıntıları gibi malformasyonlar meydana gelebilmektedir. WHO kriterlerine göre normal morfolojili spermatozoa oranının < %4 olması teratozoospermi olarak tanımlanmaktadır. İnsan sperminin morfolojik değişkenliği değerlendirme açısından zorluklara neden olmaktadır. Değerlendirmenin en doğru yapılabileceği sperm morfolojileri kadın genital sisteminde ya da zona pellusida yüzeyinde izlenmektedir (Kayıkçı, Çam, Akman ve Erol 2002, Chemes and Rawe 2003, WHO 2010, Erdemir, Fırat ve Gençten 2011).

- Sperm vitalitesi: Spermin vitalitesi hücrelerin membran bütünlüğü ile tanımlanmaktadır. Canlı sperm oranı belirlenirken boyama testleri Eosin Y (Eosin-nigrosin) veya HOS (hipoozmotik şişme) testleri uygulanarak toplam 200 hücre sayılır. Boyama testleri uygulanırken ölü hücrelerde bulunan hasarlı plazma membranlarının, membrana penetre olmayan boyaların hücre içine girmesine izin vermesi, o hücrelerin ölü olduğunu gösterir. WHO kriterlerine göre özellikle ileri hareketli sperm oranı  $\leq$  %40 ise canlılık testinin mutlaka yapılması önerilmektedir (Kayıkçı ve ark 2002, WHO 2010, Gökçe 2011).
- Sperm dışı hücreler: Epitelyum ve prostat hücreleri ile spermatogenik hücreler ve lökositler gibi yuvarlak hücreler semende sperm haricinde bulunan sperm dışı hücrelerdir. Normal bir semende lökosit sayısı  $< 1 \times 10^6$ /ml olmalıdır. Bu değerden büyük olduğunda lökosit testi yapılması gerekir ve bu durum lökospermi olarak tanımlanmaktadır. Lökosit sayısını belirlemede intraselüler peroksidaz varlığı ve lökosit spesifik antijen testleri kullanılır. İntraselüler peroksidaz varlığına dayalı testte lökositler kahverenge boyandıklarından diğer hücrelerden ayrımı yapılabilir hale gelmektedir (Ok ve ark 2009, WHO 2010, Tapırsız ve ark 2012).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. GEREÇLER

- Makler Kamarası
- Etüv
- Işık Mikroskobu
- Mikropipet
- Mikropipet Ucu
- Pastör Pipeti
- Vorteks
- Santrifüj
- pH Metre
- Falkon Tüpü
- Deney Tüpü
- Eppendorf Tüpü
- Lam
- Lamel
- Kronometre
- Enjektör
- Numune Kabı
- Isıtıcı Tabla
- Hassas Terazî
- Kamera Ataçmanlı Mikroskop

## 3.2. KİMYASALLAR

- Ketotifen
- HEPES
- Distile Su
- Vitalite Boyası
- İmmersiyon Yağı
- Entellan

## 3.3. YÖNTEMLER

### 3.3.1. Hazırlık Aşaması

#### 3.3.1.1. Hasta gruplarının belirlenmesi

Çalışmaya Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik İlaç Dışı Etik Kurulu'ndan 09.12.2014 tarihli onay alınmasını müteakiben başlanmıştır. Etik kuruldan alınan onayla Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji polikliniğine herhangi bir nedenle başvuran ve bilgilendirilmiş onam formunu imzalamak suretiyle çalışmaya katılmayı kabul eden;

- 18-50 yaş arası,
- asthenospermia tanısı alan (sayı  $\geq 20$  milyon/ml, motilite  $\leq 32\%$ ),
- daha önce herhangi bir tedavi protokolünde yer almamış, gönüllülerin semen örneklerinde çalışma gerçekleştirilmiştir.

Kırk hastada gerçekleştirilen çalışmada aynı hastaya ait semen örnekleri kontrol ve deney grupları olmak üzere iki gruba ayrılmıştır;

Kontrol grubu: Asthenospermia+kontrol solüsyonu (n:40)

Deney grubu: Asthenospermia+0,24 mM ketotifen solüsyonu (n: 40)

### **3.3.1.2. Örneklerin toplanması**

- Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle Androloji Laboratuvarı'na gelen hastalardan, hastanın adı ve soyadının yazılı olduğu steril kaplara, mastürbasyon yöntemi ile alındı.
- Semen örneklerinin alındığı saat not edildi.
- Alınan semen örnekleri etüvde 37°C'de likefiye olması için 20 dakika boyunca bekletildi.
- Turnusol kağıdı ile pH (7,2-8,0) değerlendirmesi yapıldıktan sonra hastanın cinsel perhiz süresi, semen örneğinin viskozitesi (normal), hacmi (2-6 ml) ve rengi kaydedildi.

### **3.3.1.3. Solüsyon hazırlanması**

- Deney grubu için hassas terazide tartılan 1 mg toz halinde ketotifen 1 ml HEPES solüsyonu içerisinde çözdürüldü.
- Meydana gelen bu solüsyonun üzerine 9 ml distile su ilave edilerek karıştırıldı.
- Kontrol grubu için ise 1 ml HEPES solüsyonuna 9 ml distile su ilave edilerek kontrol solüsyonu taze olarak hazırlandı.
- Solüsyonlar uygulama öncesinde taze hazırlanarak kullanıldı.
- Çalışma için doğru dozun belirlenmesi aşamasında 1, 3, 5 ve 10 mg toz ketotifen denenmiştir.

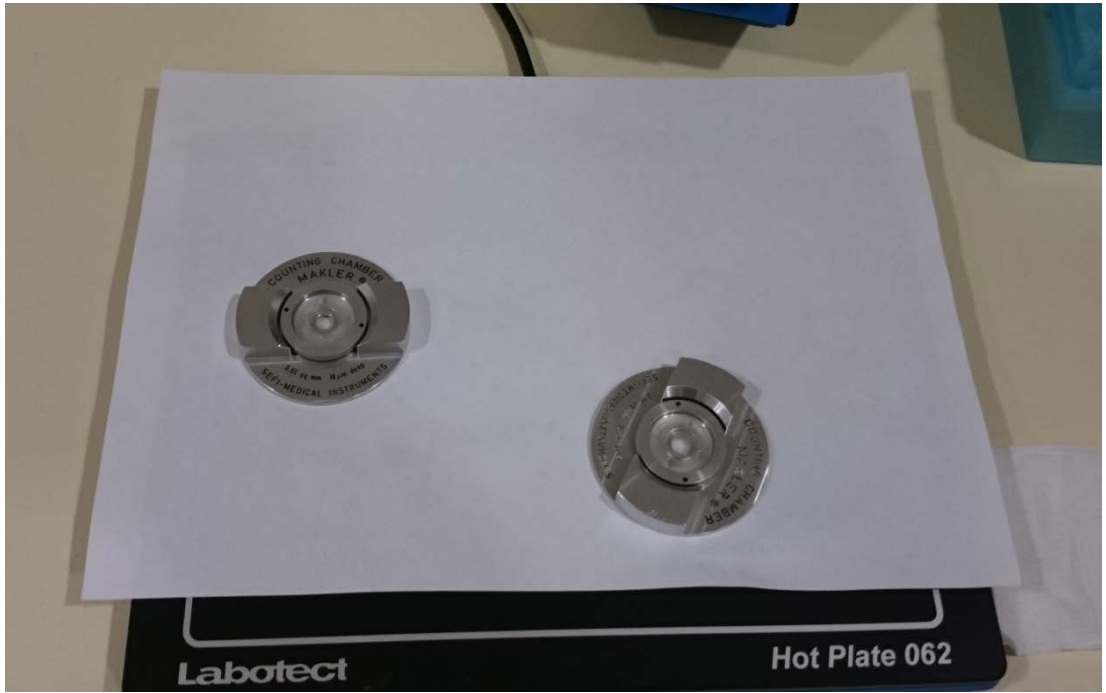
## **3.3.2. Uygulama Aşaması**

### **3.3.2.1. Solüsyon uygulanması**

- Astenospermia tanısı alan hastaların semen örneklerinden eşit miktarda (0,5 ml) alınarak deney ve kontrol oluşturuldu. Deney grubuna 0,24 mM hazırlanan ketotifen solüsyonu 1:1 oranında falkon tüpü içerisine ilave edilerek pipetlendi.
- Kontrol grubuna ise 1:1 oranında semen ve kontrol solüsyonu ilave edilerek pipetleme yapıldı.
- Son olarak kontrol ve deney grupları ısıtıcı tabla üzerinde 5-10 dk kadar bekletildi.

### 3.3.2.2. Motilite değerlendirmesi

- Sperm motilite ve sayısını belirlemek için standart manuel teknikler uygulandı.
- Motilite ve konsantrasyon değerlendirmesi ışık mikroskobunda makler sayım kamarasında gerçekleştirildi.
- Makler kamaraya 10 µl semen-solüsyon karışımı koyularak, X20 objektif büyütmesi altında, kare sistemi gözetilerek 10 kare sayıldı.
- Sayılan miktarlar  $10^6$  ile çarpılarak ml'deki sperm sayısına ulaşıldı.
- Bulunan sayısal değerler WHO (2010) kriterlerine göre motilite yönünden değerlendirme için ileri hareket, yerinde hareket ve hareketsiz olmak üzere 3 grup altında not edildi.

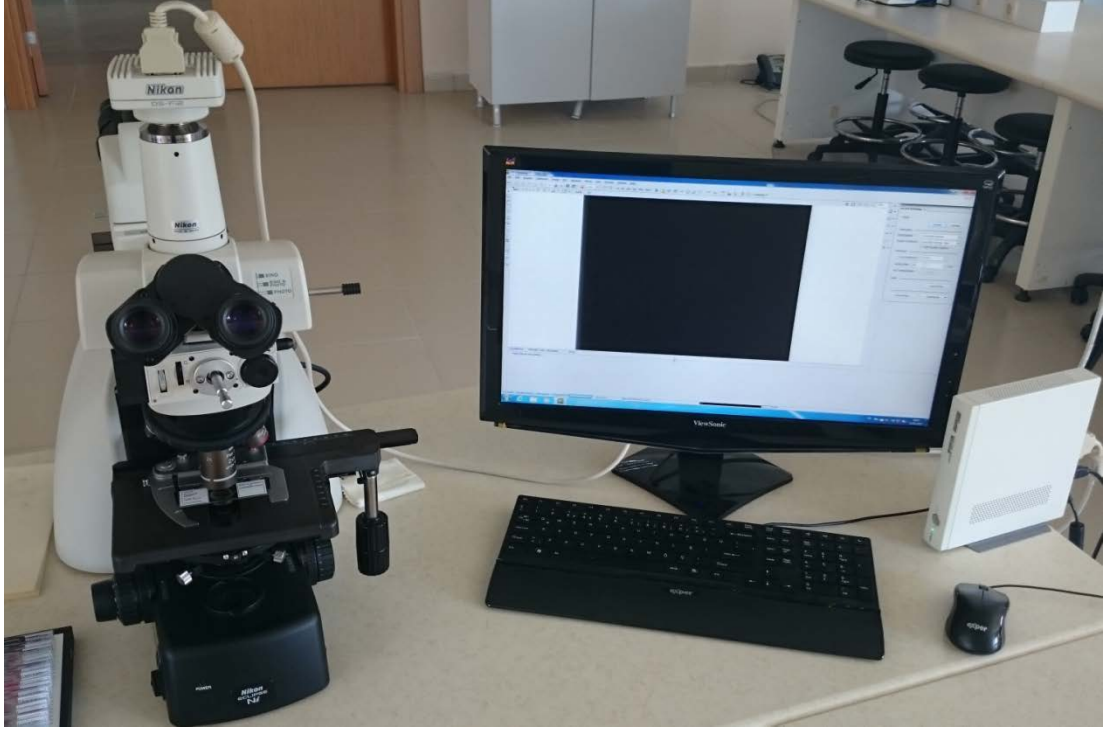


Resim 1. Makler kamarası



### 3.3.2.3.Vitalite değerlendirmesi

- Çalışmada vitalite testleri Eosin-Y vitalite boyası kullanılarak gerçekleştirildi.
- Hastalardan alınan semen numuneleri iyice karıştırıldıktan sonra kontrol ve deney grubu içerisinden 50 µl semen alınarak iki ayrı deney tüpü içerisine koyuldu.
- İki deney tüpüne de 2 damla Reagent 1 (Eosin Y solüsyonu) damlatıldı.
- 30 sn sonra 3 damla Reagent 2 (Nigrosin solüsyonu) eklenerek dikkatlice karıştırıldı.
- Eosin boyası hücreleri boyamada, nigrosin boyası ise zemin boyası olarak kontrast yaratmada kullanıldı.
- Reagent 2 boyasının eklenmesini izleyen 30 sn. içinde semen boya karışımından bir damla alınarak lam üzerine konuldu ve semen yayma yapıldı.
- Yapılan yayma kuruyana kadar bekletildi ve X100 objektif büyütmesinde, ışık mikroskop altında değerlendirildi.
- 100 adet sperm sayılarak pembe görülen veya genel olarak beyaz görünmeyen hücreler l olarak kabul edildi.
- Sonuçlar permeabilitesi bozulan sperm in boya alarak pozitif renk vermesine göre yüzde olarak değerlendirildi.



Resim 2. Kamera ataçmanlı mikroskop

### 3.3.3. İstatistiksel Analiz

- Çalışmada kullanılan değişkenlere ait verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov normallik testi ile değerlendirildi.
- Kontrol grubu ile deney grubunun motilite ve vitalite karşılaştırmalarında bağımlı iki örneklem t testi kullanıldı.
- Hem kontrol hem de deney gruplarının motilite karşılaştırmalarında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi, çoklu karşılaştırma testi olarak ise Bonferroni testi kullanıldı.
- Motilite ve vitalite oranları aritmetik ortalama (Ort) ve standart sapma (SS) biçiminde gösterildi. p değerleri 0,05'in altında hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.
- Hesaplamalar SPPS 22 paket programı ile yapıldı (IBM SPSS Statistics, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

## 4. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen 40 astenospermia hastasının, Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Androloji Laboratuvarı'nda yapılan semen analizleri, motilite ve vitalite parametreleri WHO 2010 kriterlerinin referans değerlerine göre gerçekleştirilmiştir. Semen örneklerinde sperm motilitesi %32 ve altı olan hastalar astenospermia olarak kabul edilmiştir. Hasta semen örneklerine motilite ve vitalite değerlendirmeleri öncesi yapılan pH, viskozite ve hacim değerlendirmelerine ait ortalama değerler Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. Hastaların pH, viskozite ve hacim ortalama değerleri.

<b>Değerlendirme</b>	<b>Normal değerler (WHO 2010)</b>	<b>Ortalama hasta değerleri</b>
<b>pH</b>	7,2-8	7,3
<b>Viskozite</b>	+	++
<b>Hacim(ml)</b>	2-6	3,6

### 4.1.MOTİLİTE BULGULARI

Kontrol grubu semen örneklerinin A, B, C grubu motilite hareketleri arasındaki oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve tabloda belirtilmiştir (p=0.001) (Tablo 2).

Deney grubu semen örneklerinin A, B, C grubu motilite hareketleri arasındaki oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, tabloda belirtilmiştir (p=0.001) (Tablo 2).

Işık mikroskopik olarak makler sayım kamarasında yapılan gözlemler sonucu kontrol grubu ile deney grubu arasında progresif motilite (A) yönünden yapılan karşılaştırmalarda kontrol grubuna oranla deney grubu sperm motilitelerinde gözle görülür artışlar tespit edilmiş, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ) (Tablo 2).

Yapılan gözlemlerde kontrol grubu içerisindeki nonprogresif motil (B) sperm sayısının, deney grubunda azaldığı görülmüştür. Bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,003$ ) (Tablo 2).

İki grup arasında hareketsiz (C) motilite yönünden yapılan karşılaştırmalarda deney grubu içerisindeki hareketsiz spermlerin belirli bir süre sonra hareketlenmeye başladığı tespit edilmiştir. Deney grubunda yer alan hareketsiz sperm sayısının kontrol grubuna oranla önemli ölçüde azaldığı görülmüş ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ) (Tablo 2).

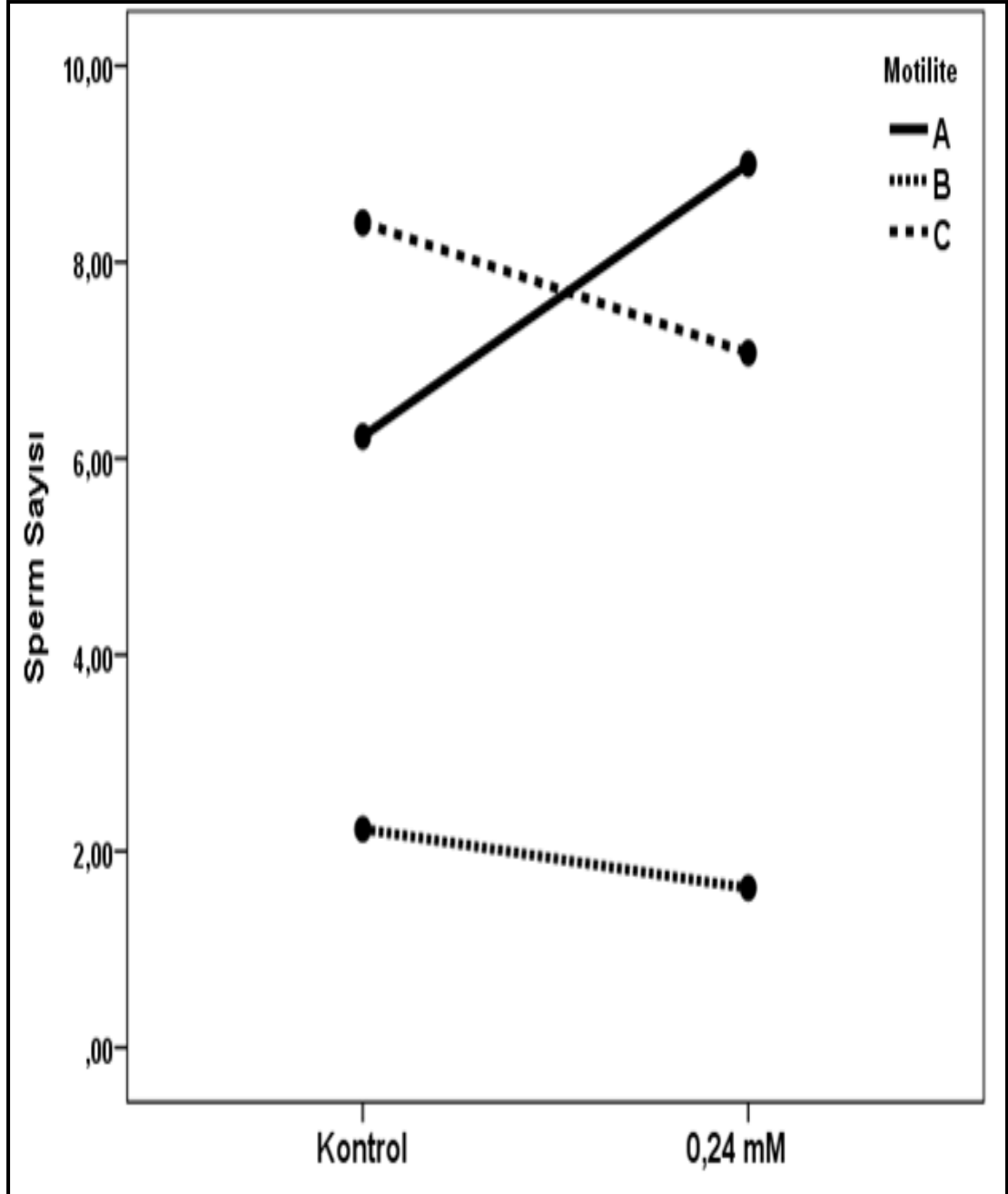
Tablo 2. Kontrol grubu ile Deney grubu arası motilite yönünden karşılaştırma.

Motilite (Milyon/ml)	Kontrol	Deney Grubu	p
	Grubu		
	Ort±SS		
<b>Progresif (İleri) Motilite (A)</b>	6,23±3,15	9±3,19	<b>&lt;0,001</b>
<b>Nonprogresif (Yerinde) Motilite (B)</b>	2,22±1,23	1,63±0,81	<b>0,003</b>
<b>Hareketsiz Motilite (C)</b>	8,4±3,43	7,07±2,63	<b>&lt;0,001</b>
<b>p</b>	<b>&lt;0,001 *</b>	<b>&lt;0,001 *</b>	

\*: Tüm gruplar birbirlerinden farklı

Motilite deęerlendirmelerinde uygulanan dięer dozlar olan 3, 5 ve 10 mg ketotifenin uygulanmasında motilite açısından bir artış olmamiř aksine bu doz deęerlerinde motilitenin dūřtūęu gōrūlmūřtur.

Kontrol ve deney grubu (0,24 mM) arasında A, B, C motilite ortalama değerleri yōnunden karşılaştırmalar Şekil 1.' de verilmiştir.



Şekil 1. A, B, C ortalama motilite karşılaştırması.

## 4.2. VİTALİTE BULGULARI

Eosin-Y boyası kullanılarak yapılan vitalite testlerinde Kontrol grubu ile Deney grubu arasında canlı sperm yüzdesi yönünden yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak bir fark saptanmadı ( $p=1,000$ ) (Tablo 3).

İki grup arasında ölü sperm yüzdesi yönünden yapılan karşılaştırmalarda kontrol grubu ile deney grubu arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı ( $p=1,000$ ) (Tablo 3).

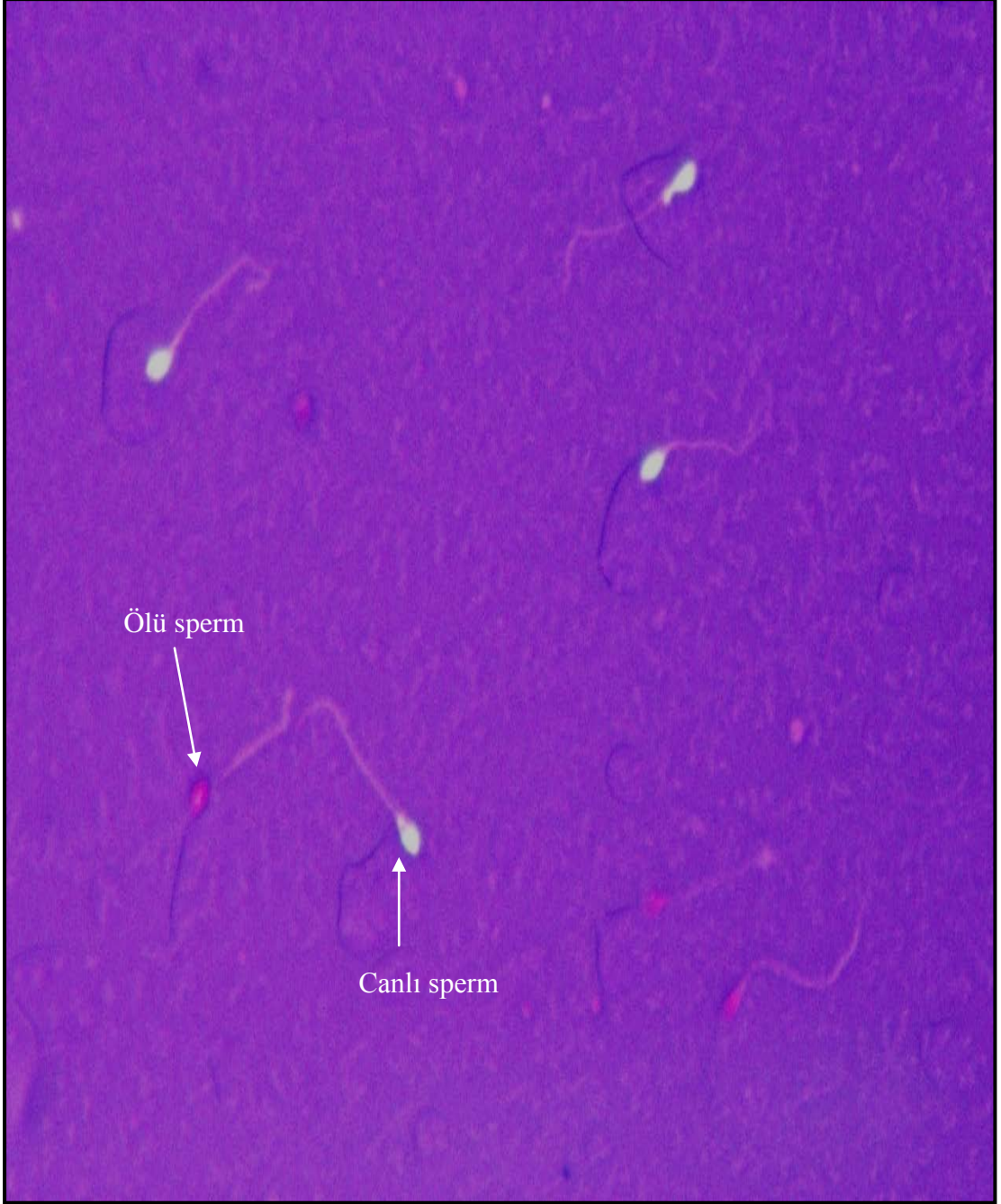
Kontrol grubunun ölü-canlı sperm yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0.022$ ) (Tablo 3).

Deney grubunun ölü-canlı sperm yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0.017$ ) (Tablo 3).

Tablo 3. Kontrol grubu ile Deney grubu arası vitalite yönünden karşılaştırma.

Vitalite	Kontrol Grubu	Deney Grubu	P
	Ort±SS		
Canlı Sperm (%)	56,33±9,48	56,33±9,04	1,000
Ölü Sperm (%)	43,67±9,48	43,67±9,04	1,000
p	0,022	0,017	

Vitalite değerlendirmelerinde uygulanan diğer dozlar olan 3, 5 ve 10 mg ketotifenin uygulanmasında ölü sperm sayılarında artış gözlenmiş ve 10 mg uygulanan dozda neredeyse hiç canlı sperm izlenememiştir.



Resim 3. Kontrol grubu vitalite boyaması.





Resim 4. Deney grubu vitalite boyaması.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal gebelik şansı elde edilmesinde spermin sayısı ve morfolojisinin yanında motiliteside önemli bir yer tutmaktadır. Astenospermia erkek infertilitesinde gerek doğal gebelik şansını gerekse yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarını etkileyen önemli bir sorundur. Fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için spermlerin aktif hareketli olmaları gerekmektedir. Bu nedenle sperm motilitesini arttırarak gebelik şansını yükseltmek adına çeşitli etken maddeler in vivo ya da in vitro olarak kullanılmaktadır.

İnfertilite sebebiyle başvuran çiftlerin fizyolojik yoldan çocuk sahibi olamayanlar üremeye yardımcı tekniklere yönelirler. Bunlardan günümüzde en çok tercih edilenleri IUI (İntra Uterin İnseminasyon), IVF (İn Vitro Fertilizasyon) ve ICSI (İntra Sitoplazmik Enjeksiyon) yöntemleridir (ASRM 2011).

IUI yöntemi ovulasyona yakın uterin kaviteye, çeşitli mediumlarla yıkanmış ve iyi motilite kazandırılmış semeninin konsantre halde uterus içerisine bir kanül vasıtasıyla verilmesidir. Diğer tedavilere başlamadan önce ilk seçenektir. IUI, genellikle oligospermi, astenospermia, teratospermi, anatomik defektler ve retrograd ejakülasyon gibi ejakülatör disfonksiyonlarda uygulanmaktadır. Ayrıca IUI, açıklanamayan infertilite, yetersiz servikal mukus ya da servikal stenoz gibi servikal faktörün neden olduğu kadın faktörlü infertilite olgularında da kullanılmaktadır. IUI, en az  $10 \times 10^6$ /ml sperm olduğunda yapılmaktadır.  $10 \times 10^6$ /ml daha az sperm sayısı, IVF gibi daha ileri tedavilerin gerekli olduğunu göstermektedir (Tomlison, Amisshah-Arthur, Thomposon, Kasraie and Bentick 1996, Koli, Anil, Ramya, Patil and Swamy 2013).

IVF ile ET, fallop tüplerinin yokluğu ya da tıkanıklığında, mukus anomalilerinde, açıklanamayan infertilitede, immünolojik infertilite ya da çok düşük sperm sayısı

olan erkeklerde kullanılan yaygın bir yaklaşımdır. Ovulasyonu başlatmak için fertilite ilaçları kullanılmaktadır. Ultrasonografi ve hormon analizleriyle, foliküler gelişim ve oosit olgunlaşması sık sık izlenmektedir. İzlem genellikle siklusun 5. gününde başlamakta ve ilaçlar bireysel yanıtı göre ayarlanmaktadır. Foliküller matür görüldüğünde, son oosit matürasyonunun uyarılması ve ovulasyon indüksiyonu kontrolü için hCG verilmektedir. hCG'den yaklaşık 35 saat sonra toplanan oositler ultrasonografi eşliğinde, hazırlanan sperm ile laboratuvarında fertilize edilmektedir. 1-2 gün sonra fertilize ovum uterusu gönderilmektedir. Ayrıca hCG'nin embriyo transferi sonrası verildiği durumlarda daha yüksek gebelik oranları gözlenmiştir (Kaplan, Katz, Thompson and Freund 2002, Vlasisavljevic 2007, ASRM 2011).

ICSI ise tek bir spermatozoanın oosit sitoplazması içerisine mikroskop altında mikroenjeksiyonudur. Sperm sayısının az, sperm morfolojisinin ileri derece bozuk, klasik IVF yöntemi ile başarısız olunmuş, preimplantasyon genetik tanı (PGD) uygulanacak olan ve nedeni açıklanamamış infertilite olgularında uygulanmaktadır (Devroey and Steirteghem 2004, ASRM 2011).

Erkek infertilitesinin tedavisinde amaç fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için düzeltilebilen patolojilerin spesifik tedavisini sağlamaktır. Medikal veya cerrahi tedaviler kalıcı iyileşmenin sağlanması amacıyla uygulanabilmektedir. Hipogonadotropik hipogonadizm, izole LH ve FSH yetmezliği, hiperprolaktinemi gibi patolojilerde medikal tedavi uygulanırken; varikosel ve duktal obstruksiyonlar gibi patolojilerde ise cerrahi tedaviler uygulanmaktadır.

Patolojiye spesifik tedavinin mümkün olmadığı durumlarda ise, yine cerrahi yöntemlerle vaza deferens, epididim veya testisten sperm elde edilip, bu spermle üremeye yardımcı teknikler uygulanmaktadır (Çayan 2006, Pagani, Cocuzza and Agarwal 2009).

Medikal tedavi yöntemleri infertilite tedavisinde spesifik ve ampirik olarak ikiye ayrılmaktadır. Hipogonadotropik ve hipergonadotropik hipogonadizm gibi endokrin bozukluklar, pyospermi (lökospermi), immünolojik infertilite, ejakülasyon

bozuklukları ve gonadotoksinler gibi infertilite nedenlerinde spesifik tedaviler uygulanmaktadır (Gunalp 2004, Çayan 2006).

Ampirik tedavi hormonal ve non-hormonal olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Hormonal tedaviler içinde GnRH tedavisi, gonadotropinler, testosteron tedavisi, antiöstrojen tedavi, aromataz inhibitörleri, sayılabilirken; hormonal olmayan tedaviler içerisinde ise nonsteroidal antiinflamatuvar ajanlar, pentoksifilin, antioksidanlar ve mast hücre inhibitörleri yer almaktadır (Buchter, Behre, Kliesch and Nieschlag 1998, Çayan 2006).

GnRH hipofizer FSH ve LH üretimini arttırıcı kısmi fizyolojik ajan rolündedir. Tedavide olumlu sonuç için uygun doz ve salınım sıklığı önem taşır. İntranazal sprey şeklinde 0,1-0,5 mg/gün veya pompa ile subkutan enjeksiyon şeklinde 5µg/2h 6 ay süre ile kullanımı önerilmektedir (Buchter et al 1998).

Gonadotropinlerin, sperm parametreleri ve gebelikte meydana getirdiği olumlu tedaviler tartışılmakla birlikte uzun süreli kullanımında antikor gelişebilmektedir. Yapılan çalışmalarda genel olarak haftada 3 kez, 3-6 ay boyunca 150-300 I.U. tedavisi uygulanmış ancak gebelik oranlarında çok yüksek artış oranlarına rastlanamamıştır. Libido değişimi ve akne gibi yan etkileri bulunmaktadır. Yüksek dozda kullanımında östradiol seviyesinde meydana gelen artış sebebiyle semen kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir (Liu and Handelsman 2003).

Antiöstrojenler, idiyopatik erkek infertilitesi tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hipofizden LH salınımını kontrol ederek testiste üretilen testosteron oranını arttırmak amaçlanır. Klomifen sitrat ve tamoksifen yaygın olarak kullanılan antiöstrojen ajanlardır. Günlük uygulanan 25 mg klomifen sitrat tedavisi kısa periyotta testosteron üretiminin uyarılmasında etkili olmaktadır. Hastaların genç olması daha serum testosteron seviyesindeki artış oranını yükseltmektedir. Semptomatik erkek testosteron eksikliği olan hastalar için bir tedavi seçeneği olarak önerilmektedir (Da Ros and Averbek 2012).

3 ay boyunca günlük 25 mg klomifen sitrat uygulanan idiopatik infertil erkek hastalarda motilitenin ve normal morfolojiye sahip spermelerin arttığı tespit edilmiştir (Moradi et al 2010). Tamoksifen ile yapılan tedavi başarı oranları klomifenle benzerlik göstermektedir. 3 ay boyunca günde 2 defa 10 mg tamoksifen uygulandığında şiddetli oligozoospermik erkeklerde sperm yoğunluğunda artış ve ölü sperm sayılarında plasebo uygulanan gruba göre önemli derecede azalma tespit edilmiştir (Kotoulas, Cardamakis, Michopoulos, Mitropoulos and Dounis 1994).

İdiopatik (açıklanamayan) infertilite, 1 yıl korunmasız cinsel ilişki sonrası gebelik elde edemeyen çiftlerde yapılan temel değerlendirmede (sperm analizi, ovulasyon testleri, kavite ve tubalarda) herhangi bir patolojiye rastlanmaması olarak tanımlanmaktadır. İnfertilitesi olan çoğu erkek hastada oligo-asteno-teratozoospermi (OAT) sendromu bulunur. İnfertil erkeklerin %40-75'inde OAT dışında gösterilebilir bir neden bulunamamıştır (Jungwirth et al 2012, Mutlu, Baştu ve Öktem 2013). Ancak başlıca sebepler arasında oksidatif stresten bahsedilmektedir ancak artmış ROS (serbest oksijen radikalleri) seviyeleri, azalmış sperm motilitesi ile ilgili olduğu bulunmasına rağmen tam mekanizması anlaşılamamıştır (Demirtaş ve Üntan 2011, Aktan ve ark 2013).

Aromataz inhibitörleri ile de tedavi uygulanmaktadır. Aromataz enzimi testis, yağ hücreleri, hipotalamus ve hipofizde bulunmaktadır. Androjenlerin östrojenlere dönüştürülmesinden sorumlu bir sitokrom P450 enzimidir. İnfertil vakalar yüksek estradiol ve düşük testosteron seviyesine sahiptir. Aromataz enzim inhibitörleri aromataz enzimini inhibe ederek östrojenlerin spermatogenez üzerine olumsuz etkilerini azaltırken, intratestiküler testosteron miktarının artmasını sağlarlar. Yapılan bir çalışmada 45 hastaya 5 ay süreyle aromataz inhibitörü verilmiş ve tedaviden önce 5,0 olarak ölçülen testosteron/estradiol oranının tedaviden sonra 12,7' ye yükseldiği izlenmiştir (Pavlovich, King, Goldstein and Schlegel 2001, Gregoriu et al 2012).

Semende reaktif oksijen türevlerinin kaynakları immatür spermatozoalar, lökositler ve sperm yıkama teknikleridir. Semendeki reaktif oksijen türevleri spermatozoal hareketliliği bozar ve hücresel DNA'yı olumsuz etkilerler. Antioksidanlar reaktif

oksijen türevlerini nötralize ederek sperm yapısını koruyabilmektedirler (Bennetts and Aitken 2005).

Cochrane meta-analiz verilerinde antioksidan tedavi ile plasebonun sperm konsantrasyonları üzerine etkilerini değerlendiren randomize, plasebo kontrollü 16 çalışma değerlendirilmiştir; çalışmaların 7'sinde sperm konsantrasyonunda tedavinin 3. ve 6. aylarında artış saptanmazken, 6 çalışmada tedavinin 6. ayında, 3 çalışmada ise 9. ayında antioksidan tedavi alanlarda plasebo grubuna göre sperm konsantrasyonunda istatistiksel anlamlı artışlar görülmüştür (Showell, Brown, Yazdani, Stankiewicz and Hart 2011).

İnfertil erkeklerin testislerinde, interstisyel ve peritübüler alanda mast hücrelerinin sayısında önemli bir artış görülmektedir (Apa, Çayan, Polat ve Akbay 2002). Mast hücreleri, testis ve epididimis enflamasyonlarında fibrotik bozukluklarda rol oynamaktadır. Testislerinde artmış sayıda mast hücreleri rastlanan hastalarda sperm motilitesinde anlamlı olarak düşüş gözlemlenmiştir. Sonuç olarak sperm parametreleri mast hücreleri tarafından olumsuz etkilenmektedir (Cinik ve Sezan 2003).

Erkek infertilitesi ile ilgili olarak ketotifenin oligospermi, astenospermi ve lökositospermi üzerine in vivo androjenik etki çalışmaları mevcuttur. Erişkin farelere uygulanan bir tedavide ketotifenin sperm sayısı, hareketi ve epididim dokusuna olumlu etkileri gösterilmiştir (Chamani and Khodaei 2014). Bu doğrultuda ketotifenin uzun süreli kullanımının sperm parametrelerini iyileştirilmesi ve infertiliteyi sağaltma şansını arttırabileceği düşünülebilir.

Ketotifen, oral kullanımında belirli endojenlerin etkisini inhibe edebilen, anti-alerjik aktivite sergileyen inflamatuvar aracıdır. Yaygın olarak solunum ve deri sistemlerindeki alerjik reaksiyonların önlenmesi ve tedavisi için kullanılmaktadır. H1 histamin reseptör inhibisyonu, mast hücre stabilizasyonu ve eozinofil kümelenmesinin engellenmesi olarak üç ayrı farmakolojik mekanizma ile antialerjik etki göstermektedir. Ketotifenin hipersensitivite reaksiyonlarında rol oynayarak mast

hücrelerinden histamin, lökotrien C4, D4 ve PAF (Trombosit Aktive Edici Faktör) mediatörlerin salınımını inhibe eder (Grant, Goa, Fitton and Sorkin 1990).

Testisler üzerinde yapılan çalışmalar mast hücrelerini konumlarına göre interstisyel ve peritübüler mast hücreleri olmak üzere iki gruba ayırmaktadırlar (Chamani and Khodaei 2014). Peritübüler mast hücreleri, interstisyel mast hücrelerine göre seminifer tübüle daha yakındır ve sayıları daha düşüktür (Jezek et al 1999, Meineke, Frungieri, Jessberger, Vogt and Mayerhofer 2000).

Tranilast ve ketotifen yaygın kullanılan anti-inflamatuvar ve trombosit büyüme faktörü- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) inhibitörleridir. Testisin interstisyel dokusunda yer alan mast hücrelerinin sayısı yaşlanmaya paralel olarak artmaktadır. Anormal spermatogenez de mast hücrelerinin sayısı normal spermatogeneze göre daha fazladır dolayısıyla seminal sıvıda mast hücrelerinin sayısının artması idiyopatik erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmektedir (Roaiah, Khatab and Mostafa 2007).

Ketotifen, kalsiyum depolama özelliğine sahip bir antihistaminiktir (Gommerman and Berger 1998). Bu özelliği ile birlikte ketotifen lösemi hücreleri, mast hücreleri ve meme kanseri hücrelerinde aktivasyon geliştirerek hücre ölümünü tetikleyebilmektedir. İn vitro olarak kullanımında insan meme kanseri hücrelerindeki MDR1 aracılı çoklu ilaç direncini tersine çevirir ve in vivo olarak kullanımında ise doksorubisin tarafından uyarılan kardiyotoksikiteyi hafifletmektedir (Zhang and Berger 2003).

Tek taraflı inmemiş testiste yapılan bir çalışmada interstisyel ve subtubular alanlarda mast hücre sayılarının arttığı gözlemlenmiştir. Seminifer tübül membranlarında ve interstisyel alanlarda fibrozis gelişir ve spermatogenez bozulur. Aynı zamanda inflamatuvar ve fibrotik süreç nedeniyle mast hücre sayısında meydana gelen artışla birlikte karşı testis spermatogenezi de etkilenmektedir.

Bir mast hücre blokürü olan ketotifenle birlikte uygulanan bir tedavide, cerrahi müdahale öncesi ve sonrası uygulanacak olan medikal tedavinin karşı testisinin

doğurganlık potansiyelinin korunmasında rol oynadığı görülmüştür (Açıköz ve ark 2014).

Aynı zamanda hücre içi cAMP (Siklik Adenozin Mono Fosfat) konsantrasyonunu arttırarak fosfodiesteraz salınımını engelleyici bir özelliğe sahiptir (Schill, Schneider and Ring 1986). cAMP sinyalizasyonu sperm hücresinin flagella hareketinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca kadın genital sisteminde sperm hareketliliği içinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Wennemuth, Carlson, Harper and Babcock 2003, Wertheimer et al 2013).

Sperm motilitesini arttırmaya yönelik kullanılan maddeler çoğunlukla hücre içi cAMP miktarını arttırıcı etki göstermektedirler. Fosfodiesteraz inhibitörleri hücre içi cAMP içeriğinin yükselmesinde rol oynamaktadır ve sperm hareketliliğini arttırıcı etki göstermektedirler (Calogero et al 1998).

Oral yolla üç ay boyunca günde iki defa 1 mg ketotifen tedavisi uygulanan idiopatik 17 oligo- ve 22 astenozoospermili erkekde sperm sayısı ve sperm hareketliliğinde olumlu etkiler bildirilmiştir (Schill et al 1986).

Astenospermia olan 40 infertil erkekte yapılan bir çalışmada, hastalardan ilk semen örneği tedaviden önce, ikinci semen örneği ise iki ay boyunca günde iki kez oral yolla uygulanan 1 mg ketotifen tedavisinin durdurulmasından 2-3 hafta sonra alınarak sperm motilitesindeki değişim karşılaştırılmış, tedavi sonrası sperm motilitesinin %16,7'den %21,4'e artış gösterdiği ve tedavi uygulanan çiftlerin gebelik oranlarında %12,5 artış olduğu bildirilmiştir. Tedavi uygulanan infertil erkek semenlerinin %52'sinde sperm motilitelerinde %5 ile %35 arasında artış olduğu gözlenmiş hatta bu iyileşme oranı nekrospermili (%0 motilite) infertil erkeklerde %33 olarak gösterilmiştir. Böylece IUI veya yardımcı üreme teknikleri tedavisi uygulanmadan önce ketotifen verildiğinde infertilite tedavilerinin başarısızlık oranlarının azaldığı gösterilmiştir (Saharkhiz, Nikbakht and Hemadi 2013).

Başka bir çalışmada varikozel ameliyatından sonra üç ay boyunca ketotifen tedavisi uygulanan 52 hastada kontrol grubuna oranla sperm motilitesinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Ameliyattan sonra üç aylık süre içerisinde kontrol grubundaki hastalarda sperm motilitesindeki iyileşme oranı  $44,27 \pm 9,16$  iken ketotifen tedavisi uygulanan grupta  $82,56 \pm 14,00$  olarak ölçülmüştür. Ayrıca cerrahi varikozel ameliyatı sonrası 9 ay sonunda kontrol grubunda gebelik oranı %21,15 iken ketotifen tedavisi uygulanan grupta %41,17 olarak ölçülmüş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Azadi et al 2011).

Lökositospermi ve idiopatik infertiliteye sahip 55 erkeğe 12 hafta boyunca günde 2 kez 1 mg oral ketotifen uygulaması yapılan bir çalışmada, 4. hafta sonunda sperm motilitesinde önemli ölçüde artış gözlemlenmiş ve bu etkinin tedavi sonrasında da devam ettiği görülmüştür. Motiletinin yanı sıra 8. hafta sonunda normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinin sayıca artış gösterdiği, 4. haftayla birlikte beyaz kan hücrelerinin yoğunluğunun azaldığı ve bu azalmanın tedavi sonrası 4 hafta boyunca devam ettiği izlenmiştir. Tedavinin sürdüğü 8. hafta ile tedaviyi takip eden 6 aylık süreçte 16 gebelik kaydedilmiş ve gebelik oranı %29,1 olarak ölçülmüştür (Oliva and Multigner 2006).

Sperm motilitesinin başlatılmasında ve devamlılığının sağlanmasında çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Hücre içi cAMP konsantrasyonu sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir (Cooper and Yeung 2010). Sperm motilitesinin in vitro şartlarda uyarılmasının esası da hücre içi cAMP seviyesini arttırarak sperm fonksiyonlarının uyarılmasına dayanmaktadır. cAMP sinyalizasyonu sperm hücrelerinin flagella hareketinde ve kadın genital sisteminde hareketliliğinde de önemli bir yere sahiptir (Wennemuth et al 2003, Wertheimer et al 2013).

Sperm cAMP bağımlı fosforilasyon ile in vitro olarak aktive edilebilmektedir. Kimyasala olan tepki sayesinde  $Ca^{2+}$  artışları meydana gelmekte bununla birlikte flagella dalgalanmalarında değişiklikler in vitro üretilebilmektedir (Brokaw 1987). Aynı zamanda cAMP konsantrasyonundaki artış, spermin hareket kabiliyeti,



kapasitesini ve akrozom reaksiyonunu gibi cAMP bağımlı olaylarda artışa neden olmaktadır (Armstrong, Clulow, Murdoch and Jones 1994, Aitken 1997).

Bu bağlamda kullanılan fosfodiesteraz inhibitörleri hücre içi cAMP içeriğinin yükselmesinde rol oynamaktadır ve sperm hareketliliğini arttırıcı etki göstermektedirler (Calogero et al 1998).

Pentoksifilin gibi fosfodiesteraz inhibitörlerinin in vitro yollarla semene eklendiğinde hücre içi cAMP düzeyini, glikozisi ve ATP yapımını arttırdığı izlenmiştir. Bu maddeler motil sperm oranını yükseltmekte ve aynı zamanda canlı ama motil olmayan spermelerin de motilitesini tetikleyip, motilite kazandırmaktadırlar (Nivsarkar, Patel and Mokal 1996, Archer and Roudebush 2013).

20 semen örneğinde in vitro olarak gerçekleştirilen bir çalışmada, deney grubu semen örneklerine 3,6 mM pentoksifilin içeren modifiye Earle mediumu eklenmiş, çalışma sonucunda gruplar arasında yapılan motilite değerlendirmelerinde pentoksifilin kullanılan deney grubunda kullanılmayana göre daha fazla sayıda motil sperm tespit edilmiştir (Kadıoğlu ve ark 1991).

Oligospermik ve normospermik 19 semen örneğinde yapılan bir çalışmada, semen örnekleri kontrol ve deney grupları olmak üzere iki eşit parçaya bölünmüş, deney grubu semenleri 1 mg/ml pentoksifilin içeren yıkama solüsyonları ile yıkanmış yıkama sonrası kontrol ve deney grupları hem progresif olmayan motil hem de progresif motil sperm sayılarına göre karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda örneklerin pentoksifilin tedavisinden sonra hem hareketli spermatozoa konsantrasyonunun hem de ileri sperm motilitesinin anlamlı şekilde artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol grubunda %17,6 olarak ölçülen fertilizasyon oranı, pentoksifilin uygulanan deney grubunda %22,7 olarak ölçülmüştür. Sperm hareketliliğini artırmak için pentoksifilin gibi maddelerle erkek infertilite tedavisinin sağlandığı gözlenmiştir (Yovich, Edirisinghe, Cummins and Yovich 1988).

Erkek infertilitesine bağlı 202 çiftte yapılan çalışmada 112 semen standart olarak hazırlanmış, 80 tanesi ise pentoksifilin ile muamele edilmiştir. Standart hazırlanan semenlerle yapılan IUI işleminde doğum oranı %11,5 iken, pentoksifilin ile yapılanlarda doğum oranının standart hazırlama işlemine göre %27,5 daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Mehranian 2009).

Bu doğrultuda ketotifenin fosfodiesteraz salınımını engelleyici özellik göstererek hücre içi cAMP konsantrasyonunu arttırması, in vitro kullanımında da sperm motilitesini olumlu yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra ketotifenin oral yollarla kullanımı olumlu sonuçlar göstermesine rağmen tedavi sürecinin uzunluğu da bir sorun oluşturmaktadır. In vitro kullanım çok kısa süreçleri kapsamaktadır ve IUI gibi yöntemlerle entegre olarak kullanılabilir.

Çalışmamızda astenospermia olan erkeklerden almış olduğumuz semen rneklarine ketotifeni in vitro olarak ilave ederek sperm motilitesini anlamlı olarak arttırmayı planladık. Ancak ketotifenin in vitro düzeyde daha önce kullanılmamış olması uygulanacak spesifik metodun bilinmemesine neden olmakta ve maddenin kimyasal etki göstererek sperm hücrelerini tamamen l hale getirip getirmeyeceğine dair soruları cevapsız bırakmaktaydı. Ayrıca olumlu ve anlamlı sonuçlar elde edebilmek için in vitro olarak uygulanacak doz hakkında da bir literatür bilgisi yer almamaktaydı. Bunun için daha önce benzer şekilde yapılmış in vitro deneylerin metodlarından yararlanarak bir metod oluşturduk ve bu metodlarda olumlu sonuç alınan doz miktarlarından başlayarak bir molarite elde etmeye çalıştık.

Çalışmaya ilk olarak örnek alınan metod içerisinde kullanılan 10 mg etken madde değeri ile başladık. Ancak bu doz uygulandığında makler kamarasında izlenen sperm hücrelerinin neredeyse tamamının hareketsiz olduğu izlendi. Yapılan vitalite değerlendirmesinde ise sperm hücrelerinin neredeyse tamamının l olduğu tespit edildi. Bunun sebebi olarak kullanılan etken maddelerin kimyasal ve biyolojik özelliklerindeki farklılığın neden olduğu düşünülmektedir.

Daha sonra 1 mg toz ketotifen denendiğinde sperm motilite sayılarında kontrol grubuna oranla bir artış olduğu izlendi. Yapılan vitalite değerlendirmelerinde ise ölücanlı sperm oranlarının kontrol grubuyla neredeyse aynı olduğu görüldü ve bu sonuçlar yapılan istatistiksel değerlendirmelerde de anlamlı bulundu.

Uygun dozun bulunmasına rağmen 1 ile 10 mg değerleri arasında kalan diğer etken dozlarında araştırılması adına 3 ve 5 mg toz ketotifen içeren solüsyonlar da denendi ancak bu dozlar da 1 mg toz ketotifen uygulanan örneklere göre motilite sayılarında azalış ve ölü sperm sayılarında artış tespit edildi.

Bu doğrultuda yaptığımız çalışmada astenospermia hastalarında 1 mg toz ketotifen içeren uygun dozda, in vitro olarak ketotifen kullanımının sperm motilitesini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığını tespit ettik. Ayrıca yapılan vitalite testleri sonucunda deney grubu ile kontrol grubu arasında vitalite yönünde anlamlı bir fark olmadığı sonucuna vardık.

Motilite artışında bizim bulduğumuz uygun doz 1 mg toz ketotifen içeren solüsyon olmasına karşın 1 mg yakın olan altındaki ve üstündeki değerlerin yeni yapılacak çalışmalarla değerlendirilmesin literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışma sonuçları ketotifen maddesinin sperm motilitesini arttırmaya yönelik özellikle IUI yöntemiyle birlikte kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak ketotifen maddenin in vitro olarak kullanımının yeni olması IUI yöntemiyle birlikte kullanıldığında oluşabilecek muhtemel etkilerine karşı daha detaylı tetkikler yapılmasını gerektirmektedir. Bu doğrultuda yapılacak çalışmaların bu konunun cevaplanmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

- Çalışmada astenospermia hastalarında motilite oranlarında artış sağlamak amacıyla ketotifen maddesinin in vitro kullanımının etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.
- Bu amaçla 40 adet astenospermia hastasına in vitro olarak 0,24 mM ketotifen tedavisi uygulanmıştır.

- Motilite değerlerinde elden ettiğimiz artışları sağlayan doz 1 mg ketotifen içeren solüsyon olmuştur.
- WHO (2010) motilite referans değerlerine göre yapılan değerlendirme sonucu ketotifen kullanılan deney grubunda, ketotifen kullanılmayan kontrol grubuna oranla hem hareketli sperm konsantrasyonunun hem de progresif sperm motilitesinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir.
- Bununla birlikte bu artışta nonprogresif ve hareketsiz spermilerin motilite kazanmalarının etkili olduğu grlmüştur.
- Vitalite oranlarına bakıldığında deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.
- Astenospermia hastalarında in vitro ketotifen kullanımının deney grubunda progresif motil sperm sayısını anlamlı olarak arttırdığı ve nonprogresif spermlele hareketsiz spermlele progresif hareket kazandırdığı gözlenmiştir.
- İki grup arasında yapılan vitalite değerlendirmesinde ketotifen maddesinin sperm vitalitesine olumsuz bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

## 6. ÖZET

**GİRİŞ VE AMAÇ:** Bu çalışmada astenospermia hastalarında ketotifenin sperm motilitesi üzerine in vitro etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEMLER:** 40 adet astenospermia hastasının örnekleri kontrol ve deney olmak üzere iki gruba ayrıldı; Kontrol grubu: astenospermia+kontrol solüsyonu (n:40), Deney grubu: astenospermia+0,24 mM ketotifen solüsyonu (n:40). Solüsyonlar semen örneklerine 1:1 oranında ilave edilerek pipetaj yapıldı. 10 µl semen-solüsyon karışımı Makler kamarasına konularak kare sistemi gözetilerek sperm sayımı yapıldı. Bulunan sayısal değerler ileri hareket, yerinde hareket ve hareketsiz olmak üzere 3 grup altında not edildi. Vitalite skorlama için semen yayması gerçekleştirilerek EosinY-Nigrosin boyama tekniği uygulandı ve ışık mikroskop altında değerlendirildi.

**BULGULAR:** Işık mikroskopik olarak Makler kamarasında yapılan gözlemler sonucu kontrol grubu ile deney grubu arasında progresif motilite yönünden yapılan karşılaştırmalarda kontrol grubuna oranla deney grubu sperm motilitelerinde artış tespit edildi. Kontrol grubu içerisindeki nonprogresif sperm sayısının deney grubunda azaldığı gözlemlendi. Hareketsiz (immotil) olup ölü olmayan spermilerin ise belirli bir süre sonra nonprogresif, daha sonra da progresif hareket kazandıkları görüldü. Vitalite yönünden yapılan karşılaştırmalarda ise kontrol ve deney grupları arasında bir fark saptanmadı.

**SONUÇ:** Astenospermia hastalarında in vitro ketotifen kullanımının deney grubunda kontrol grubuna oranla progresif motil sperm sayısını anlamlı olarak arttırdığı gözlenirken, iki grup arasında yapılan vitalite değerlendirmesinde ketotifen maddesinin sperm vitalitesine olumsuz bir etkisi olmadığı gözlenmiş, motiliteyi arttırırken toksik olmadığı kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Astenospermia, *İn Vitro*, Ketotifen, Motilite, Vitalite

## SUMMARY

### **The Effect of Ketotifen on the *In Vitro* Sperm Motility of Asthenospermic Patients**

**INTRODUCTION AND AIM:** In this study, we aim to examine the effect of ketotifen on sperm motility *in vitro* in asthenospermic patients.

**MATERIAL AND METHODS:** The samples of 40 asthenospermia patients were divided into two groups as control and experimental groups; control group: asthenospermic+control solution (n:40), experimental group: asthenospermic+0,24 mM ketotifen solution (n:40). Solutions were added to semen samples 1:1 ratio by pipeting. 10 µl semen solutions were put on the Makler chamber and were counted via square system. The quantified numbers were noted as 3 groups; progressive motile, non-progressive motile and immotile. Vitality scoring of the semen smear was performed by using Eosin-Nigrosin staining technique and the cells were observed under the light microscope.

**RESULTS:** When we compared the progressive motility of the experimental and control group under the light microscope on the Makler, we have found that there was an increment in the sperm motility in the experimental group compared to control group. The non-progressive sperm number was observed to be decreased in the control group. We have also observed that the immotile as well as vital sperms became non-progressive in time and then they gained the progressive motility. When we compared the vitality of sperms, we did not detect any difference between control and experimental group.

**CONCLUSION:** We observed that the ketotifen application to the asthenospermic patients increased the progressive motile sperm numbers significantly in experimental group compared to control group. Furthermore, it has been stated that the ketotifen did not have toxic effects on the vitality of sperms while it was increasing the motility.

**Key Words:** Asthenospermic, *In Vitro*, Ketotifen, Motility, Vitality

## KAYNAKLAR

- Açıköz A, Aşçı R, Aydın O, Çavuş H, Dönmez G, Büyükalpelli R. (2014). The role of ketotifen in the prevention of testicular damage in rats with experimental unilateral undescended testes. *Drug Des Devel Ther*, 8:2089–2097.
- Aitken RJ. (1997). Molecular mechanisms regulating sperm function. *Mol HumReprod*, 3:169–173.
- Aktan G, Doğru-Abbasoğlu S, Küçükgergin C, Kadioğlu A, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N. (2013). Mystery of idiopathic male infertility: Is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril*, 99:1211–1215.
- American Society For Reproductive Medicine, Assisted Reproductive Technologies, A Guide for Patients (ASRM). (2011). ASRM, Alabama
- Apa DD, Çayan S, Polat A, Akbay E. (2002). Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch Androl*, 48(5):337-344.
- Archer SL, Roudebush WE. (2013). Enhancement of sperm motility using pentoxifylline and platelet activating factor. *Methods Mol Biol*, 927:241-245.
- Armstrong VL, Clulow J, Murdoch RN, Jones RC. (1994). Intracellular signal transduction mechanisms of rat epididymal spermatozoa and their relationship to motility and metabolism. *Mol Reprod Dev*, 38:77–84.
- Azadi L, Abbasi H, Deemeh HR, Tavalae M, Arbabian M, Pilevarian AA, Nasr-Esfahani MH. (2011). Zaditen (Ketotifen), as mast cell blocker, improves sperm quality, chromatin integrity and pregnancy rate after varicocelelectomy. *Int J Androl*, 34(5):446-452.

- Bradtke A. (1999). Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction: What are we learning from transgenic and knock-out animals?. *Steroids*, 64:598-604.
- Bennetts LE, Aitken RJ. (2005). A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 71:77–87.
- Brokaw CJ. (1987). Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. *J Cell Biochem*, 35(3):175-184.
- Buchter D, Behre HM, Kliesch S, Nieschlag E. (1998). Pulsatile GnRH or human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin as effective treatment for men with hypogonadotropic hypogonadism: a review of 42 cases. *Eur J Endocrinol*, 139(3):298-303.
- Calogero AE, Fishel S, Hall J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burrello N, Thornton S, D'Agata R. (1998). Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Hum Reprod*, 13(4):911–915.
- Chamani M, Khodaei H. (2014). Effect of Ketotifen on some reproductive hormones, spermatogenesis and immune parameters in male rats. *Walia*, 30(2):104-108.
- Chemes EH, Rawe YV. (2003). Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update*, 9:405-428.
- Chung E, Brock GB. (2011). Cryptorchidism and its impact on male fertility: A state of art review of current literature. *Can Urol Assoc J*, 5(3):210-214.



- Cinik M, Sezan SC. (2003). The mast cells in semen: their effects on sperm motility. *Arch Androl*, 49(4):307-311.
- Clarke IJ, Rao A, Fallest PC, Shupnik MA. (1993). Transcription rate of the follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit gene is reduced by inhibin in sheep but this does not fully explain the decrease in mRNA. *Mol Cell Endocrinol*, 91:211-216.
- Cooper TG, Yeung C. (2010). Physiology of sperm maturation and fertilization. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*, Springer-Verlag, Berlin. p61-p85.
- Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi Segovia LM, Repetto HE, Blanco AM. (2003). Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl*, 49:343-352.
- Çayan S. (2006). TÜYK Ders Notları Kitabı. Erkek infertilitesinde medikal ve cerrahi tedavi, Kongre Basımevi, Ankara. s262-s263.
- Da Ros CT, Averbek MA. (2012). Twenty-five milligrams of clomiphene citrate presents positive effect on treatment of male testosterone deficiency – a prospective study. *Int Braz J Urol*, 38:512-518.
- De Jonge CJ, La Fromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. (2004). Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril*, 82:57-65.
- De Jonge CJ, Barratt CLR. (2006). *The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press.
- de Krester DM, Robertson DM. (1989). The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *BiolReprod*, 40:33-47.

- Delilbaşı L. (2008). İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Veri Medikal Yayıncılık, Ankara.
- Demirtaş A, Üntan İ. (2011). Antioxidants and oxidative stress in seminal fluid and sperm. *Turk Urol Sem*, 2:24-30.
- Devroey P, Van Steirteghem A. (2004). A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update*, 10(1):19-28.
- El Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I. (1998). Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod*, 58:116-23.
- Eliasson R, Basic semen analysis. (2003). In: *Current topics in andrology*. Matson P (Ed), Ladybrook Publishing, p35-p89
- Erdemir F. (2013). The evaluation of the relationship between obesity and male infertility: Obesity and male infertility. *J Clin Anal Med*, 4(1):76-82.
- Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. (2011). Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem*, 2:11-17.
- Gedikli S, Özbek E, Demirci T. (2013). Fertilizasyonun Moleküler Temeli. *Van Tıp Derg*, 20(4): 294-301.
- Gommerman JL, Berger SA. (1998). Protection from apoptosis by steel factor but not interleukin-3 is reversed through blockade of calcium influx. *Blood*, 91:1891-1900.
- Gökçe A. (2011) Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Turk Urol Sem*, 2:1-7.

- Grant SM, Goa KL, Fitton A, Sorkin EM. (1990). Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs*, 40(3):412-448.
- Gregoriou O, Bakas P, Grigoriadis C, Creatsa M, Hassiakos D, Creatsas G. (2012). Changes in hormonal profile and seminal parameters with use of aromatase inhibitors in management of infertile men with low testosterone to estradiol ratios. *Fertil Steril*, 98(1):48-51.
- Güenalp S. (2004). Kadın doğum hekiminin erkek faktörünün araştırılması ve değerlendirilmesindeki yaklaşımı ne olmalıdır?. *TJOD Uzmanlık Sonrası Eğitim Derg*, 7:129-140.
- Hargreave TB. (2000), Genetic basis of male fertility. *Br Med Bull*, 56(3):650-671.
- Jezek D, Banek L, Hittmair A, Pezerovicpanijan R, Goluzza T, Schulze W. (1999). Mast cells in testicular biopsies of infertile men with mixed atrophy of seminiferous tubules. *Andrologia*, 1(4):203-210.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Hargreave T.B, Krausz C, European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. (2012). *Eur Urol*, 62:324-332.
- Junqueira JC, Carneiro J. (Eds), (2009). Basic Histology Text&Atlas. Temel Histoloji. Çevirenler: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. s418-s425.
- Kadıoğlu TC, Ziyilan O, Çayan S, Özcan F, Nanen İ, Tellaloğlu S. (1991). İntrauterin inseminasyon için sperm hazırlama tekniğinde pentoksifilinin etkisi. *Turk Urol Derg*, 461-464.

- Kaplan PF, Katz SL, Thompson AK, Freund RD. (2002). Cycle fecundity in controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. Influence of the number of mature follicles at hCG administration. *J Reprod Med*, 47(7):535-539.
- Kayıkçı MA, Çam HK, Akman Y, Erol E. (2002). Erkek infertilitesinin değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce Tıp Derg*, 4(3):35-38.
- Kierszenbaum AL. (Ed), (2006). Histology and Cell Biology an Introduction to Pathology. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Çeviren: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara. s531-s589.
- Koli P, Anil M, Ramya NR, Patil K, Swamy MK. (2013). Intrauterine insemination: a retrospective review on determinants of success. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*, 2(3):311-314.
- Kotoulas IG, Cardamakis E, Michopoulos J, Mitropoulos D, Dounis A. (1994). Tamoxifen treatment in male infertility effect on spermatozoa. *Fertil Steril*, 61(5):911-914.
- Liu PY, Handelsman DJ (2003). The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum Reprod* 9: 9-23.
- Main KM, Schmidt IM, Skakkebaek NE. (2000). A possible role for reproductive hormone in new born boys: progressive hypogonadism without the postnatal testosterone peak. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:4905-4907.

- Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ. (1998). Immuno expression of the steroid ogenic enzymes 3-beta hydroxy steroid dehydro genase and 17 alpha hydroxylase, C17,20 lyase and there ceptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the on set of leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod*, 58:520-25.
- Mehrannia T. (2009). The effect of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination. *Pak J Med Sci*, 25(3):359-363.
- Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A. (2000). Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil Steril*, 74(2):239-244.
- Moradi M, Moradi A, Alemi M, Ahmadina H, Abdi H, Ahmadi A, Bazargan-Hejazi S. (2010). Safety and efficacy of clomiphene citrate and l-carnitine in idiopathic male infertility a comparative study. *Urol J*,7:188-193.
- Mutlu MF, Baştu E, Öktem M. (2013). Açıklanamayan infertiliteye güncel bakış. *GMJ*, 24:29-32.
- Nivsarkar M, Patel RY, Mokal R. (1996). Modulation of sperm membrane conformation by pentoxifylline in oligospermia: A biophysical investigation of sperm membrane in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 225:791–795.
- Ok E, Özyurt D, Gülekli B. (2009). Astenozoospermi olgularında semende lökosit değerlendirmesi. *Turkish Journal of Urology*, 35(3):215-218.
- Oliva A, Multigner L. (2006). Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertil Steril*, 85(1):240-243.

- Pagani R, Cocuzza M, Agarwal A. (2009). Medical and surgical treatment of male infertility. *Arch Med Sci*, 5(1A):70-83.
- Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN. (2001). Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *J Urol*, 165:837-841.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil Trans. R. Soc. B*, 365:1663–1678.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Male Reproduction and Urology. (ASRM). (2008). Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*, 98:1400-1406.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Male Reproduction and Urology. (ASRM). (2014). Report on varicocele and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*, 102:1556-1560.
- Pellestor F, Girardet A, Andreo B. (1994). Effect of long abstinence periods on human sperm quality. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 39: 278-281.
- Roaiha MMF, Khatab H, Mostafa T. (2007). Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia*, 39:185–189.
- Ross MH, Pawlina W. (Eds), (2010). *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th ed, Lippincott Williams&Wilkins.
- Sadler TW. (2012). *Langman's Medical Embryology*. 12th ed. Lippincott Williams&Wilkins. p235-p259.
- Satar DA, Gençtar S. (2013). Sperm analizi. *Arşiv*, 22(4):532-542.
- Schill WB, Schneider J, Ring J. (1986). The use of ketotifen a mast cell blocker, for treatment of oligo- and asthenozoospermia. *Andrologia*, 18:570-573.

- Sezgin H, Hoccoğlu Ç. (2014). İnfertilitenin psikiyatrik yönü. *Psikiyatri Güncel Yaklaş*, 6(2):165-184.
- Saharkhiz N, Nikbakht R, Hemadi M. (2013). Ketotifen, a mast cell blocker improves sperm motility in asthenospermic infertile men. *J Hum Reprod Sci*, 6:19-22.
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 109(3-5):323-330.
- Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. (2011). Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, 19(1). [Electronic Journal]. <http://www.thecochranelibrary.com/view/0/index.html>
- Tanagho EA, McAnich JW. (1992) Smith's General Urology. Lange Prentice Hall International Inc. p669-p675.
- Tapısız OL, Altınbaş SK, Abike F, Göktolga U. (2012). Jinekolog gözüyle semen analizi ve son gelişmeler. *J Turk Soc Obstet Gynecol*, 9:25-31.
- Vlaisavljevic V. (2007). Embryo transfer and luteal support in natural cycles. *Reprod Biomed Online*, 14(6):686-692.
- Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. (2000). Physiology of testicular function. In: Nieschlag E, Behre HM, Andrology. 2th ed, Springer-Verlag, Berlin. p23-p61.
- Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF. (2003). Bicarbonate actions on flagellar and Ca<sup>2+</sup>-channel responses: initial events in sperm activation. *Development*, 130:1317–1326.


- Wertheimer E, Krapf D, de la Vega-Beltran JL, Sanchez-Cardenas C, Navarrete F, Haddad D, Escoffier J, Salicioni AM, Levin LR, Buck J, Mager J, Darszon A, Visconti PE. (2013). Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J Biol Chem*,288:35307–35320.
- World Health Organization, Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (WHO). (2010). 5th ed. WHO Press, Geneva.
- Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL. (1988). Preliminary result using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer program for severe male factor infertility. *Fertil Steril*, 50(1):79-81.
- Zhang Y, Berger SA. (2003). Ketotifen reverses MDR1-mediated multidrug resistance in human breast cancer cells in vitro and alleviates cardiotoxicity induced by doxorubicin in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol*, 51:407-414.




# EK

## Ek.1. Etik Kurul Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 09/12/2014-15029





**T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Tıp Fakültesi Dekanlığı**

Sayı : 16214662/050.01.04/126  
Konu : Etik kurul Başvuru Dosyası Hk.

Sayın Doç. Dr. Nureddin CENGİZ  
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İlgi : 27.10.214 tarihli ve 124 sayılı başvurunuz

Destekleyicisi olduğunuz 'Asthenospermia Hastalarında Ketotifen'in İn vitro Sperm Motilitesine Etkisinin Araştırılması' isimli klinik araştırma başvuru dosyanız ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir ve uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

**Doç.Dr. Pelin TANYERİ**  
Etik Kurulu Başkanı






EK :  
02.12.2014 tarih ve 9 sayılı Etik Kurul Kararı (3 sayfa)

Güvenli Elektronik  
İmzalı Aslı ile Aynıdır.  
.09.12.2014.

**Zübeyde KAÇAL**  
Etik Kurul Sekr.

Evrak Doğrulama için : <http://193.140.253.232/envision.Sorgula/BelgeDogrulama.aspx?V=BE6E7H1T>

Fakülte Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Dekanlığı, Korucuk Kampüsü, Korucuk, Adapazarı/Sakarya  
Tel:264 295 6630 Faks:264 295 6629  
E-Posta :tip@sakarya.edu.tr Elektronik Ağ :www.tip.sakarya.edu.tr



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

# ÖZGEÇMİŞ

## I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Oğuzhan BULDUK

Doğum yeri ve tarihi: Sakarya / 06.08.1990

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Askerlik durumu: Tecilli (13.08.2016)

İletişim adresi ve telefonu: Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD.

YDS: İngilizce-53,75

ALES: 75,36

## II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü - 2013

Adapazarı Özel Enka Lisesi – 2007

## III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

## IV- Mesleki Deneyimi

## V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

## VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

1. Nihal Doğan Aydın, Nureddin Cengiz, **Oğuzhan Bulduk**, Aysun Sarıkaya. Doğum Defektine Sahip Bebekler ve Abortusların Retrospektif Araştırılması - XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi-Poster

2. **Oğuzhan Bulduk**, Hilal Şanlı, Elif Sözen, Nureddin Cengiz, Elvan Özbek  
Anjiogenesis ve Endotel Progenitör Hücreler - Sakarya Üniversitesi I. Ulusal  
Tıp Öğrenci Kongresi-Poster
3. Elif Sözen, **Oğuzhan Bulduk**, Elvan Özbek, Nureddin Cengiz, Yasemin  
Nasır. Laboratuvarda Uterus Taklitleri: Ko-Kültür Tekniği- Sakarya  
Üniversitesi I. Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi-Poster
4. **Oğuzhan Bulduk**, Hilal Şanlı, Nureddin Cengiz. Bir Hücrel Görüntüleme  
ve Manipülasyon Tekniği Olarak Lazer Mikrodiseksiyon - Sakarya  
Üniversitesi I. Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi-Poster
5. Aysun Sarıkaya, **Oğuzhan Bulduk**, Nureddin Cengiz, Elvan Özbek,  
Yasemin Nasır. Preimplantasyon Genetik Tanı: Embriyo Biyopsisi - Sakarya  
Üniversitesi I. Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi-Poster
6. Hilal Şanlı, **Oğuzhan Bulduk**, Nureddin Cengiz. Ekstrasellüler Matriks  
Dinamiği ve Hücre Etkileşimi - Sakarya Üniversitesi I. Ulusal Tıp Öğrenci  
Kongresi-Poster
7. **Oğuzhan Bulduk**, Elif Sözen, Nureddin Cengiz, Elvan Özbek. TDP-43  
Proteinopatileri Kaynaklı Nörodejeneratif Hastalık: ALS – 8. Hücrel Sinir  
Bilim Günleri - Poster
8. **Oğuzhan Bulduk**, Nureddin Cengiz. Merkezi Sinir Sisteminin Tamirinde  
PCAF Proteini Destekli Gen Terapisi – 8. Hücrel Sinir Bilim Günleri -  
Poster

## VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

Ödüller

Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

## VII- Diğer Bilgiler

1. Deneş Hayvanları Kullanımı Sertifikası İstanbul Üniversitesi DETAE - 12.2013
2. Sağlık Bilimlerinde Araştırma Planlaması ve Bilimsel Makale Yazım Kursu 2 "Veriden Yayına" Sakarya Üniversitesi - 03.2015
3. Sağlık Bilimlerinde Araştırma Planlaması ve Bilimsel Makale Yazım Kursu Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü - 12.2014
4. 8. Hücreşel Sınır Bilim Günleri – 11.2014
5. 12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi - 05.2014
6. Mikrobiyal Biyoteknoloji Semineri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü - 10.2011