

T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**SERUMDA VE SEMNALSIVİDA  
BAKILAN DVTAMININ SPERM  
HAREKET VE MORFOLOJİSİ  
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Göksum PEK**

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır



T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**SERUMDA VE SEMNALSIVİDA  
BAKILAN DV TAMİNİN SPERM  
HAREKET VE MORFOLOJİSİ  
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Göksun PEK**

**Prof. Dr. G. Serdar GÜNALP**

**Tez Danışmanı**

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2016



## TE EKKÜRLER

Bu tezin hazırlanmasında tüm a amalarında gösterdi i ilgi ve katkıları nedeniyle Sayın Anabilim Dalı Ba kanı ve Danı man Hocam Prof. Dr. Serdar Günalp'e ve asistanlık e itimim boyunca, e itimime yapmı oldukları katkılarından dolayı tüm hocalarıma te ekkürlerimi sunarım.

Bu tezin plan ve kurgu a amasında yardımcı olan Doç. Dr. Gürkan Bozda 'a ve Dr. Halil Ruso'ya katkılarından dolayı te ekkür ederim. Tezin plan ve kurgu a amasından yazım a amasına kadar yardımını esirgemeyen Uzm. Dr. Sezcan Mümü o lu'na göstermi oldu u ilgi ve sabır için te ekkür ederim.

Androloji laboratuvarında spermlerin hazırlanmasında ve de erlendirilmesinde büyük eme i geçen Ya ar Tekin'e, Özlem Leblebici Altında 'a ve Özcan Erdo du'ya göstermi oldukları ilgi ve güleryüz için te ekkür ederim. Laboratuvar ölçümlerindeki yardımları ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Filiz Akbıyık ve Dr. Yusuf Bayrakçeken'e te ekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri birimine finansal deste inden dolayı te ekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen annem, babam ve karde ime te ekkürlerimi sunarım. Tezimin her a amasında deste i ve eme i çok büyük olan huzur ve mutluluk kayna ım sevgili e im Halil'e bu zorlu süreçte bana göstermi oldu u anlayı , destek ve sevgiden dolayı sonsuz minnettarım.

## ÖZET

**Çalışan G, Serumda ve Seminal Sıvıda Bakılan D Vitamininin Sperm Hareketi ve Morfolojisi Üzerine Etkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2016**

İnfertilite üreme çağındaki çiftlerin %15'ini etkileyen önemli bir sağlık problemidir. Erkek infertilitesi tek başına infertilite nedenlerinin %25'ini oluştururken, infertilite nedenlerinin %50'si kombine kadın ve erkek faktöründen oluşur. Erkek infertilitesi değerlendirilmesinde sperm morfolojisi ve hareketliliği sperm fonksiyonunu gösteren en önemli parametrelerdir. D vitamininin erkek fertilitesi üzerine olan etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen çeşitli çalışmalarda olası mekanizmalar üzerinde durulmaktadır. Yapılan çalışmalarda sperm üzerinde vitamin D reseptörü bulunması ve in vitro yapılan çalışmalarda D vitamininin reseptörü üzerinden hücre kalsiyum artmasına bağlı sperm hareketini arttırabileceği bulunmuştur. Ayrıca D vitamininin antioksidan etkisine dair yapılan çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda serumda ve seminal sıvıda bakılan D vitamini düzeylerinin erkek fertilitesi üzerine olan olası etkilerinin ve etki mekanizmalarının sperm parametreleri değerlendirilerek prospektif olarak araştırılması planlanmıştır. İnfertilite şikayeti ile Eylül 2016 – Ekim 2016 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran araştırma için uygun şartları sağlayan ve araştırmaya katılmayı kabul eden sperm ve kan örneği verebilen 100 erkek hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Sperm örnekleri sperm parametreleri açısından WHO kriterlerine göre manuel olarak tek-kör yöntem ile değerlendirilmiştir. Hastaların serum ve seminal sıvı D vitamini düzeyleri ile sperm parametreleri karşılaştırılmıştır. Serum D vitamini düzeyleri ile seminal sıvı D vitamini düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ( $p=0,463$ ). Serum D vitamini düzeyi ile ileriyetli hareketli sperm sayısı ( $p=0,037$ ) ve morfoloji yüzdeleri ( $p=0,049$ ) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. D vitamini etki mekanizması değerlendirilmesinde hücre içi kalsiyum artışı göstergesi olarak seminal hücre içi kalsiyum düzeyleri ve oksidatif stres göstergesi olarak seminal sıvı malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülmüştür. Serum D vitamini düzeyleri ile hücre içi kalsiyum düzeyi arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ( $p=0,878$ ). Serum D vitamini düzeyleri ile MDA düzeyleri arasında da anlamlı ilişki bulunmamıştır ( $p=0,791$ ). Seminal sıvı

MDA d zeleri ile sperm parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ili ki saptanmamı tır. Seminal sıvı hücre içi kalsiyum düzeyi ile total hareketli sperm yüzdesi ( $r=0,241$ ) ve ileri hareketli sperm yüzdesi ( $r=0,217$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmu tur.

### **Anahtar Kelimeler**

Erkek infertilitesi, D vitamini, hücre ii kalsiyum, malondialdehit

## **ABSTRACT**

**pek G, Effects of Serum and Seminal Plasma Vitamin D Levels on Sperm Motility and Morphology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Master Thesis, Ankara, 2016**

Infertility is an important health care problem which affects 15% of reproductive age couples. Male factor infertility is solely responsible for about 25% of infertility causes and is contributory factor with women infertility factors in 50% of infertility causes. Sperm motility and morphology are most important parameters in male infertility assessment for indicating sperm function. Although vitamin D action mechanism on male fertility is not totally confirmed yet, there are several studies for possible action mechanisms of vitamin D. In these studies vitamin D receptor is found on sperm and it is observed that vitamin D could increase sperm motility by increasing intracellular calcium levels via vitamin D receptor. Moreover, there are some studies on vitamin D antioxidant effect. In this study, it was planned to research possible effects and effect mechanisms of serum and seminal plasma vitamin D levels on male fertility by assessment of sperm parameters prospectively. 100 male patients able to give sperm-blood sample fitting research requirements who applied to Hacettepe University Obstetrics and Gynecology Department clinic with infertility complaint between September 2016 and October 2016 accepted to join the study. Sperm samples were analyzed in terms of sperm parameters with single-blind manual method according to WHO criterias. Patients' serum and seminal plasma vitamin D levels were compared with sperm parameters. Significant relation between serum vitamin D levels and seminal plasma vitamin D levels was not found ( $p=0,463$ ). While, it was observed that serum vitamin D levels with progressive sperm count ( $p=0,037$ ) and morphology percentage ( $p=0,049$ ) are significantly related. In the assessment of vitamin D effect mechanisms, seminal intracellular calcium levels were measured as indicators of intracellular calcium increase and malondialdehyde (MDA) levels were measured as indicators of oxidative stress. According to the findings, serum vitamin D levels are not significantly related with both of intracellular calcium levels ( $p=0,878$ ) and MDA levels ( $p=0,791$ ). Moreover, no significant relation was found between seminal plasma MDA levels and sperm parameters. However, both



of total sperm motility ( $r=0,241$ ) and progressive sperm motility ( $r=0,217$ ) were found to be significantly correlated with seminal plasma intracellular calcium levels.

**Keywords**

Male infertility, vitamin D, intracellular calcium, malondialdehyde

## Ç NDEK LER

TE EKKÜRLER.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iv
Ç NDEK LER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
EK LLER.....	ix
TABLolar.....	x
1. G R .....	1
1.1. Gerekçe ve Hipotez .....	1
1.2. Çalı manın Kapsamı ve Amaçları.....	3
2. GENEL B LG LER .....	4
2.1. nfertilite Giri .....	4
2.2. nfertilite Nedenleri .....	5
2.3. Erkek nfertilitesi .....	6
2.3.1. Spermatogenezis .....	6
2.3.2. Erkek infertilitesi Nedenleri .....	8
2.4. nfertil Çiftin De erlendirilmesi .....	16
2.4.1. Kadın nfertilitesinin de erlendirilmesi .....	17
2.4.1.1. Anamnez .....	17
2.4.1.2. Fizik Muayene.....	17
2.4.1.3. Tanı Testleri .....	18
2.4.2. Erkek nfertilitesinin De erlendirilmesi .....	21
2.4.2.1. Anamnez .....	22
2.4.2.2. Fizik Muayene.....	22
2.4.2.3. Semen Analizi.....	22
2.4.2.4. Sperm Fonksiyon Testleri .....	27
2.4.2.5. Biyokimyasal Testler .....	30
2.4.2.6. Anti-sperm Antikorları .....	31

2.4.2.7. Genetik Testler.....	31
2.4.2.8. Endokrin Testler.....	32
2.5. D Vitamini .....	32
2.5.1. D Vitamini Metabolizması .....	32
2.5.2. D Vitamini Etki Mekanizması.....	33
2.5.3. Üreme Organlarında D Vitamininin Etkisi .....	35
2.5.4. Erkeklerde D Vitamini ve Fertilite .....	36
2.6. Kalsiyum Mekanizması .....	38
2.7. Oksidatif Hasar.....	42
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	44
3.1. Etik Kurul Onayı.....	44
3.2. Hasta Seçimi.....	44
3.3. Çalışma Yöntemi ve Araştırılması Planlanan Değişkenler.....	44
3.4. Sperm ve Kan Örneklerinin Değerlendirilmesi.....	45
3.5. Seminal Sıvıda MDA ve D Vitamini Değerlendirilmesi.....	45
3.6. Hücre İçi Kalsiyum Miktarının Ölçümü.....	45
3.7. İstatistiksel Yöntemler .....	45
4. BULGULAR .....	46
4.1. Hastaların Özellikleri ve Grupların Karşılaştırılması.....	46
4.2. Hasta Grupları ile Sperm Parametrelerinin Karşılaştırılması .....	47
4.3. Hasta Grupları ile Seminal Sıvı Ölçümlerinin Karşılaştırılması .....	49
4.4. Seminal Sıvı 25(OH) Vitamin D Değerleri ile Sperm Parametrelerinin Karşılaştırılması .....	50
4.5. Hücre İçi Kalsiyum Değerleri ile Sperm Motilite Yüzdelerinin Karşılaştırılması .....	50
4.6. Seminal Sıvı MDA Değerleri ile Sperm Motilitesi ve Morfolojisinin Karşılaştırılması .....	52
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ .....	62
REFERANSLAR .....	64

## **KISALTMALAR**

WHO	Dünya Sa ık Örgütü (World Health Organization)
VDR	Vitamin D Reseptörü
ROR	Reaktif Oksijen Radikalleri
MDA	Malondialdehit
PTH	Parathormon
FSH	Folikül Stimülan Hormon
LH	Luteinizan Hormon
GnRH	Gonodotropin Salgılatıcı Hormon
DHT	Dihidrotestosteron
ACTH	Adrenokortikotropin Hormon
AMH	Anti Mülleryen Hormon
TSH	Tiroit Stimüle Edici Hormon
KF	Kistik Fibrozis
CFTR	Kistik Fibrozis Transmembran Düzenleyici Gen
PCOS	Polikistik Over Sendromu
HSG	Histerosalpingografi
AFS	Antral Folikül Sayımı
ZP	Zona Pellusida
PSA	Prostat Spesifik Antijen
AZF	Azoospermi Faktör
AR	Androjen Reseptörü
HOST	Hipoosmotik i me Testi
KAT	Klamidya Antikor Testi
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
BMI	Vücut Kitle Endeksi

## **EK LLER**

<b>ekil 1</b> Seminifer túbüllerde spermatogenezis .....	7
<b>ekil 2</b> Olgun spermin ematik görüntüsü .....	8
<b>ekil 3</b> Normal hormonal aks, primer ve sekonder hiopogonadizmin ematik görünümü .....	9
<b>ekil 4</b> Farklı ya gruplarında büyümeyen folikül sayısı otalamalarını gösteren histogram ...	20
<b>ekil 5</b> D vitamininin klasik etkileri .....	33
<b>ekil 6</b> D vitamininin çe itli dokular üzerindeki klasik olmayan etkileri .....	34
<b>ekil 7</b> D vitamini eksikli i ile erkek fertilitesi arasında öne sürülen ili kiler [9, 11, 98, 99]..	36
<b>ekil 8</b> Sperm kapasitasyonu.....	39
<b>ekil 9</b> Sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonun muhtemel etki mekanizması .....	41
<b>ekil 10</b> Sperm ve oosit etkile imi .....	42

## TABLULAR

<b>Tablo 1</b> Sık görülen kadın infertilitesi nedenleri .....	5
<b>Tablo 2</b> Herhangi bir partnere veya her iki partnere ba lı infertilite nedenleri .....	6
<b>Tablo 3</b> Erkek infertilitesine neden olabilecek hipotalamik – hipofizer hastalıklar .....	10
<b>Tablo 4</b> Erkek infertilitesine neden olabilecek testiküler hastalıklar .....	12
<b>Tablo 5</b> Normal sperm morfolojisi parametreleri .....	25
<b>Tablo 6</b> WHO sınıflamasına göre normal semen parametreleri .....	26
<b>Tablo 7</b> Hasta gruplarının klinik özellikleri .....	47
<b>Tablo 8</b> Hasta grupları ile sperm parametrelerinin kar ıla tırılması .....	48
<b>Tablo 9</b> leri hareketli sperm sayısı için regresyon analizi .....	48
<b>Tablo 10</b> Normal sperm morfoloji yüzdesi için regresyon analizi .....	49
<b>Tablo 11</b> Seminal sıvı parametrelerinin gruplar arası da ılımları .....	49
<b>Tablo 12</b> Seminal sıvı 25 (OH) vitamin D düzeyleri ile sperm parametreleri arasındaki korelasyon .....	50
<b>Tablo 13</b> Serum 25 (OH) vitamin D düzeyi ile hücre içi kalsiyum düzeyi ve sperm motilite yüzdelerinin korelasyonu .....	50
<b>Tablo 14</b> Hücre içi kalsiyum düzeyi ile serum 25 (OH) vitamin D düzeyi ve sperm motilite yüzdelerinin korelasyonu .....	51
<b>Tablo 15</b> Total sperm motilite yüzdesi için regresyon analizi .....	51
<b>Tablo 16</b> leri sperm motilite yüzdesi için regresyon analizi .....	52
<b>Tablo 17</b> MDA de erleri ile serum vitamin D düzeyi ve sperm yüzdelerinin kar ıla tırılması .....	52

## 1. G R

### 1.1. Gerekçe ve Hipotez

İnfertilite, 12 ay boyunca korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından infertilite üreme ça ındaki çiftlerin %15'ini etkileyen önemli bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir [1]. İnfertilite nedenlerinin %25'i sadece erkek faktöründen oluşurken, %50'si kombine kadın ve erkek faktöründen oluşur [2]. İnfertil çiftin değerlendirilmesi kadın ve erkek partner için eş zamanlı olarak ve ayrıntılı anamnez ile başlamalıdır. Anamnez ile etyolojiye yönelik önemli ipuçları sağlanabilir. Kadın infertilitesinin değerlendirilmesinde ilk basamak tanı testleri ovulasyonun değerlendirilmesi, over rezervinin değerlendirilmesi ve tüplerin ve endometriyal kavitenin değerlendirilmesi için çeşitli kan testlerini ve görüntüleme yöntemlerini içerir [3]. Erkek infertilitesi değerlendirilmesinde ilk ve en önemli test semen analizidir. Standart semen analizinde bakılan parametreler: likefaksiyon süresi, viskozitesi, semen hacmi, pH'sı, sperm agglütinasyonu, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, toplam hareketli ve ileri hareketli sperm yüzdesi, normal morfoloji yüzdesi ve sperm başı hücre varlığı/miktarıdır [4]. Standart semen analizi parametrelerinin hiçbirisi spermin fertilizasyon kapasitesini göstermede spesifik değildir ve standart semen analizi kesin fertil - infertil ayırımında yetersiz kalabilmektedir. Ancak bu parametrelerden konsantrasyon, hareket ve morfoloji; fertil – subfertil ayırımında sıklıkla kullanılan ve fertilizasyon potansiyelini göstermede daha duyarlı kabul edilen parametrelerdir. Normal fertilizasyon için maturasyon ve kapasitasyon, hiperaktivasyon, zona pellusidaya bağlanma, akrozom reaksiyonu, sperm- oosit membran füzyonu, kromatin dekondeksasyonu ve erkek – kadın pronükleuslarının füzyonu basamaklarının doğru şekilde gerçekleşmesi gereklidir. Bu basamaklarda spermin fertilizasyon potansiyelinin gösterilmesinde çeşitli sperm fonksiyon testleri kullanılmaktadır [5].

D vitamini vücutta özellikle kalsiyum ve fosfat metabolizmasında rol oynayan, iskelet sistemi, paratiroid bezi, deri, immün sistem, üreme organları gibi çeşitli dokularda etkisini gösteren steroid türevi bir hormondur [6]. Vücutta total D vitamininin %80-90'ı ultraviyole ışınları uyarısı ile ciltte üretilir. Üretilen D vitamini, karaciğerde vücutta D vitamini düzeyini ve yeterliliğini gösteren 25 hidroksi vitamin D'ye metabolize edilir. Daha sonra böbrekte aktif form olan 1,25 dihidroksi vitamin D'ye dönüşür [7]. D vitamini dokulardaki biyolojik etkisini D vitamini reseptörü (VDR) üzerinden gösterir. Kadın ve erkek üreme organlarında VDR ekspresyonu

oldu u gösterilmi tir. Yapılan çalı malarda D vitamini eksikli inin, kadınlarda fertilitede azalma, polikistik over sendromu ve endometriyozis ile ili kili oldu u gösterilmi tir [8]. Erkek infertilitesi üzerine yapılan çalı malarda D vitamini düzeyi ile androjen dü üklü ü, sekonder hipogonadizm, sperm parametrelerinde bozulma arasında ili ki oldu una dair yayınlar vardır [9]. Aynı zamanda D vitamininin, sperm hareketini, akrozom reaksiyonunu ve fertilizasyon kapasitesini arttırdı ı gösterilmi tir [10]. D vitaminin erkek fertilitesi üzerine olan etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamı olmasına ra men çe itli çalı malarda olası mekanizmalar üzerinde durulmaktadır.

n vitro olarak yapılan bir çalı mada D vitaminin sperm üzerine etkisinin VDR üzerinden hücre içi kalsiyum miktarının artı na ba lı olabilece i gösterilmi tir [11]. Sperminin zona pellusidaya ba lanmasını takiben hücre depolarizasyonu ve voltaj ba ımlı kalsiyum kanallarının açılması gerçeikle ir. E zamanlı olarak hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salınımı gerçeikle ir. Hücre içi kalsiyum miktarı artı na ba lı olarak fertilizasyon için gerekli olan sperm hareketi artı ı yani hiperaktivasyon gerçeikle ir [12].

Aynı zamanda D vitamininin antioksidan etkisine dair çe itli çalı malar mevcuttur. D vitamininin antioksidan mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte çe itli teoriler öne atılmı tır. Bu teorilerden en çok kabul göreni, vitamin D eksikli inde parathormonun (PTH) artı na ba lı böbrekte 1 hidroksilaz aktivasyonu ve 25 hidroksi vitamin D'nin 1,25 dihidroksi vitamin D'ye dönü ümünün artması, hücre içi kalsiyum miktarının artması ve reaktif oksijen radikallerinin (ROR) olu umunun uyarılmasıdır [13]. ROR, kapasitasyon, hareket, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gibi normal sperm fonksiyonları için gereklidir [14], ancak artmı ROR miktarı fizyolojik antioksidanların arasındaki dengenin bozulmasına ve oksidatif hasara neden olur [15]. Plasma membranı fazla miktarda ROR'nin hasarına en hassas makromoleküller olan çoklu doymamı ya asidi içerir [16]. Plasma membranında oksidatif stres hasarı, sperm hareketini azaltır, DNA hasarını artırır ve oosit-sperm füzyonunu azaltır [17]. Nedeni açıklanamayan anormal semen analizi olan infertil erkeklerin %40 -80'inde [15] ve normal semen parametreleri olan infertil erkeklerin %11-78,5'inde [18, 19] artmı reaktif oksijen radikalleri oldu u gösterilmi tir.

Çalı mamızda serumda ve seminal sıvıda bakılan D vitamini düzeylerinin erkek fertilitesi üzerine olan etkileri sperm parametreleri bakılarak ara tırılacaktır. Olası etki mekanizmaları



açısından antioksidan etki mekanizması, malondialdehit (MDA) maddesi üzerinden ve hücre içi kalsiyum miktarı artışı mekanizması ise seminal sıvıda hücre içi kalsiyum miktarı ölçülerek de ertlendirilecektir. Bu çalışmanın infertil erkek hasta gruplarında sperm kalitesinin artırılmasında tedavide D vitamini kullanımı açısından yol gösterici olacaktır.

**Hipotez:** D vitamininin sperm üzerine etkilerinin araştırılmasında seminal sıvıda D vitamini ölçümü, kandaki D vitamini ölçümüne göre daha duyarlı bir yöntem olabilir. D vitamini sperm hücresinde VDR üzerinden hücre içi kalsiyum salınımını artırarak veya başka mekanizmalar yoluyla, sperm hareketini arttırmakta ve hiperaktivasyonda bir role sahip olabilir. Aynı zamanda oksidatif strese bağlı hasardan korunmada ve spermelerin normal morfolojisini sürdürmesinde de etkisi olabilir. Bu konularda seminal sıvıda yeterli D vitamini düzeyinin sağlanması normal morfolojide sperm sayısında, sperm hareketinde ve sonuçta fertilizasyon kapasitesinde artış ile ilişkilili olabilir.

## 1.2. Çalışmanın Kapsamı ve Amaçları

Yukarıda yer alan literatür bilgileri ışığında çalışmanın amaçları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

- D vitamini düzeylerinin sperm parametreleri ve fertilizasyon potansiyeli ile ilişkili olup olmadığını araştırılacaktır.
- Literatürde, bildiğimiz kadarıyla, D vitamininin erkek fertilitesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda D vitamini kan serumu düzeyleri temel alınmış olup, seminal sıvıda gerçek D vitamini düzeyini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk defa serumda ve seminal sıvıda bakılan D vitamini düzeyleri karşılaştırılacak ve sperm parametreleri ile hangi ölçümün daha anlamlı olup olmadığını de ertlendirilecektir.
- Seminal sıvıdan yapılacak olan hücre içi kalsiyum miktarı ölçümü ile D vitamininin sperm üzerine olabilecek etkisinin kalsiyum bağımlı olup olmadığını literatürdeki mevcut çalışmalardan daha fazla örnek sayısı ile de ertlendirilecektir.
- Yine bildiğimiz kadarıyla D vitamininin sperm üzerindeki olası antioksidan özelliğini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Çalışma kapsamında seminal sıvıda lipid oksidasyonun göstergesi olan ve oksidatif stres hasarının belirteci olarak kullanılan malondialdehit (MDA) maddesi bakılacaktır. MDA düzeyleri ile sperm parametreleri ve

D vitamini düzeyleri arasındaki ilişki oksidatif stres hasarı ve D vitamininin antioksidan etkinliği açısından değerlendirilecektir.

- D vitamininin eksikliği olan infertil erkeklerde sperm parametrelerinin iyileştirilmesinde ve oksidatif stresten korunmada tedavide kullanılabilirliği değerlendirilecektir.

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Eylül 2016 - Ekim 2016 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine infertilite şikayeti ile başvuran toplam 100 erkek hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

## **2.GENEL BULGULAR**

### **2.1. INFERTİLİTE**

Infertilite dünya çapında yaklaşık 72,4 milyon çifti etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. Infertil çiftler gelişmiş ülkelerde üreme çağındaki çiftlerin % 3,5-16,7'sini, gelişmekte olan ülkelerde %6,9-9,3'ünü ve ortalama tüm dünyada %8-12'sini oluşturur [20, 21]. Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre infertilite, korunmayan çiftlerde düzenli ilişkiye rağmen 12 ay boyunca gebelik oluşmaması olarak tanımlanır. [1]. Ancak yapılan çalışmada infertilite için geçen zamanı 24 ay olarak belirlenmektedir [22]. Kadın yaşı 35 yaşın üstünde olanlarda bu süre 6 ay olarak kabul edilir [1]. Daha önceden gebeliği olmayan çiftler primer, gebeliği olan çiftler ise sekonder infertil olarak kabul edilirler.

Fekundabilite, bir menstrual siklusa gebe kalabilme olasılığıdır. Düzenli ilişkiye giren fertil bir çiftin siklus başına fekundabilitesi yaklaşık %20-25'dir [23]. Düzenli ilişkiye giren, normal çiftlerde gebelik oranı bir yıl içinde %85-90'dır [21]. Fertilite ise gebelik elde etme kapasitesidir ve yaş ile fertilite azalmaktadır. Yapılan çalışmada 19-26 yaş arasındaki kadınların 35-39 yaş arasındaki kadınlara göre gebe kalma ihtimalinin iki kat fazla olduğu gösterilmiştir. Kadınlarda yirmili yaşların sonlarından itibaren, erkeklerde ise 35 yaşından itibaren fertilite azalmaktadır. Kadınlarda 35 yaşından itibaren belirgin azalma görülürken erkeklerde belirgin azalma görülen yaş 50'li yaşlardır. Kadınlarda yaşa bağlı fertilite azalması erkeklerden daha belirgindir [23]. Yaşla bağlı fertilite azalmasından multiple faktörler sorumlu tutulmaktadır [24]. Yaş, obezite, alkol ve sigara tüketimi, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, çevresel toksinler, genetik etkenler gibi birçok neden infertiliteye neden olabilir [25].

## 2.2. INFERTİLİTE NEDENLERİ

infertilite nedenlerinin erkek veya kadın faktör olarak kesin tanıyı yapılamamakla beraber, tüm infertilite vakalarının % 20'sini ovaryan disfonksiyonun, %20'sini tubal ve pelvik patolojilerin, %30'unu erkek faktörün ve geriye kalan %30'unu bu faktörlerin kombinasyonlarının oluşturduğu kabul edilir [26]. Sık görülen kadın infertilitesi nedenleri ve herhangi bir partnere veya her iki partnere bağlı infertilite nedenleri tablo1 ve 2'de belirtilmiştir.

**Tablo 1** Sık görülen kadın infertilitesi nedenleri [27]

<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Ovulatuvar Bozukluklar<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Polikistik over sendromu (PCOS)</li><li>▪ Hiperprolaktinemi</li><li>▪ Hipotalamik hipogonadizm</li><li>▪ Prematür ovaryan yetmezlik</li><li>▪ Hipotiroidizm</li><li>▪ Konjenital adrenal hiperplazi</li></ul></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tubal Patolojiler<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Tubal tıkanıklık</li><li>▪ Endometriyozis</li><li>▪ Pelvik adezyon</li></ul></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Uterin Patolojiler<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Myom</li><li>▪ Endometriyal polip</li><li>▪ Mülleryan anomali</li><li>▪ Servikal stenoz</li><li>▪ İntrauterin sine i</li></ul></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Oosit Kalitesi<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Yaşla bağlı anöploidi</li></ul></li></ul>

**Tablo 2** Herhangi bir partnere veya her iki partnere ba lı infertilite nedenleri[27]

➤ Açıklanamayan infertilite <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Fertilizasyon defekti</li></ul>
➤ Dengeli translokasyon taşıyıcılığı
➤ lili sıklığının az olması

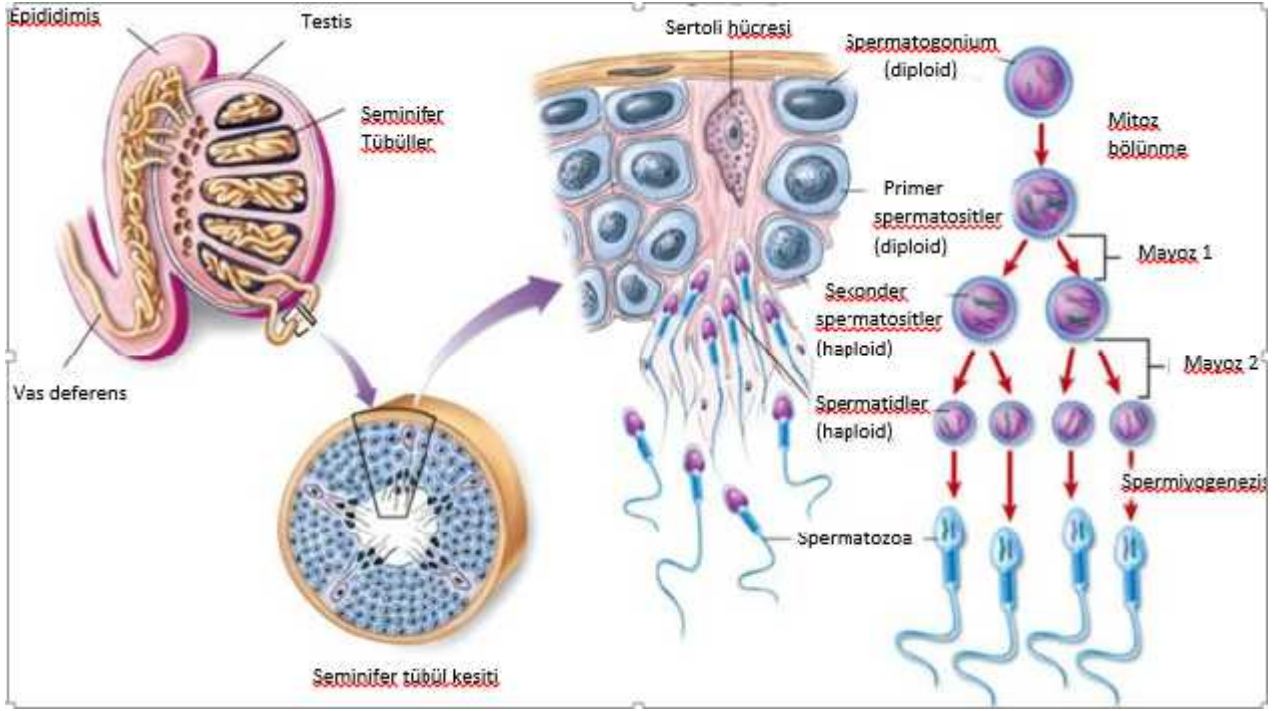
### **2.3. ERKEK INFERTİLİTESİ**

Erkek infertilitesi, tek başına infertilite nedenlerinin %25'ini oluştururken, %50'ye yakınında etkili eden faktör olarak bulunur. Fertilizasyon için spermin normal spermatogenez basamaklarını tamamlaması gerekir. Normal fertilizasyon için gereken spermatogenez basamakları; maturasyon ve kapasitasyon, hiperaktivasyon, zona pellusidaya bağlanma, akrozom reaksiyonu, sperm- oosit membran füzyonu, kromatin dekondeksasyonu ve erkek – kadın pronükleuslarının füzyonunu içerir [2]. Tüm bu basamakların gerçekleşebilmesi için normal genetik yapı ve normal çalışkan hormonal aks gerekir. Erkek infertilitesi birçok konjenital veya edinsel bozukluk nedeniyle meydana gelebilir. Direkt gonadları etkileyen bozukluklarda spermatogenezdeki bozulma testosteron üretimine göre daha fazla olurken, hipofiz veya hipotalamus düzeyindeki bozukluklarda eşit düzeyde etkilenirler [28].

#### **2.3.1. SPERMATOGENEZ**

Ejakülasyon sperm ve seminal sıvıdan oluşur. Spermatogenezis iki temel süreci kapsar: spermatositogenezis ve spermiyogenezis. Spermatositogenezis; FSH ve testosteronun etkisi ile testislerin seminifer tübüllerinde sperm üretimidir. Spermiyogenezis ise; anatomik olarak olgunlaşmasını tamamlamış spermin, seminifer tübüllerde ve epididimiste bulunduğu süre boyunca androjen bağımlı olarak fonksiyonel olgunlaşmasının tamamlanmasıdır. Spermiyogenezis, sitoplazmanın kaybı, kromatin kondensasyonu ve flajella ve akrozom bağımlı olgunlaşması gibi anatomik farklılaşmanın son basamaklarını da içerir. Epididimiste sperm hareket ve fertilizasyon yeteneğini kazanır. Seminal sıvı esas olarak prostat ve seminal vezikül sekresyonlarından oluşur. Androjen bağımlı olarak sentezlenirken, ejakülasyon ile sekresyonu kolinerjik sistemin kontrolü altındadır [29].

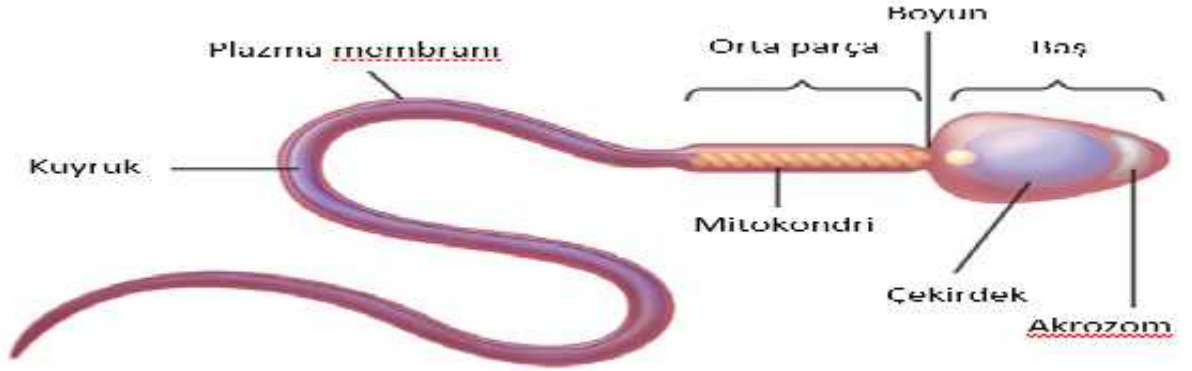
Spermatogenezis, luteinizan hormon (LH) tarafından uyarılan Leydig hücrelerinde üretilen testosteron ve FSH'nın Sertoli hücreleri ve germinal epitel üzerine olan etkilerine ba ımlı bir süreçtir ve Y kromozomundaki genler tarafından yönetilmektedir. Sperm üretimi ve farklılaşmasının önemli bir kısmı seminifer tübüllerde gerçekleşir. Seminifer tübüllerin sayısı yaklaşık olarak 1000/testis kadardır ve testis hacminin %80'ini oluştururlar. Seminifer tübüllerin terminal uçları birleştirilerek 6 ila 12 kanal olarak epididimise açılırlar. Diploid spermatogoninin (46 kromozomlu) mitozu ve farklılaşması ile haploid spermatosit (23 kromozomlu) oluşumu ve sonrasında mayoz ve ileri farklılaşma ile haploid spermatidlere dönüşümü seminifer tübüllerde gerçekleşir ( ekil-1) [29].



### ekil 1 Seminifer tübüllerde spermatogenezis

Spermatidlerin lümene salınması ve lümeninde epididimise doğru hareketi öncesinde spermiyogenezis olgun spermatozoa oluşumu ile sonuçlanır ( ekil-2). nsanda spermatogenezis 64 ila 74 gün sürer ki seminifer tübüllerin kıvrımlarının uzunluğu ile doğru orantılıdır. Seminifer tübülleri terk eden spermatozoa anatomik olarak olgunlaşmış olsa da epididimiste normal hareketini ve ovumu fertilizasyon yeteneğini kazanmalıdır. Bu iki süreç androjen ba ımlıdır ve dihidrotestosteron tarafından düzenlenir [29]. Sperm ejakülasyona kadar epididimiste depolanır. Kadın genital traktında kapasitasyon olur ve hiperaktivasyon olur [30].

Spermatogenezis için skrotum içindeki sıcaklığın normal vücut sıcaklığının 2- 4°C altında olması gereklidir. Sıcaklık değişiklikleri skrotum içindeki pampiniform pleksus ile kan akışı ayarlanarak dengede tutulmaya çalışılır. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar kan – testis bariyerini oluşturur. Bu şekilde seminifer tübüller arasındaki boşluk kan kaynaklı yabancı maddelerden korunurken aynı zamanda spermatogenesis için immünolojik olarak korunmuş bir çevre oluşturulmuş olur. Sperm antijenlerinin vasküler alana geçişini engellemesi için erkeklerde oto-sperm antikorları nadir görülür. Leydig hücrelerinde üretilen androjen primer androjen kaynağıdır ve Sertoli hücrelerinde FSH uyarımı ile üretilen ve salgılanan androjen bağlayıcı protein seminifer tübüllerde androjen rezervi olarak görev yapar [29].



## **ekil 2** Olgun sperminematik görüntüsü

Spermatogenezisin hormonal kontrolü hipotalamik pulsatil gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımı ile uyarılan hipofizden salgılanan FSH ve LH ile sağlanır. Hipotalamus, hipofiz, testis arasında kontrol negatif feed-back sistemi ile olmaktadır. Yüksek serum testosteron seviyeleri GnRH ve LH salınımını baskılamakta, testosteronun fizyolojik düzeyleri FSH üzerinde baskılanma yaratmaz. FSH uyarımı ile Sertoli hücreleri tarafından salgılanan inhibin B, hipofizer düzeyde FSH salgılanmasını baskılar [29].

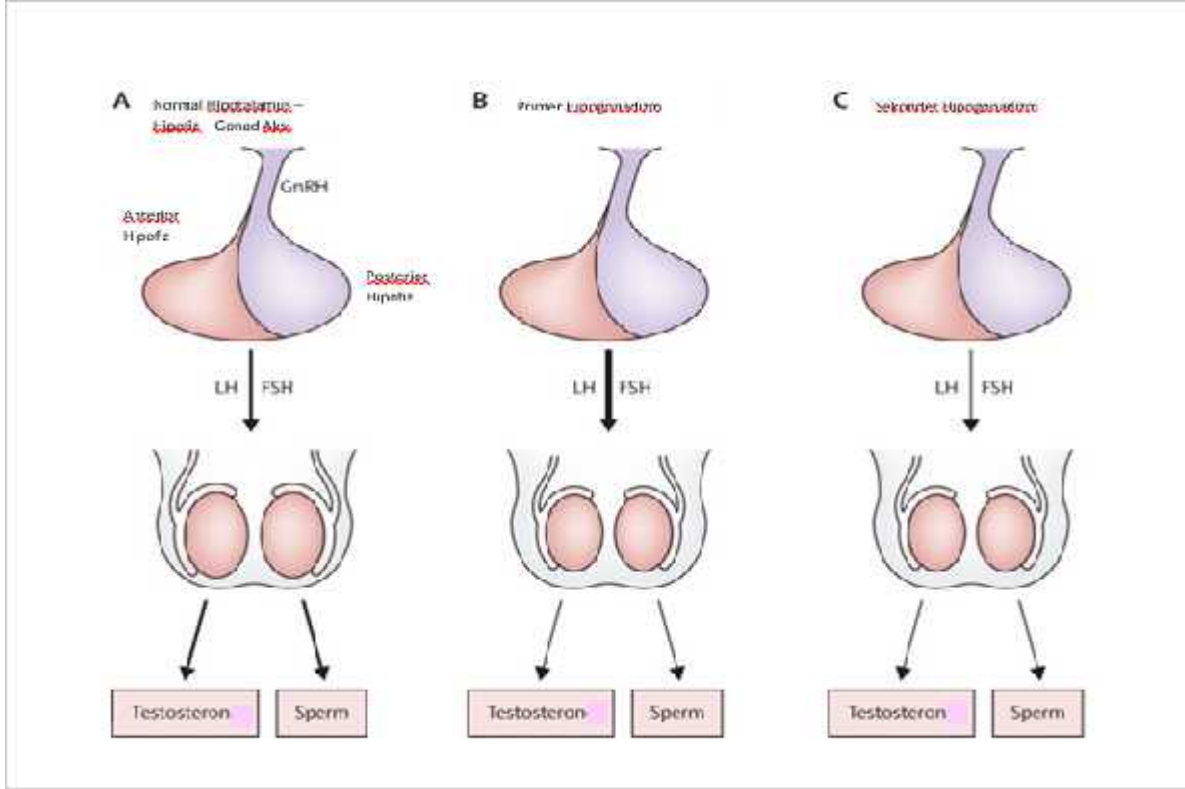
### **2.3.2. ERKEK INFERTİLİTES NEDENLERİ**

Erkek infertilitesinin nedenleri obstrüktif, obstrüktif olmayan ve fonksiyonel bozukluklar olarak veya bozukluğun kaynaklandığı basamağa göre hipogonadotropik hipogonadizm (sekonder hipogonadizm), hipergonadotropik hipogonadizm (primer hipogonadizm) veya normogonadotropik hipogonadizm olarak sınıflandırılabilirler. Primer hipogonadizm

gonadların hormonal uyarıma cevap vermemesi nedeniyle olur. FSH ve LH düzeyleri normal ya da negatif feed-back mekanizmasının olmaması sonucu artmıştır. Sekonder hipogonadizmde ise azalmış GnRH ve /veya LH ve FSH uyarımı nedeniyle azalmış testosteron ve sperm üretimi vardır [27].

Erkek infertilitesi nedenleri 4 ana kategoride incelenebilir:

- Hipotalamik hipofizer hastalıklar (sekonder hipogonadizm) (%1 -2)
- Testiküler hastalıklar (primer hipogonadizm) (%30- 40)
- Sperm taşımasında bozukluklar (%10 -20)
- İdiyopatik (belirli bir nedenin bulunamadığı ve normal semen analizi olan grup) (%40-50)



**ekil 3** Normal hormonal aks, primer ve sekonder hipogonadizmin sematik görünümü. Okların kalınlığı üretilen hormon miktarını göstermektedir [28].

## Hipotalamik ve Hipofizer Hastalıklar

GnRH veya gonadotropin eksikliği nedeniyle olabilecek her türlü hipotalamik veya hipofizer hastalık erkek infertilitesine neden olabilir. Erkek infertilitesine neden olabilecek hipotalamik – hipofizer hastalıklar konjenital, edinsel veya sistemik olabilir.

**Tablo 3** Erkek infertilitesine neden olabilecek hipotalamik – hipofizer hastalıklar

Konjenital	Edinsel	Sistemik
izole gonadotropin eksikliği (Kallman sendromu)	Hipotalamik ve hipofizer tümörler (kraniofranjiom, makroadenom)	Kronik hastalıklar
Tek gen mutasyonları (KAL1, KAL2, PROK2, PROKR2, LHX3, LHX4, HESX1, PROP-1)	infiltratif hastalıklar (sarkoidoz, histiyositoz, tüberküloz, hemokromatozis)	Malnütrisyon
	Hormonal bozukluklar (hiperprolaktinemi, androjen artışı)	Enfeksiyonlar (menenjit)
	ilaçlar (GnRh analogları, opiyatlar, glukokortikoidler, androjenler)	Obezite

### Konjenital Nedenler

En sık konjenital neden, seksüel infantilizme neden olan, izole idiyopatik gonadotropin eksikliği dır. Hipofizdeki reseptörleri normal olmasına rağmen izole GnRH eksikliği vardır. En sık nedeni Kallman sendromudur ve vakaların %60'ını oluşturur. Kallman sendromunda izole GnRH eksikliği ile anosmi, renk körlüğü, yüz orta hat defekti, duyma kaybı, sinkinezi veya böbrek anomalilerini içeren bir veya daha fazla gonadotropin eksikliği anomalisi olabilir. Hastaların tamamına yakınında tanımlanabilen bir genetik bozukluk bulunmaz [31].

GnRH nöronlarının hipotalamusa normal migrasyonunda görev alan yüzey adezyon molekülleri veya reseptörlerini kodlayan genlerde çeşitli mutasyonlar (KAL1, KAL2, PROK2, PROKR2) tanımlanmıştır. Embriyogenez sırasında hipofiz gelişiminde rol oynayan transkripsiyon faktörlerini (LHX3, LHX4, HESX1, PROP-1), GnRH reseptörünü veya FSH ve LH'nin



subünitini etkileyen daha nadir gen mutasyonları tanımlanmıştır. KAL1, FGFR1, PROK2 ve PROKR2 mutasyonları tanımlanmıştır [31].

Gonadotropin sekresyonunda anormallere yol açan diğer genetik nedenler: Prader-Labhart-Willi sendromu, Laurence-Moon-Biedl – Bardet sendromu, Leopard sendromu, Carpenter sendromu, Rud sendromu, Loewe Sendromu ve Familial Serebellar Ataxia sendromudur.

### **Edinsel Nedenler**

Hipotalamusun tümörleri ve infiltratif hastalıkları, kafa travması, cerrahi ve subaraknoid kanama gonadotropin eksikliğine neden olabilir [32]. Hemokromatozis izole santral hipogonadizme neden olabilir. Erken tanı konulursa flebotomi ile düzeltilebilir [33].

Hiperprolaktinemi, GnRH sentez ve salınımını baskılayarak sekonder hipogonadizme neden olabilir. Hipofizde gonadotropin prolaktinoma makroadenomuna bağlı kitle basısından etkilenmediği durumlarda, prolaktin seviyesinin normale dönmesi ile GnRH salınımı normal döner ve aks normal olarak çalışmaya devam eder [28].

Opiatlar ve glukokortikoidler fizyolojik dozun üstüne çıktığında doz bağımlı olarak GnRH sentezini baskılayarak androjen eksikliğine, hipogonadizm ve subfertiliteye neden olabilirler [34].

### **Sistemik Nedenler**

Sistemik hastalıklar GnRH sentezini azaltarak, hiperkolesterolemi ile veya aromatisasyonun artmasına bağlı hiperöstrojenemi mekanizmaları ile hipogonadotropik hipogonadizme neden olabilirler. Bu durum genellikle geçicidir ve testosteron seviyeleri hastalığın ciddiyeti ile orantılı olarak azalır. Ciddi malnütrisyon da santral hipogonadizme neden olabilir [28].

Obezite hipogonadizme ve erkek subfertilitesine etkilidir. Obezitenin normal testiküler fonksiyonu direkt olarak veya insülin resistansı yoluyla baskılayabileceğine dair verilerin olmasına rağmen verilerin çoğu obezitedeki primer hipogonadizm mekanizmasının LH ve FSH'nin baskılanması nedeniyle olduğunu göstermektedir. Obezite ile uyarılan hipogonadotropik hipogonadizm ve subfertilite testosteronun periferik dokularda östrodiol aromatisasyonuna bağlı olabilir. Östrodiol LH salgılanmasının güçlü bir inhibitörüdür. Obezite ile uyarılan hipogonadotropik hipogonadizm leptin rezistansına etkilidir. Leptinin normal

erkek üremesinde gerekli oldu una dair insan ve hayvan çalı maları mevcuttur. Leptin GnRH salınımı arttırarak, FSH ve LH salınımını arttırır. Obezite sıklıkla leptin rezistansı ile ili kilidir ve fonksiyonel leptin eksikli i obezite ile uyarılan hipogonadotropik hipogonadizme e lik eder [35].

### **diyopatik**

Normal pubertal geli ime sahip ve hatta çocuk sahibi erkeklerde eri kin ba langıçlı idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm saptanmı tır. Altta yatan mekanizma olarak GnRH pulsasyon mekanizmasında azalmı aktive öne sürülmektedir [36].

### **Testiküler Hastalıklar**

Primer gonadal yetmezlik azoospermi ve oligosperminin ana nedenidir. Edinsel ve konjenital olabilir.

**Tablo 4** Erkek infertilitesine neden olabilecek testiküler hastalıklar

Konjenital	Edinsel
Klinefelter's Sendromu (XXY)	Or it ( Viral: kabakulak, arbovirüs; granülomatöz: lepra, tüberküloz)
Y kromozom delesyonları	Epididimo –or it (gonore, klamidya)
Andojen duyarsızlılı 1 sendromu	mmünolojik hastalıklar (poliglandüler otoimmün hastalıklar)
5 redüktaz eksikli i	Travma – torsiyon
Konjenital anor i	Varikosel
Kriptor idizm	Hipertermi
Myotonik distrofi	laçlar (alkilleyici ajanlar, ketokanazol, spironolakton, antiandrojenler)
	Radyasyon ve çevresel toksinler (karbon disülfid, kadmiyum)
	Sistemik hastalıklar (renal yetmezlik, siroz, kanser, sarkoidoz vb)

## **Konjenital Nedenler**

Klinefelter's Sendromu; primer testiküler disfonksiyonun ana nedenlerinden biridir. Hipogonadizmin en sık genetik nedenidir ve 1/600 canlı do umda görülür. Azoospermisi veya dü ük sperm konsantrasyonu olan infertil erkeklerin %10-15'ini olu turur. En sık genotipi 47,XXY olmakla beraber 46,XY/47,XXY mozaizmi sık görülür. Hastaların küçük, fibrotik testisleri vardır ve genellikle tübüler hasar nedeniyle infertildirler. Mosaizmi olan bazı hastalar puberteye kadar normal testis boyutu ve spermatogenezise sahiptirler. Puberteden itibaren giderek artan fibrozis olur ve germ hücreleri zamanla artan ekilde azalır. Normal fenotipi olan hastaların kan testosteron konsantrasyonları dü ük veya normalin alt sınırındadır. Klinefelter's sendromu, açıklanamayan primer hipogonadizmi, küçük testisleri ve azoospermisi olan erkeklerde dü ünülmeli ve karyotipleme yapılmalıdır. Klinefelter's sendromunda kriptom idizm ve psikososyal anormallikleri görülme sıklıklarında da artı olur [37, 38].

Y kromozomu mikrodelesyonları; Y kromozomunun uzun kolundaki (Yq11) erkek – spesifik bölgede meydana gelir ve Klinefelter's sendromundan sonra erkek infertilitesinin en sık genetik nedenini olu tururlar. Bu bölge spermatogenezis için gerekli genlerin oldu u özel bir alan olan azoospermi faktörü (AZF) içerir. AZFa, AZFb ve AZFc olmak üzere üç gen bölgesi içermektedir. AZFa veya AZFb bölgeleri komplet delesyonları tipik olarak azoospermiye neden olmaktadır. AZFc gen bölgesi mutasyonları oligospermiden azoospermiye kadar de i en ekilde infertiliteye neden olabilmektedir. Azoospermik erkekler, oligospermik erkeklere göre daha fazla mikrodelesyona sahiptirler [39]. Daha geni delesyonlar, testiküler biyopsilerde sadece Sertoli hücrelerinin görülebildi i tam tübüler atrofiye neden olur (sadece Sertoli hücresi sendromu). Kanda testosteron ve LH konsantrasyonları genellikle normaldir ama FSH konsantrasyonları azalmı inhibin B üretiminin negatif feedback etkisi nedeniyle artmı tır [40]

Androjen duyarsızlılı ı sendromu; infertilite ve virilizasyon bozuklu una neden olur. Erkeklerdeki bozulmu virilizasyonun en sık nedenlerinden biridir. Androjenler, özellikle testosteron, erkek fertilitesi için Sertoli hücrelerine ve sperm maturasyonuna etkisi nedeniyle gereklidir. Androjenler bu etkilerini androjen reseptörleri (AR) üzerinden gösterirler. Androjen duyarsızlılı ı sendromunda AR'nün androjen duyarsızlılı ı söz konusudur [41]. AR'nün duyarlılı ına göre parsiyel duyarsız veya tam duyarsız olabilir. Klinik fenotip, tamamen kadın

fenoptipten (tam duyarsız), hafif virilizasyon bozuklu una veya sadece infertil (parsiyel duyarsız) olan erkek fenotipe kadar de i kenlik gösterir. Parsiyel androjen duyarsızlı ı Reifenstein sendromu olarak adlandırılır. [42]. X kromozomunda Xq11 –q12’de yer alan AR geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu olu ur. Hemizigot kalıtım paternine ra men, de nova mutasyonlar vakaların %30’unu olu turur. AR geninde 800’den fazla mutasyon saptanmı tır ve bu mutasyonların ço unu missense (anlamsız) mutasyonlar olu turur [43].

5 redüktaz testosteronun dihidrotestosterona (DHT) dönü ümünü sa layan enzimdir. 5 redüktaz geni 2. Kromozomun kısa kolunda yer alır. ki izoformu vardır. Erkek fertilitesinde yeri olan 5 redüktaz izoenzim 2’dir. 5 redüktaz eksikli i otozomal resesif kalıtım paterni gösterir. Eksikli inde ürogenital sinüsün ve genital tüberkülün farklıla masından sorumlu DHT olmaması nedeniyle ambigu genitalya olu ur. nfertilite birkaç nedenden dolayı olu ur. Düzeltilmemi kriptor idizm ile ili kili azalmı sperm üretimi ve spermatogoninin spermasite dönü ümündeki bozukluklardan kaynaklanabilir. Aynı zamanda az geli mi prostata ba lı dü ük semen hacmi sperm ta ınmasını etkiler. Ek olarak semen, prostat spesifik antijen eksikli ine ba lı olarak likefiye olmayabilir [44].

### **Edinsel Nedenler**

Kabakulak or iti; a ılamının yaygınla ması ile birlikte, or itin ortaya çıkma ya ı çocukluktan eri kin döneme do ru kaymı tır. Or it, parotiti olan erkeklerin %15-30’unda görülür ve a rılı testiküler geni lemeye neden olur. Esas olarak seminifer tübüller etkilenir ve %30 hastada testiküler atrofi geli ir. Fertilitate genellikle korunur. Nadir olarak dü ük kan testosteron konsantrasyonları görülür [28].

Travmaya testisler vücut dı ı yerle imleri nedeniyle yatkındırlar. Künt travma vakaların yakla ık olarak yarısında atrofiye yol açar. Testiküler torsiyon ise testis perfüzyonunun bozulmasına neden olur. Cerrahi düzeltme 6 – 8 saat içinde yapılırsa testis canlılı ı korunabilir [33].

Kriptor idizme ba lı artmı testiküler ısı veya varikosel azalmı spermatogenesis ile ili kili olabilir. Geni varikoseller, testiküler ısı yoluyla veya intratestiküler reaktif oksijen radikalleri nedeniyle spermatogeneziste bozulmaya neden olabilir. Varikoselin infertiliteyle ili kili oldu una dair çeli kili bulgular mevcuttur Çeli kili bulgular olmasına ra men dü ük sperm

konsantrasyonu olan subfertil erkeklerde geni varikoseller için varikoselektomi önerilmektedir [45, 46].

laçlar sekonder hipogonadizmin önemli bir nedenidir. Glukokortikoitler fizyolojik dozun üstündeki dozlarda düzelebilen primer hipogonadizme neden olurlar. Ketokanazol aynı zamanda direk olarak testiküler steroidogenezde düzelebilen baskılanmaya neden olur [28].

Alkilleyici kemoterapötik ajanlar (siklofosamid ve prokarbazin gibi), en kötü gonadal toksik etkiyi gösterir ve zarar toplam dozla orantılıdır. Puberte sonrası, testislerin zarara en hassas oldukları dönemdir. Seminifer tübüllerin germinal epiteli, Leydig hücrelerine göre hasara daha duyarlıdır. Spermatogenez baskılanması tedavinin ba lamasından 2 hafta sonra ba lar ve 8-12 hafta içinde azospermi görülebilir [47]. yile me kök hücrelerin (spermatogonia) canlılığı na ba lıdır. E er canlılıkları korunduysa spermatogenez tedavinin bitmesinden sonra 12 hafta içinde geri döner. Germinal epitel aynı zamanda radyasyon hasarına da duyarlıdır [48]. Tiroit hastalığı için radyoyot tedavisi testiküler hasara ve anormal spermatogenezise neden olabilir. Bu anomaliler genelde 6 -12 ay arasında düzelirler, ancak yüksek radyoyot tedavi dozlarında (>150mCi) daha yava iyile me veya fertilitede kalıcı hasar meydana gelebilir [49]. Sperm kryoprezervasyonu kemoterapi ve radyoterapi öncesi hastalara önerilmelidir. Tütün veya alkol spermatogeneziste kalite ve sayıda azalma ile ili kilidir [50]

Klinik olarak belirgin hipotiroidi ve hipertiroidi normal spermatogenezisi bozarak erkek subfertilitesine neden olabilir [51]. Adrenal hastalıkları çe itli mekanizmalarla erkek subfertilitesine neden olabilir. Cushing sendromu testiküler steroidogenez ve spermatogenezin bozulmasına neden olabilir. Konjenital adrenal hiperplazi normal GnRH ve gonadotropin salınımını bozarak ve testiküler adrenal kalıntının hipertrofinesine neden olarak subfertiliteye neden olabilir. Testiküler adrenal kalıntılar fetal geli im sırasında gonadlarla beraber migrasyona u rayan adrenal hücrelerinin embriyonik kalıntılarıdır. Tedavisiz konjenital adrenal hiperplazide sürekli artmış ACTH salınımı adrenal kalıntılarda hipertrofiye neden olur. Geni adrenal kalıntılar spermatogenezini ve sperm ta ınmasını direk (seminifer tübüle baskı nedeniyle) ve indirek (testiküler seks steroidogenezini ve spermatogenezini bozan lokal testiküler kortikosteroid üretimiyle) bozabilir [52].

## **Sperm Ta ınmasında Bozukluklar**

Sperm ta ınmasında bozukluklar; ejakülator kanal obstrüksiyonlarını ve retrograd veya anejakülasyon gibi ejakülasyon fonksiyon bozukluklarını içerir.

Ejakülator kanal obstrüksiyonunun en önemli nedenlerinden biri sıklıkla kistik fibrosisi olan hastalarda görülen konjenital bilateral vas deferens yoklu udur. Neredeyse tüm kistik fibrozisi olan hastalarda konjenital bilateral vas deferens yoklu u görülürken, bu durum CFTR gen mutasyonunun tek klinik belirtisi olabilir. Bu nedenle konjenital bilateral vas deferens yoklu u saptanan tüm hastalar CFTR gen mutasyonu açısından de erlendirilmelidir [37, 45].

Ejakülasyon fonksiyon bozuklukları sıklıkla diyabet ve di er sistemik hastalıklara ba lı nöropati durumlarında veya spinal kord lezyonu gibi santral sinir sistemi hastalıklarında görülür. Mesane boynunun nöroregülasyonunu etkileyerek, ejakülasyon sırasında kapanmasını engelleyen her türlü durumda mesaneye retrograd ejakülasyon olur ve bu durum infertiliteye sebep olabilir. laçlar, mesane boynu cerrahisi veya disotonomi retrograd ejakülasyona neden olan ana nedenlerdir. Anejakülasyon ise sıklıkla nörolojik bozukluklara ba lı olur ancak depresyon tedavisinde kullanılan serotonin geri alınımı inhibitörlerine ba lı geli ebilir [53, 54].

## **2.4. NFERT L Ç FT N DE ERLEND R LMES**

Düzenli ili kiye ra men 12 ay sonunda gebelik elde edemeyen çiftler medikal olarak de erlendirilmelidir. Kadın ya ının 35 ya ın üzerinde olması, bilinen veya üpheli erkek faktör olması, uterin/tubal /peritoneal hastalık olması, evre 3-4 endometriozis olguları veya oligomenore/amenore hikayesi olması durumunda düzenli ili ki ile 6 ay boyunca gebelik elde edilememi se erken de erlendirme gerekir [55]. nfertilite de erlendirilmesi erkek ve kadında e zamanlı yapılmalı ve ayrıntılı anamnez alınması ile ba lamalıdır. Kadında de erlendirme fizik muayene ile devam ederken erkek fizik muayenesi üroloji bölümü tarafından yapılmaktadır ve genellikle üpheli endokrin bozukluk veya spesifik nedenlere yönelik yapılır. Kadın de erlendirilmesinde tanı testleri; ovulasyonun, over rezervinin ve tüplerin ve endometriyal kavitenin de erlendirilmesini içerir. Erkek de erlendirilmesinde ilk basamak tanı testi standart semen analizidir. Semen analizi fertil – infertil erkek ayırımında yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda daha ileri sperm fonksiyon testleri, genetik ve endokrin testler yapılır [3].

## **2.4.1. KADIN INFERTİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

### **2.4.1.1. ANAMNEZ**

infertil çiftin değerlendirilmesi ayrıntılı bir anamnez ile başlamalıdır. Anamnez alınırken dikkat edilmesi gereken noktalar:

- infertilite süresi ve ilişkisi sorgulanmalıdır
- Obstetrik öykü; önceki gebelikler ve gebelik sonuçları sorgulanmalıdır.
- Jinekolojik ve cerrahi hikaye; sonraki fertilitasını olumsuz olarak etkileyebilecek geçirilmiş pelvik enfeksiyon, pelvik cerrahi sorgulanmalıdır. Geçirilmiş pelvik cerrahi veya enfeksiyonu olan hastalar tubal faktör açısından değerlendirilmelidir. Pubertal gelişim, dispareni varlığı, menstural siklus uzunluğu, mens süresi ve miktarı değerlendirilmelidir.
- Medikal öykü; fertilitate olumsuz etkileri olabilecek tiroit hastalıkları, diyabet, adrenal yetmezlik gibi kronik hastalıklar, radyoterapi ve kemoterapi öyküsü, sigara kullanımı, kullanılan ilaçlar ayrıntılı olarak sorgulanmalıdır.
- Aile hikayesi; ailede infertilite hikayesi, prematür ovaryan yetmezlik, polikistik over, tekrarlayan gebelik kayıpları, meme ve over kanseri hikayesi açısından değerlendirilmelidir[27].

### **2.4.1.2. FİZİK MUAYENE**

Tüm hastaların genel fizik muayenesi ve pelvik muayenesi yapılmalıdır.

- Boy, kilo, vücut kitle indeksi bakılması obezite, tiroit hastalıkları ve yeme bozukları açısından değerlendirilmelidir
- Nabız ve tansiyon ölçümü yapılmalıdır. Taşikardi hipertiroidi açısından yol gösterici olabilir.
- Meme muayenesi, Tanner evrelemesi, galaktore ve meme lezyonu açısından yapılmalıdır.
- Batın muayenesi ele gelen kitle ve hassasiyet değerlendirilmesi için yapılmalıdır.
- Pelvik muayene sırasında eksternal genitalya için Tanner evrelemesi yapılmalıdır. Spekulum muayenesi sırasında enfeksiyon ve vajinal veya servikal patoloji olup olmadığı değerlendirilmelidir. Bimanuel ve rektovajinal muayene ile uterusu ait patoloji

olup olmadığı, adneksiyal yer kaplayan kitle, endometriyozis açısından uterosakral nodularite de erlendirilmelidir.

- Hir utizm, akantosis nigrikans ve di er cilt bulguları incelenmelidir [27].

#### **2.4.1.3.TANI TESTLER**

Anamnez ve fizik muayeneyi takiben ilk tanısal de erlendirme a a ıdaki basamakları içermelidir.

- Ovulasyonun de erlendirilmesi
- Over rezervinin de erlendirilmesi
- Tüplerin ve endometriyal kavitenin de erlendirilmesi

Tüplerin ve endometriyal kavitenin de erlendirilmesinde sıklıkla histerosalpingografi (HSG) ve transvajinal pelvik ultrason kullanılır [3].

#### **OVULASYONUN DE ERLEND R LMES**

Ovulasyon üreme için gereklidir. Menstrual siklusun ilk yarısı olan folliküler fazında folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) olgun folikül geli imini sa larlar. Olgun foliküler oosit ve oositi çevreleyen granüloza ve teka hücrelerini içerir. Foliküllerin hipotalamus ve hipofiz üzerine olan negatif feed-back etkisi ile LH piki ve ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyonu takip eden menstrual siklusun ikinci yarısı luteal fazdır. Bu dönemde progesteron üreten korpus luteum geli ir ve olası bir gebelik için uygun progesteronlu ortamı hazırlar. Gebelik olu maması durumunda korpus luteum regrese olur. Hormon seviyesi dü er ve çekilme kanaması olu ur. Foliküler faz süresi de i iklik gösterebilirken, luteal faz tipik olarak 14 gün sürer [27].

Ovulasyonun de erlendirilmesinde tekrarlayan ultrason ile folikül sayısı ve boyutunun takibi, bazal vücut ısısı ölçümü, idrarda LH piki ölçümü ve endometriyal biyopsi ovulasyon de erlendirilmesinde kullanılabilen yöntemlerdir. Ovulasyonun de erlendirilmesinde pratikte ayrıntılı anamnez ve kanda progesteron ölçümü kullanılır.

Ovulasyonun de erlendirilmesinde menstrual hikaye çok önemlidir. Memede hassasiyet, bulantı, duygu durum de i ikli i, akne, dismenore gibi premenstrual semptomların e lik etti i düzenli menstrasyon tipik olarak ovulasyonu i aret eder [3].

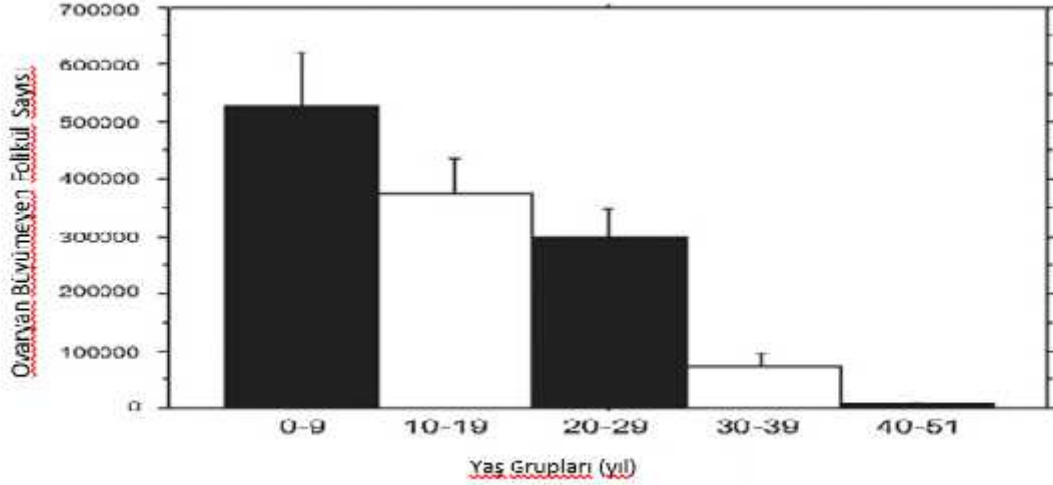


Kanda bakılan progesteron de erinin 3 ng/ml üzerinde olması ovulasyonun güvenilir kanıtıdır. Progesteronun 5 ng/ml üzerinde oldu u de erler her zaman ovulasyonun gerçekle t i ni gsterir ancak ne zaman oldu unu veya yksek de erleri ovulasyonun kalitesini gstermez. Rutinde bakılan 21. gn progesteron de eri menstrual siklus uzunlu u 28 gn olan hastalar için optimal zamanlamadır. Siklus uzunlu una ggre beklenen menstrasyondan 1 hafta nce bakılması uygundur [3, 26].

Anovulasyon saptanması durumunda, oligoovulasyon veya anovulasyonun sık nedenleri olan obezite için vucut kitle indeksi hesaplanmalı, PCOS, tiroit hastalıkları, hiperprolaktinemi, hipogonadotropik hipogonadizm ve adrenal hastalıklar için laboratuvar de erlendirilmesi yapılmaz. Kanda FSH, LH, östrodiol, prolaktin, tiroit stimle edici hormon (TSH) ve androjenler bakılmalıdır. Patoloji saptanması durumunda tedavi altta yatan nedene ynelik olarak dzenlenmelidir [3, 27].

### **OVER REZERV N N DE ERLEND R LMES**

Overlerdeki oosit sayısı intrauterin 20. haftada 6-7 milyon ile maksimum seviyesindedir. Do umda 1-2 milyon, pubertede ortalama 400 000, otuzlu ya ların ortasında 25,000, menapoz ya ı olan ellili ya larda ortalama 1000'e dger[24] . Granuloza hcreleri ile çevrili primer oositten meydana gelen ovaryan folikl, overin fonksiyonel unitesidir. Primordiyal folikl primer oositi çevreleyen tek sıra dız granuloza hcrelerinden olu ur. Ara folikl primer oositi çevreleyen bazıları dız bazıları kboidal granuloza hcrelerinden olu ur. Primer folikl ise primer oositi çevreleyen kboidal granuloza hcrelerinden olu ur [56]. Bu u folikl tipi overin dinlenmekte olan folikl havuzunu olu turur. Bazı ara tırmacılar sadece primordiyal folikl havuzunun over rezervini gsterdi ine inanırken di erleri tm folikllerin rezervi gsterdi ine inanır[57]. Havuzdaki folikller sırayla preantral, erken antral, antral ve Graffian folikl evrelerine gelirler. Bu srece folikllerin az kısmı ovulasyona giderken blyk blümü atreziye u rar [58]. Ya la beraber geride kalan folikllerin hem sayı hem de kalitesinde azalma olur [59].



**ekil 4** Farklı ya gruplarında büyümeyen folikül sayısı ortalamalarını gösteren histogram [60].

Over rezervinin değerlendirilmesinde 4 parametre önemlidir.

1. Yaş ; Yaş ile birlikte hem folikül sayısı hem de kalitesi azalmaktadır. Mayoz bölünme hatalarına bağlı anöploidi riski artmaktadır.
2. FSH ve östrodiol; Erken foliküler fazda (siklusun 2-4. günleri) bakılan FSH değerinin > 10-11 mIU/mL olması azalmış over rezervini işaret eder [61]. Östrodiol değerlerine bakılması ek bilgi sağlar. FSH normal olan hastalarda östrodiol seviyesinin yüksek olması (>60 to 80 pg/mL) ileri erken foliküler gelişimi gösterir. Azalmış over rezervinde FSH baskılanması sonucu normal görünür [26].
3. Antral folikül sayımı (AFS); erken foliküler fazda 2-10mm foliküllerin sayımı overyan rezervin ve tedaviye yanıtın öngörülmesinde önemlidir [62].
4. Anti mülleryen hormon (AMH); over rezervini göstermede bulunan en yeni belirteçtir. Geç preantral ve küçük antral foliküllerin granüloza hücrelerinden salgınır. Overin kalan folikül havuzunun göstergesidir. Siklus düzeninden bağımsız olması ve AFS'ye oranla daha objektif olması nedeniyle daha güvenilirdir [63].

## **TÜPLERİN VE ENDOMETRİYAL KAVİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tüplerin ve endometriyal kavitenin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler:

- Klamidya antikör testi (KAT), Klamidya trachomatis enfeksiyonu sonucunda oluşan immünglobulin G'lerin tespit edilmesine dayanır. KAT'ın tubal patolojilerin tespitinde duyarlılığının HSG ve laparoskopik kromotubasyona benzer olduğu na dair bazı çalışmaları mevcuttur [64]. Klinik pratikte çok tercih edilmeyen bir yöntemdir.
- HSG, tubal devamlılığın ve patolojilerin objektif değerlendirilmesinde altın standarttır. Aynı zamanda kavitenin eklini, yer kaplayan lezyon olup olmadığını gösterir. HSG için optimal zaman menstrasyonun bitimi ile ovulasyon arasındaki süredir [3]. Serviksten verilen radyopak madde sonrası flüoroskopik görüntülemeyi içerir. HSG duyarlılığı %60, özgüllüğü ise %95'tir. Tüplerin açık olduğunu gösterdiği durumlarda tüpler neredeyse her zaman açıktır. Distal tubal obstrüksiyonu gösterdiği inde tanı genellikle doğrudur [65]. Proksimal tubal obstrüksiyonlarda, sıklıkla tubal spazm veya hava-debris olması nedeniyle %3 yanlış pozitiflik oranı mevcuttur [27]. HSG asıl tanı aracı olarak kullanılırken eş zamanlı olarak verilen radyoaktif madde ile tüplerin açılmasına olanak sağlayabilir.
- Laparaskopi ile kromotubasyon, laparaskopi sırasında metilen mavisi verilerek tüplerin açıklılığının değerlendirilmesi lemidir. Laparaskopi ile tüp devamlılığını ve açıklılığını değerlendirilirken, tubal diğer patolojiler, endometriozis veya geçirilmiş cerrahilere bağlı adezyonların tanı ve tedavisi eş zamanlı gerçekleştirilebilir.
- Ultrasonografi tubal devamlılığını gösterememekle birlikte, kavitenin değerlendirilmesinde, myomların yeri ve büyüklüğü, endometriyal polip değerlendirilmesi, mülleryan anomali ve septum değerlendirilmesinde duyarlılığı çok yüksek tanı aracıdır.

## **2.4.2.ERKEK İNFERTİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Erkek faktör tek başına infertilite nedenlerinin %15-20'sini oluşturur ve infertilite çiftlerin yaklaşık yarısında etkili eden faktör olarak göze çarpar [66]. Erkek partnerin değerlendirilmesi kadın partner ile eş zamanlı olarak yapılmalıdır.

#### **2.4.2.1.ANAMNEZ**

Anamnez etyolojiye yönelik önemli bilgiler verebilmesi nedeniyle erkek infertilitesi de erlendirilmesinde çok önemlidir. Anamnez alınırken dikkat edilmesi gereken noktalar a a ıda belirtilmi tir.

- nfertilite süresi ve önceki fertilitte hikayesi, ili ki sıklı ı ve zamanlaması sorulmalıdır.
- Genital enfeksiyon, travma, kriptor idizm hikayesi, geçirilmi genitoüriner cerrahi, ereksiyon veya ejakülasyon zorlu u açısından de erlendirilmelidir.
- Sperm üretimini ve fonksiyonunun etkileyebilecek tıbbi durumlar; geçirilmi ate li hastalık, kronik hastalıklar, kullanılan ilaçlar sorgulanmalıdır.
- Sigara kullanımı, radyoterapi ve kemoterapi maruziyeti ara tırılmalıdır
- Aile hikayesi sorgulanmalıdır.

#### **2.4.2.2.F Z K MUAYENE**

Erkek partnerin fizik muayenesi üroloji bölümü tarafından yapılır. Anormal semen analizi olan, androjen eksikli i bulguları olan genitoüriner semptomları olan hastalar ürolog tarafından de erlendirilmelidir.

- Boy, kilo, vücut kitle indeksi, sekonder seks karakterleri açısından de erlendirilmelidir
- Meme muayenesi jinekomasti açısından yapılmalıdır.
- Penil geli im ve üretral açıklı ın yeri de erlendirilmelidir.
- Testis hacmi ve vas deferens varlı ı de erlendirilmelidir.
- Varikozel ve herni muayenesi yapılmalıdır [27].

#### **2.4.2.3.SEMEN ANAL Z**

Semen analizi erkek infertilitesi de erlendirilmesinde en önemli parametredir. Seminal sıvı, testis, epididimis, prostat ve seminal vezikül sekresyonlarından olu ur. Ejakulat 2 - 7 günlük cinsel perhizi takiben masturbasyon ile toplanır. Ejakulatın vücut veya oda sıcaklı ında olması ve 1 saat içerisinde de erlendirilmesi gerekir. Daha güvenilir sonuçlar açısından en az 7 gün en çok 3 ay ara ile verilmi iki sperm örne inin de erlendirilmesi önerilmektedir [2, 67].

Spermiyogram makroskopik ve mikroskopik olarak standartlara uygun şekilde değerlendirilir. Makroskopik olarak değerlendirilen parametreler: koagülasyon, likefaksiyon süresi, renk, görünüm, viskozite, hacim ve pH'dır.

**Koagülasyon:** Ejakülasyon sonrası semenin sıvı halden semisolid hale geçmesidir. Semende bulunan vezikül ve epididimal proteinler nedeniyle koagülasyon olur. Koagülasyonun olmaması durumunda seminal vezikülün veya vas deferensin yokluğundan üphelenilir [68].

**Likefaksiyon (sıvılaşma süresi):** Seminal sıvının tekrar sıvı hale geçmesidir. Prostattan sekrete edilen prostat spesifik antijen (PSA) ile veziküler proteinlerin etkileşimi ile gerçekleşir. Koagülasyon sonrası genellikle ilk 15 dakikada görülür. Ancak 60 dakikaya kadar uzayabilir. Nadiren sıvılaşma olmayabilir, mekanik veya enzimatik çözme gerekebilir. Likefaksiyon normal prostat seviyesinin göstergesi olarak kabul edilir [69].

**Viskozite:** Likefiye olan semenden bir pipet ile alınan örnek yerçekimi etkisiyle damlamaya bırakılır, pipet ile damla arasında oluşan iplikçiklerin boyu 20 mm'yi geçmemelidir, geçmesi durumunda artmış viskozite söz konusudur. 20-40mm arası hafif artmış, 40-60mm arası oldukça artmış, 60mm üstü ise çok artmış viskoziteyi gösterir. Artmış viskozite sperm hareketinde azalmaya neden olur ve yapılan bir çalışmada infertil erkeklerde artmış viskozitenin görülme sıklığı %26,6 olarak bulunmuştur. Viskozite seminal veziküllerin ve prostatın sekretuar aktivitesinin göstergesidir ve artmış viskozite vezikül ve prostat fonksiyon bozukluğunu gösterir. Fonksiyon bozukluğunun pek çok nedeni olabilmekte beraber sıklıkla enfeksiyon ve inflamasyon sorumlu tutulmaktadır [68].

**Görünüm:** Sıvılaşmadan sonra normal bir örnek homojen ve gri-opak görünümündedir. Cinsel perhiz süresi arttıkça rengi sarımsı renge dönüşür. Normal koku prostat sekresyonu ile oksidasyonu sonucu oluşur. Normal doku kokular enfeksiyon göstergesi kabul edilir.

**Hacim:** Ejakülasyon hacmi, retrograd ejakülasyon veya obstrüktif patoloji yönünden değerlendirilir. Uygun cinsel perhiz süresi sonrası normal hacim 1,5 - 6 ml'dir.

**Semen pH'sı:** Örnek iyice karıştırıldıktan sonra bir damla semen pH kağıdı üzerine konur ve 30 saniye içindeki renk değişimi kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılır. Normal pH, seminal vezikül sekresyonlarına bağlı olarak alkali özelliktedir. Normal bir örnek için alt referans değeri 7,2'dir.

## **Mikroskopik inceleme**

Makroskopik incelemeyi takiben, faz-kontrast mikroskobu ile Makler sayım kamarası kullanılarak sperm konsantrasyonu, hareket özellikleri, sperm dışı hücreler, agregasyon veya aglütinasyon varlığı açısından ilk mikroskopik değerlendirme yapılır. Morfolojik inceleme için boyama işlemi yapılmak üzere temiz bir lam üzerine ince yayma ekinde sperm yayılıp kurumaya bırakılır.

**Sperm agregasyonu:** Hareketsiz spermlerin birbirleri ile ortamdaki mukus iplikleri gibi debris materyali ile veya sperm dışı hücreler ile yapışması sonucu gözlenebilir.

**Sperm aglütinasyonu:** Hareketli spermlerin birbirine baş-baş, kuyruk-kuyruk veya karışık olarak yapılarak bir arada bulunmasıdır. Grade 1-4 olarak sınıflandırılır.

**Sperm konsantrasyonu:** Makler sayım kamarası ile sayım yapıldığında 10 tane orta boy karedeki toplam sperm sayısı milyon/ml olarak kaydedilir. Aynı sayım 4 kez 10 farklı karede tekrarlanır ve ortalaması alınır. Normal bir semende alt referans değeri  $15 \times 10^6$ /ml'dir

**Total sperm sayısı:** Tüm ejakülattaki toplam sperm sayısıdır ve alt referans değeri  $39 \times 10^6$ /ml'dir. Sperm konsantrasyonunun total hacim ile çarpımından elde edilir. İlk mikroskopik incelemede sperm hücresi görülmemesi ise tüm ejakülat 3000g ile 15 dakika santrifüj edilerek dip kısımdan (pellet) damlalar yapılarak lam-lamel arası incelenir, sperm hücresi görülürse (kriptozoospermi), toplam sayı, hareket ve belirgin bir morfolojik özellik varsa kaydedilir. Tüm pellette sperm hücresi görülmemesi ise azoospermi olarak adlandırılır.

**Sperm hareketi:** İlk 30 dakikada, oda ısısında veya 37 C derecede Faz kontrast mikroskobu ile genellikle 200 büyütmede birden fazla örnek damlası ile hareketlilik değerlendirilir. Spermler progresif hareketli, nonprogresif hareketli ve hareketsiz ekinde sınıflandırılır. Progresif hareket eden sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan başımsız olarak ilerleyici bir ekinde hareket etmektedir. Nonprogresif hareket eden sperm hücresi ilerleyici hareket etmeyip küçük dairesel veya yerinde hareket etmektedir. Sperm hücresinde hiç hareket gözlenmiyorsa hareketsiz olarak sınıflandırılır. Total hareketlilik için en düşük referans değeri %40, progresif hareket için ise %32'dir. 15 milyon/mL sperm konsantrasyonu, %40'ın üzerinde motil sperm normal kabul edilir [4].

**Sperm morfolojisi:** Sperm morfolojisi baş ve kuyruk görünümüne göre Kruger veya Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflamasına göre yapılır. Semen smear preparatı havada kuruduktan sonra sperm boyaları (Papanicolaou, Shorr ve DiffQuick) uygulanarak boyama yapılır, en az 200 sperm incelenerek baş, orta kısım-boyun, kuyruk ve normal morfolojideki spermilerin yüzdesi hesaplanır. Normal sperm morfolojisi parametreleri tablo-5'te gösterilmiştir. Normal morfolojik özelliklere sahip sperm için en düşük referans değeri %4'tür.

**Tablo 5** Normal sperm morfolojisi parametreleri [4]

Parametreler	Referans Değerler
<i>Ba</i>	
Geni lik	2.8 µm
Uzunluk	4.1 µm
Boy/En	1.5
Akrozomal bölge	Baş ın %40-70'ini kaplamalıdır
<i>Boyun ve orta parça</i>	
Geni lik	0.6 µm
Uzunluk	4.0 µm
Sitoplazmik artıklar	Normal baş alanı 1/3'ü
<i>Kuyruk</i>	
Uzunluk	45 µm
Geni lik	orta parça

**Sperm canlılığı:** Sperm hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranı %40 olduğu durumlarda sperm canlılık testleri özellikle önem kazanır. Eozin-nigrosin veya eosin-Y testinde membran bütünlüğü hasarlanmış spermeler boyayı alırlar ve boyanmış olarak gözlenirler, hipoozmotik tıme (HOS) testinde ise membran bütünlüğü olan spermeler hipoozmolar sıvıyı hücre içine alarak şişerler ve kuyrukları kıvrık izlenir. Sperm canlılığı için en az 200 sperm hücresi sayılmalıdır. Sperm canlılığı testleri en düşük referans değeri %58'dir.

**Sperm dışı hücreler:** Ejakülatta genitouriner sisteme ait epitelyum hücreleri, immatür germinal hücreler ve lökosit hücreleri de gözlenebilir. Lökosit dışında olanlara yuvarlak hücre de denir.

Normal ejakülatta yuvarlak hücre ve lökosit sayısının  $1 \times 10^6$ /ml olması gerekir, yuvarlak hücre artışı saptanırsa lökosit peroksidaz testi veya lökosit belirteçleri çalışılmalı, lökosit olup olmadıkları tanımlanmalıdır.

**Tablo 6** WHO sınıflamasına göre normal semen parametreleri [4]

Parametreler	Referans Değerler
Semen hacmi (ml)	1,5mL
pH	7,2
Konsantrasyon	15 (12-16) milyon/mL
Total sperm sayısı	39 (33-46) milyon/ejakülat
Total hareketli hareket	%40 (38-42) %32 (31-34)
Canlılık	%58 (55-63)
Normal morfoloji	%4 (3,0-4,0)
Peroksidaz pozitif lökosit	1 milyon/mL

Standart semen analizi normal değer sınırlarının dışında olan bazı semen anormallikleri aşağıdaki şekilde tanımlanır:

- Aspermi: Ejakülatın olmaması
- Hipospermi: Ejakülat hacminin  $<1$  mL olması
- Hiperspermi: Ejakülat hacminin  $>6$  mL olması
- Hematospermi: Ejakülatta kan olması
- Lökositospermi: Ejakülatta beyaz küre olması
- Azoospermi: Ejakülatta sperm olmaması
- Oligospermi:  $< 15$  milyon/mL sperm olması
- Polispermi:  $> 250$  milyon/mL sperm olması
- Asthenospermi: Hareketliliğin ve/veya ileri doğru hareketliliğinin zayıf olması
- Teratospermi: Normal morfolojide sperm sayısının az olması ( $< \%4$ )
- Nekrospermi: Supravital boyama ile tüm spermilerin ölü olması
- Globospermi: Yuvarlak başlı akrozomsuz sperm olması



Standart semen analizi parametrelerinin hiçbirisi spermin fertilizasyon kapasitesini göstermede spesifik de ildir ve standart semen analizi kesin fertil - infertil ayırımında yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle sperm fonksiyon testlerine ihtiyaç duyulmaktadır [5].

#### **2.4.2.4.SPERM FONKS YON TESTLER**

Sperm fonksiyon testleri, WHO tarafından ara tırma testleri olarak kabul edilir ve spermin fertilizasyon potansiyelini in vitro olarak öngörülmesini amaçlar [5].

#### **Bilgisayar yardımcı sperm analizi**

Bilgisayar yardımcı sperm analizi (CASA (computer assisted sperm analysis)), kapasitasyon süresince kazanılan hızlı spiral hareket paterni ve hiperaktivasyonun yanı sıra sperm konsantrasyon ve morfolojisinin objektif olarak de erlendirilebilmesini sa lar [70].

#### **Zona pellusida ba lanma testi**

Zona pellusida (ZP) fertilizasyonun kontrolünde ana rol oynar ve akrozom reaksiyonunun tek fizyolojik uyarandır. Oosit fertilizasyonu için sperm mutlaka ZP'daki türe spesifik reseptörleri tanımalı ve ba lanmalıdır. Anormal ZP ili kisi fertilizasyonun olmasının önlenmesinde ana bozukluk basama ı olabilir. 'Hemizona assay' ve 'competitive intact zona binding assay' olmak üzere sıklıkla kullanılan 2 testi mevcuttur [70]. ZP ba lanma testleri, in vitro fertilizasyon ile yüksek oranda istatistiksel olarak anlamlı olmalarına ra men klinik uygulamada intakt oosit veya oositten ayrılma zona pellusida gerektirmesi nedeniyle pek sık kullanılmamaktadır.[2]

#### **Akrozom Reaksiyonu**

Akrozom reaksiyonu egzositik bir süreçtir. ZP ya ba lanma sonucunda sperm ba ına hızlı kalsiyum akı ı veya oositi çevreleyen cumulus oophorus ve tubal/foliküler sıvıda var olan yüksek fosfor sonucu fizyolojik olarak uyarılır [71]. Spermin ba ındaki akrozomal veziküllerdeki proteolitik enzimler salınır ve spermatozoa ZP glikoproteinini geçer. Fertilizasyonun olu abilmesi için mutlaka akrozom reaksiyonunun sperm oosite yakla ınca spesifik zamanlamada olması gerekir. Çok erken veya farklı yerde gerçekleşirse, akrozom reaksiyonu olmu olan sperm fertilizasyon yetene ini kaybeder[72]. Yapılan çalı malarda normospermik subfertil erkeklerin %25'inde ZP ile uyarılma akrozom reaksiyonunda bozukluk oldu u göstermi tir [73].

Akrozom reaksiyonu testleri insan ZP'sı ile sınırlıdır çünkü di er primatların ZP'sı ba lanma spesifitesi nedeniyle kullanılamamaktadır [5] . Kalsiyum iyonoforları benzeri di er uyarıcılar ile akrozom reaksiyonu elde edilebilir ancak sonuçlar ZP ile elde edilenler ile tam olarak uyu mamaktadır. Akrozomal reaksiyonunun uyarılmasını takiben akrozomal durum mikroskop, akım sitometrisi veya i aretlenmi lektinlerin floresans görünümü ile de erlendirilir [74].

### **Hamster oosit penetrasyon testi**

Akrozom reaksiyonunun olmasını takiben sperm oosit plazma membranına ba lanmalıdır. Bu süreçte spesifik reseptörler rol oynar. Oositin kontrolünde sperm sitoplazmaya girer ve nükleusu dekondense olur ve erkek pronükleusu oluşur. Bu basamak için testler 2 ya ayan hücreyi içerd i için zordur ve sadece son basamak izlenebilir. Test zona pellusidasi soyulmuş hamster oositini spermın penetre etme yetene inin izlenmesi esasına dayanır. E er sperm penetrasyon testi ve fertilizasyon ba arılı ise en azından bir sperm gerekli tüm fonksiyonları yerine getirm i demektir [75].

### **Hipo - osmolar i me testi (HOST)**

Su geçirgenli i tüm hücre membranlarının önemli fizyolojik özelli didir. Membranlar sıvı ve moleküllerin seçici geçirgenli ine izin verir. Fertilizasyon süresince önemli fonksiyonel rol oynayan sperm membranı HOS testi ile de erlendirilebilir. Semen örne inde i en sperm sayısı ile kapasitasyonunu tamamlamı çıplak hamster oositine penetre olan sperm sayısı arasında ili ki izlenmi tir. HOS testi canlı spermatozoanın orta iddetli hipo osmotik streste canlı kalma yetene ine dayanır. Ölü spermatozoaların intakt membranı yoktur ve i emezler. HOS reaksiyonu olan hücreler i me miktarına ve kuyruk kıvrılmalarına göre A-G arasında sınıflanırlar. 200 sperm sayısına ula ılınca % olarak raporlanırlar. %60'ın üzerinde HOS reaksiyonu olan sperm normal kabul edilir. %50'nin altında kuyruk kıvrılması anormal kabul edilir. %50 ile 60 arası ara de er kabul edilir. HOS sperm canlılı ının ek göstergesi olarak ve immotil silya sendromunun tanısında kullanılabilir [70, 76].

### **Reaktif oksijen radikalleri**

Reaktif oksijen radikalleri (ROR) üretimi potansiyel patolojik etkinin göstergesi olarak dü ünülür. Spermatozoa metabolizması için O<sub>2</sub>'e ihtiyaç duyar. Ancak ROR benzeri metabolitleri hücre fonksiyonlarına zarar verebilir. Seminal plazma ROR'nden korunmak için

do al olarak antioksidanlar içerir ancak ROR'nin artması durumunda seminal oksidatif stres gelişir [77]. Daha önce yapılan çalışmada ROR üretimi ile morfolojisi bozuk sperm sayısı arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir [78].

### **Mitokondriyal aktivite testleri**

Sperm flajellar hareketi için gereken enerjiyi spermatozoanın orta bölümünde bulunan mitokondrilerde üretilen adenozin trifosfat (ATP) sağlar. Spermatozoanın kadın genital organlarındaki uzun pasaj boyunca gereken uygun miktarda ATP'yi sağlayabilecek yeterlilikte mitokondriyal aparata ihtiyacı vardır. Mitokondriyal oksido-redüktaz enzimin gösterilmesinde kullanılan nitro blue tetrazolium ve benzeri indikatörler vardır. Bu indikatörlerle hareketli, bol mitokondrili spermlerin orta kısmı belirgin boyanırken, hareketsiz ve az mitokondri aktivitesi olan spermler ya hiç boyanmaz ya da az boyanırlar. Boyanmalarına göre mitokondriyal aktiviteleri ve sperm hareketleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilmiştir [70].

### **DNA hasarı testleri**

DNA hasarı spermatogenesis sürecinde apoptozise bağlı olabilir, DNA sarmalı spermiogenesis sırasında sperm kromatinin yeniden yapılanması sırasında kırılabilir, DNA fragmentasyonu ROR'e bağlı genital traktta olabilir veya çevresel toksinler nedeniyle olabilir. Epididimiste geçirdiği süre boyunca testis sonrası hasar DNA fragmentasyonunda ana rol oynar. DNA kırılmaları gebelik gelişimi ile ilgisi olmayan önemsiz alanlarda tespit edilebilir. Hasarlı sperm yüzdesi önemlidir ancak normal DNA'sı olan bir kaç sperm gebelik gelişimi için yeterli olabilir. DNA testi endikasyonları; idiyopatik infertilite, tekrarlayan IVF başarısızlığı ve tekrarlayan düşük olmasıdır [70].

#### **✓ Nükleer kromatin dekonsansiyon testi**

DNA miktarının yarısına sahip olmasına rağmen sperm hacmi normal ökaryotik bir hücrenin 1/30'u kadardır. Hacimdeki azalma nedeniyle DNA paketlenmesi oldukça zor bir süreçtir. Fertilizasyon öncesi spermatozoanın kromatini yüksek derecede kondense halde bulunur. Uygun nükleer kromatin dekonsansiyonu ve takiben pronükleus oluşumu fertilizasyon için gereklidir. Spermatozoada kromatinin yüksek derecede kondense halde bulunmasının sebebi histonlar arasındaki S-S bağlarıdır. Bağlar arasındaki ayrılma in vitro olarak etilendiamintetraasetik asit (EDTA) veya glutatyon ile uyarılabilir. Bu şekilde uyarılan

dekondensasyon spermatozoanın iyi fertilizasyon yetene inin göstergesidir.%70'den fazla spermin nükleer dekonsasyon göstermesi normal kabul edilir [79].

✓ **DNA fragmantasyon indeksi**

'TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz mediated deoksiüridin trifosfat) assay', SCSA (sperm chromatin structure assay), 'sperm kromatin da ılımı' veya 'comet assay' ile DNA fragmantasyonu ile DNA hasarı direk olarak de erlendirilebilir. DNA fragmantasyonu olan sperm yüzdesi ile normal sperm morfolojisi ve hareketi arasında negatif ili ki gösterilmi tir. DNA fragmantasyonuna neden olabilecek etkenler; ileri erkek ya 1, genetik nedenler, çevresel toksinler, endokrin bozukluklar, alkol sigara ve diyet faktörleri olabilir.

**2.4.2.5.B YOK MYASAL TESTLER**

Seminal plazma, seminal veziküllerin ve prostat bezinin kendilerine özgü çe itli maddeler içeren sekresyonlarından meydana gelir. Sekresyonlarında bezlerin kendilerine özgü varlı nı, yoklu unu, fonksiyon bozuklu unu veya enfeksiyonunu gösteren karakteristik markerları vardır. Bu spesifik markerların sperm fonksiyonları ile ili kisi tam olarak aydınlatılamamı tır [70]. Bezlere özgü spesifik markerlar a a ıda gösterilmi tir:

- ✓ Prostat bezi: asit fosfataz, sitrik asit, çinko ve magnezyum
- ✓ Seminal veziküller: Fruktoz ve prostoglandinler
- ✓ Epididimis: L-karnitin, - glukosidaz, gliserofosfokolin

Çinko muhtemelen kromatin kondensasyonunun stabilizasyonu ve korunmasında rol oynamaktadır.

Fruktoz ise anaerobik metabolizmasında spermatozoanın enerji kayna nı olu turur. Fruktoz önemli bir enerji kayna ıdır ve seminal vezikül sekresyonunun ejakülattan çıkarılması neredeyse tamamen hareketsiz sperm ile sonuçlanır. Seminal vezikül fonksiyonun göstergesidir ve semendeki düzeyleri androjen ba ımlıdır. Semendeki fruktoz normal konsantrasyonu 63-500mg/dl'dir [70].

#### **2.4.2.6. ANT SPERM ANT KORLARI**

Servikal mukusun sperm reseptivitesi siklik de i iklik gösterir ve ovulasyon zamanı en yüksektir. Bu durum post koital testin temelini oluşturur. Ovulasyon zamanında koitus sonrası 2 saat içinde servikal mukus hareketli sperm varlığı açısından değerlendirilir. Hareketli sperm görülmesi iyi servikal mukusu gösterir. Kremer testi ile servikal mukus penetrasyonu değerlendirilir. Kadınlarda tekrarlayan sperm maruziyeti nedeniyle sperm antikoru geli ebilir. Servikal mukusta IgA tipinde, kanda ve diğer vücut sıvılarında IgG tipindedirler. Bu antikorumun tespitinde immünobead testi, miks antiglobulin reaksiyon (coomb's) testi ve Elisa testleri kullanılır. mmünobead testi ve miks antiglobulin reaksiyon testi sıklıkla tercih edilen testlerdir. Sperm antikoru subfertil erkeklerin %4-8'inde saptanır ve %50'den fazla pozitifliği belirgin subfertilite nedenidir [70].

#### **2.4.2.7. GENETİK TESTLER**

Genetik anormallikler sperm üretimi veya sperm taşımasını etkileyerek infertiliteye neden olabilirler. Azoospermi ve oligospermi genetik anomalilerle ilişkili olabilir. Erkek infertilitesi ile ilişkili genetik faktörler:

- Kistik fibrosis (KF) gen mutasyonları; vas deferensin konjenital yokluğu ile ilişkilidir. Konjenital olarak bilateral vas deferens yokluğu, hemen hemen tüm kistik fibrozis CFTR gen mutasyonu olan hastalarda bulunur. Konjenital olarak bilateral vas deferens yokluğu olan hastaların üçte ikisinde diğer KF klinik bulguları olmadan gen mutasyonu görülür. Bu nedenle bu tip hastalar CFTR gen mutasyonu açısından değerlendirilmelidir. CFTR gen mutasyonu olan erkek partnerin spermleri tedavi için kullanılmadan önce kadın partnerin genetik taraması da yapılmalıdır [37].
- Kromozomal anormallikler; bozulmuş testiküler fonksiyon ile ilişkilidir. Azoospermik erkeklerin %10-15'inde, oligospermik erkeklerin %5'inde normospermik erkeklerin %1'inden azında kromozomal anomali bulunur [80].
- Y kromozomu mikrolelesyonu, izole spermatogenik bozulma ile ilişkilidir. Azoospermi veya oligospermisi olan erkeklerin %10-15'inde Y kromozomu mikrolelesyonu bulunur [39].

Obstrüktif tip olmayan azospermik erkeklere ve oligospermik erkeklere tedavi öncesi karyotip ve Y kromozomu için genetik test mutlaka önerilmelidir. [81, 82].

#### **2.4.2.8.ENDOKRİN TESTLERİ**

İnfertil erkekte endokrin değerlendirilmesinde minimum bakılması gereken testler FSH, LH ve testosteron düzeyi ölçümüdür. Endokrin değerlendirme genellikle düşük sperm konsantrasyonunda, cinsel fonksiyon bozukluğunda veya spesifik endokrinopati durumlarında yapılır [2]. Kanda serum testosteron düzeyinin sabah saatlerinde en yüksek olması nedeniyle sabah kanında total ve serbest testosteron ölçümü yapılmalıdır. Daha güvenilir sonuçlar için normal sınırların dışındaki sonuçlar tekrarlanmalıdır. Serum testosteron düzeyi düşükken, serum FSH ve LH düzeyleri yüksekse primer hipogonadizmi, düşük veya normal ise sekonder hipogonadizmi düşündürür. Sperm sayısı ve serum LH düzeyinin düşük olduğu normal androjenize fiziksel sahip infertil erkeklerde, ekzojen steroidlerin kullanımı akla gelmelidir. Düşük serum testosteron düzeyi ve normal veya düşük serum LH düzeyi olan erkeklerde ise serum prolaktin düzeyi ölçülmelidir.

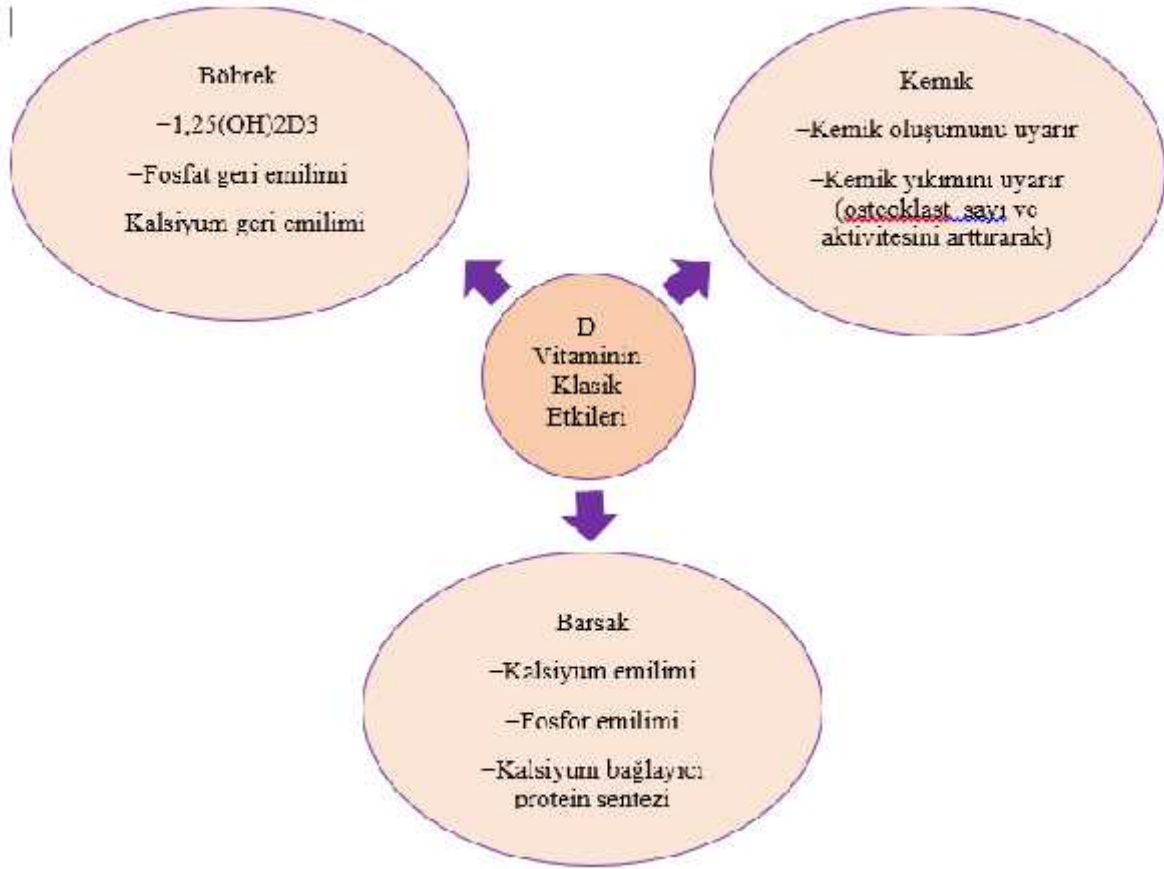
#### **2.5. D VİTAMİNİ**

##### **2.5.1. D VİTAMİNİ METABOLİZMASI**

D vitamini steroid yapılı bir hormondur. Vücuttaki total D vitamininin %80-90 ultraviyole uyarımı ile ciltte üretilir. Vitamin D prekürsörü olan 7-dehidrokolesterol ciltte bulunur ve ultraviyole ışınları uyarısı ile kolekalsiferole (D3) dönüşür. Total D vitamininin az bir kısmı ise ergokalsiferol (D2) içeren bitki ve mantarlardan veya kolekalsiferol (D3) içeren balıklardan diyet ile alınır. D vitamini kanda vitamin D taşıyıcı protein (VDBP) ile taşınır. Ciltte üretilen veya diyet ile alınan D vitamini 25 hidroksilaz enzimi ile karaciğerde 25 hidroksi vitamin D'ye metabolize edilir. 25 hidroksi vitamin D, hastanın D vitamini düzeyini ve yeterliliğini gösterir. 25 hidroksi vitamin D ise büyük oranda böbrekte 1 hidroksilaz enzimi ile aktif form olan 1,25-dihidroksi vitamin D3 formuna çevrilir. 1 hidroksilaz enzimi aynı zamanda pek çok farklı dokuda bulunur ve bu dokularda lokal olarak 25 hidroksivitamin D, 1,25 dihidroksivitamin D3'e çevrilir [7]. 1,25 ve 25 hidroksi D vitamini katabolizasyonu 24 hidroksilaz enzimi ile olur ve biyolojik olarak aktif olmayan kalsitriol asite dönüşür [6].

## 2.5.2. D VITAMİNİN KLASİK ETKİLERİ

D vitamini; iskelet sistemi, paratiroid bezi, üreme organları gibi çeşitli dokularda biyolojik etkisini D vitamini reseptörü (VDR) üzerinden gösterir. Şekil-5 ve 6'da D vitamininin çeşitli etkileri gösterilmektedir [7, 83]. VDR nükleer ve sitoplazmik membran üzerinde olmak üzere iki farklı lokalizasyonda bulunur. D vitamininin nükleer VDR'ye bağlanması sonucunda hedef gendeki promotor bölge uyarılır. Bu durum genomik yolaktaki gen transkripsiyonu düzeyinde değişikliklere neden olur ve saatler - günler sürer [6]. D vitamininin membran VDR ile bağlanması ise hücre yüzey reseptörü ve ikincil mesajcı etkileşimi sonucunda saniyeler ile dakikalar süren daha hızlı cevaba neden olur [6, 7].

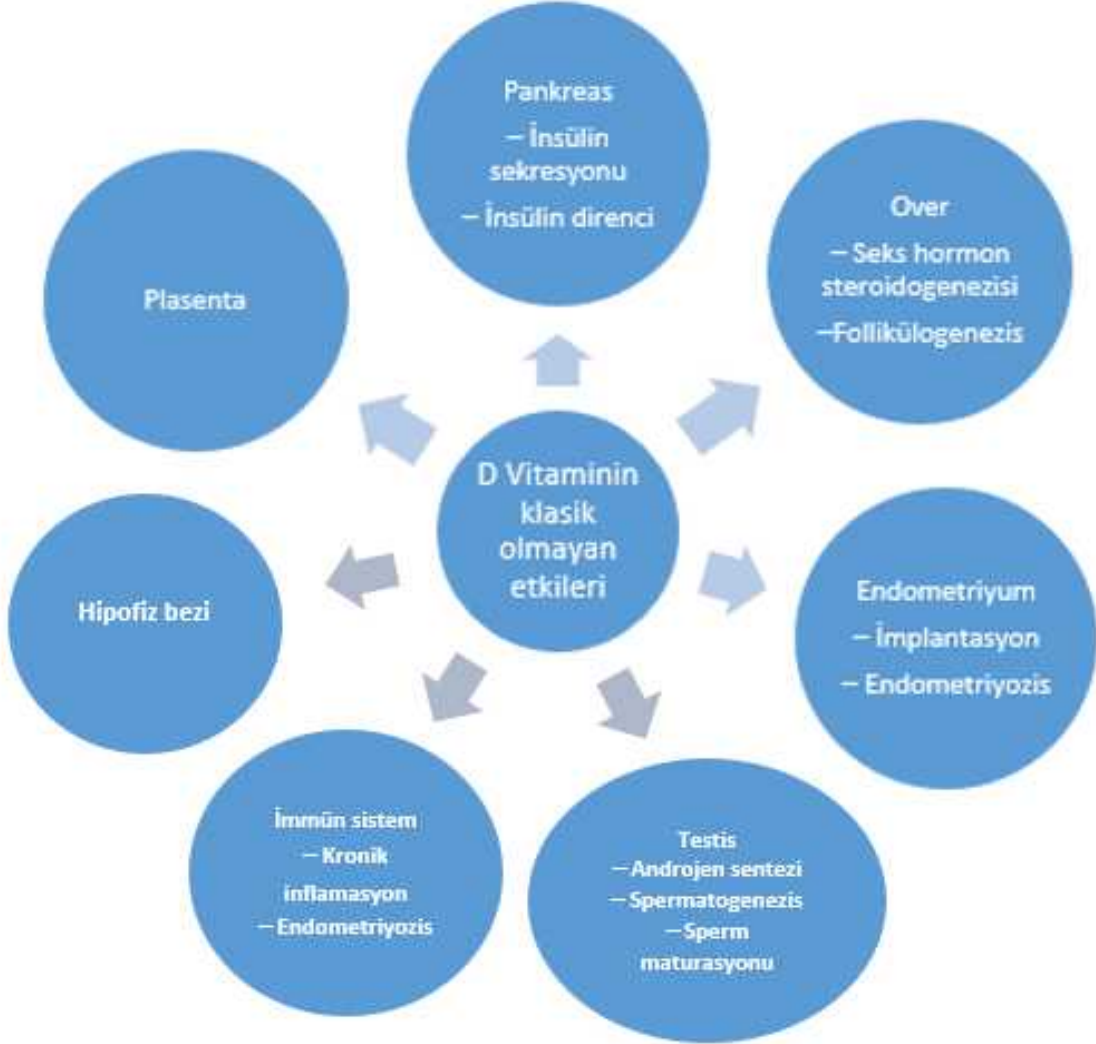


### Şekil 5 D vitamininin klasik etkileri

Kadınlarda VDR mRNA ekspresyonu overlerde, miks ovaryan hücrelerde ve safra tırlımı granüloza hücre kültürlerinde gösterilmiştir. Bu durum D vitamininin seks hormon sterogenezinde role sahip olduğunu göstermektedir [84, 85]. Ayrıca endometriyumda VDR

oldu u ve 1 hidroksilaz geninin aktif formunun endometriyal stromal hücrelerde siklustan ba ımsız olarak eksprese oldu u gösterilmi tir [85, 86].

Erkeklerde VDR ve vitamin D metabolizmasında rol alan enzimler; testiküler dokuda [87], spermin ba bölgesinde [88], spermatidlerde, epididimiste, seminal vezikülde ve prostatta [89] gösterilmi tir.



**ekil 6** D vitamininin çe itli dokular üzerindeki klasik olmayan etkileri



### 2.5.3.ERKEK ÜREME ORGANLARINDA D V TAM N N N ETK S

Vitamin D'nin erkek üreme sistemi üzerine spesifik etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalı malarda vitamin D'nin farelerde testiste spesifik genleri upregüle etti i gösterilmi tir [90]. Bu genler, hücre kolesterol düzenlenmesinde görev alan ATP ba ımlı ta ıyıcı 1 (Abca1) düzenleyicisidirler. Esas olarak Sertoli hücrelerinde eksprese olurlar ve erkek fertilitesi üzerine etkileri olabilir. Abca1 knockout farelerde testosteron seviyesi ve sperm sayısı belirin olarak dü ük bulunmu tur. Abca1'in olmaması HDL-C'yi de içeren lipit dü üklü üne neden olur. HDL-C steroidojenik dokularda kolesterol üretiminin ana kayna ıdır. Leydig hücre fonksiyonu Abca1 yoklu unda bozulur ve daha az testosteron ve daha az spermatozoa üretimine neden olur [91].

Ayrıca, Zanatta ve ark. 1,25 dihidroksi vitamin D'nin fare testisinde plazma membranında gama glutamil transpeptidaz (GGTP) aktivitesi üzerinden kalsiyum alımını ayarlayan mekanizmayı ba lattı nı göstermi tir. GGTP, Sertoli hücrelerinde spesifik proteinlerin sentezinde rol alır [92]. Akerstrom ve Walters, TM4 Sertoli hücrelerinde 1,25 dihidroksivitamin D'nin nükleer reseptör üzerinden kalsiyum alımını ve testis fonksiyonlarını etkiledi ini göstermi lerdir [93].

Yapılan hayvan çalı malarında 1,25 dihidroksivitamin D'nin üreme organlarında alloksan ile uyarılan hasara kar ı, testosteron ve 17 - estradiol seviyelerinin arttırarak oksidatif strese kar ı, hücre toksisitesine kar ı koruyucu oldu u ve spermatozoidlerin sayı ve motilitesinin devamlılı ının sa lanmasında yeri oldu u gösterilmi tir [94].

Vitamin D eksikli i olan erkek farelerde üreme yetene inin kontrol grubuna kıyasla %73 azaldı ı bulunmu tur [95]. Vitamin D eksikli i olan sıçanlarda bozulmu spermatogenez ve dejeneratif de i iklikler oldu u gösterilmi tir [96].

VDR ve 1 hidroksilaz knockout hayvanlarda yapılan çalı malar Vitamin D'nin üreme fonksiyonu üzerindeki etkisini anlamada yararlı bilgiler vermi tir. VDR knockout farelerde belirgin gonadal yetersizlik, azalmı sperm sayı ve motilitesi ve testiste histolojik anormallikler izlenmi tir. VDR knockout farelerde aromataz aktivitesi overlerde, testiste ve epididimiste sırayla normal hayvanların %24 ,%58 ve %35'i olarak bulunmu tur. Ayrıca LH ve FSH seviyelerinin yüksek olu u hipergonadotropik hipogonadizmi göstermi tir. Kalsiyum replasmanı aromataz aktivitesini arttırarak hipogonadizmi kısmen düzeltmi tir. Bu durum

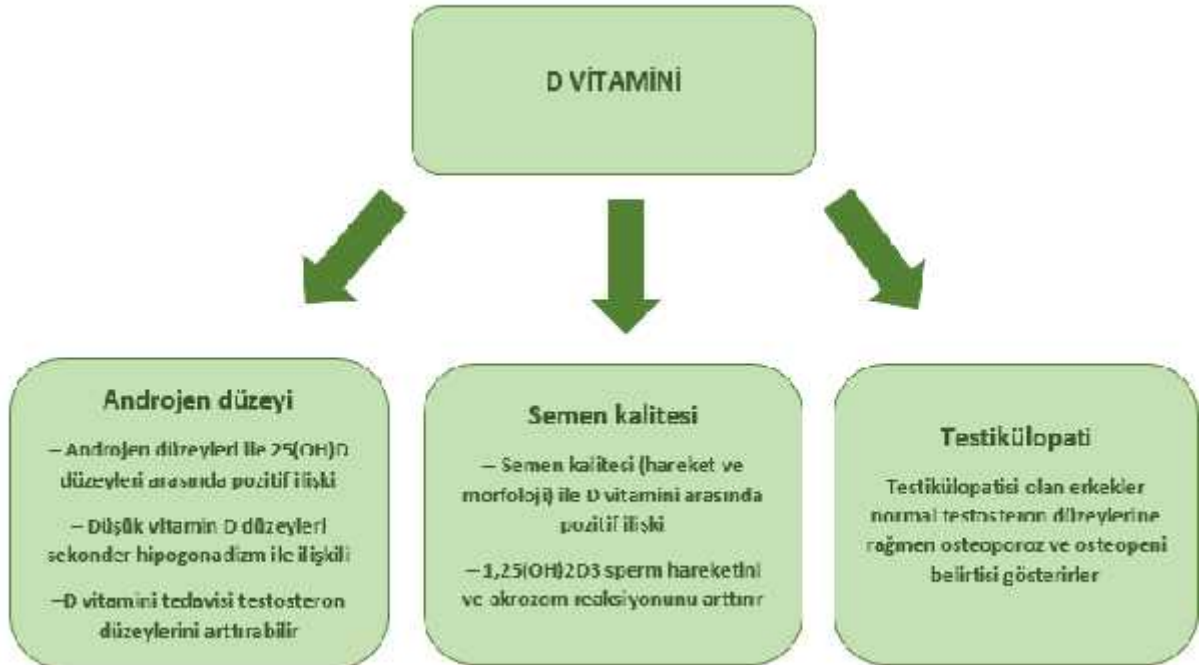
üreme fonksiyonları üzerinde sadece 1,25 dihidroksivitamin D eksikliğinin direkt etkisinin de il aynı zamanda hipokalseminin de rol oynadığını göstermektedir [97].

nsan spermini moleküler düzeyde ara tıran bir çalı mada 1,25 dihidroksivitamin D'nin kolesterol akışı, protein fosforilasyonu ve artmış sperm ömrü üzerine etkileri olduğunu gösterilmiştir. Vitamin D spermin kapasitasyonu etkileyerek ekstremiteler matürasyonunda ve sperm ömrünün düzenlenmesinde önemli rol oynar [88].

Aquila ve ark. 1,25 dihidroksivitamin D'nin VDR üzerinden hücre içi kalsiyum düzeyini, motiliteyi, akrozom aktivitesini ve fertilizasyon kapasitesini arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, 1,25 dihidroksivitamin D, VDR üzerinden lipaz aktivitesini artırarak eş zamanlı trigliseridi azaltır. Kapasitasyon için gerekli enerjiyi sağlar [10].

#### 2.6.4.ERKEKLERDE D VİTAMİNİ VE FERTİLİTE

Erkekler D vitamini düzeyi spermatogenezis, semen kalitesi ve erkek hipogonadizmi ile birlikte olan testikülopatilerle ilişkili olabilir.



**ekil 7** D vitamini eksikliği ile erkek fertilitesi arasında öne sürülen ilişkiler [9, 11, 98, 99]

## **Semen kalitesi ve Testikülopati**

Kalsiyumun erkek üremesinde, spermatogenez, sperm motilitesi, hiperaktivasyonu ve akrozom reaksiyonu için önemli oldu unu gösteren çok sayıda çalı ma mevcut olmasına ra men kalsiyum metabolizması için önemli bir düzenleyici olan D vitaminin semen kalitesi ve spermatogenez üzerine etkisi henüz tam olarak aydınlatılmı de ildir [100]. Bu konuda Blomberg Jensen ve ark. Semen kalitesi ve D vitamin düzeyi ili kisini ara tırmak için 300 erkek ile yaptıkları çalı mada kanda 25(OH)D seviyesi ile sperm hareketi arasında pozitif ili ki oldu unu göstermi lerdir. Vitamin D eksikli i olan erkeklerde (<10ng/ml) motil ve morfolojik olarak normal spermatozoa sayısının yeterli D vitamin olan (>30ng/ml) erkeklerden dü ük oldu unu göstermi lerdir. Ayrıca in vitro olarak 1,25 dihidroksivitamin D'nin sperm üzerine etkisini ara tırmı ve VDR aracılı ı ile hücre içi kalsiyum salınımına neden olarak sperm motilitesini ve akrozom reaksiyonunu arttırdı ını göstermi lerdir [11]. Bu çalı madan farklı olarak 307 erkek üzerinde semen kalitesi ve vitamin D düzeyini ara tıran ba ka bir çalı mada yüksek vitamin D düzeyi ile azalmı sperm sayısı ve sperm morfolojisi gösterilmi tir. Ancak mevsimi üreme organlarını etkileyen hastalıklar, sigara, cinsel perhiz süresi ve benzeri faktörler göz önüne alındı ında anlamlı fark gösterilememi tir [98].

Foresta ve ark., testikülopatisi (Sadece Sertoli hücresi sendromu veya ciddi hipospermatogenezis) olan 57 hasta ve 41 kontrolü içeren çalı malarında 25 hidroksilazı kodlayan CYP2R1 ekspresyonunu ara tırdılar ve 25 hidroksivitamin D düzeyi dü ük olanlarda belirgin olarak azalmı CYP2R1 ve protein ekspresyonu buldular. Ayrıca ilginç olarak testikülopatisi olan hastalar normal testosteron seviyelerine ra men kontrollere kıyasla osteopeni, osteoporozis ve bozulmu kemik mineral dansitesi gösterdiler [99].

## **Testosteron**

Dü ük D vitamini ve androjen seviyeleri erkeklerde artmı mortalite ile ili kilidir. Hem D vitamini dü üklü ü hem de androjen dü üklü ü obezite ile ili kilidir ve yapılan çalı malarda analizlerde göz önüne alınmalıdır [101, 102]. Androjen metabolizması ile D vitamini arasında kompleks ili ki mevcuttur. Androjenlerin 1 hidroksilazı arttırdı ı gösterilmi tir [103]. Aynı zamanda D vitamini metabolitlerinin gen düzeyindeki ekspresyonunun androjen seviyelerine göre modifiye oldu u gösterilmi tir [104].

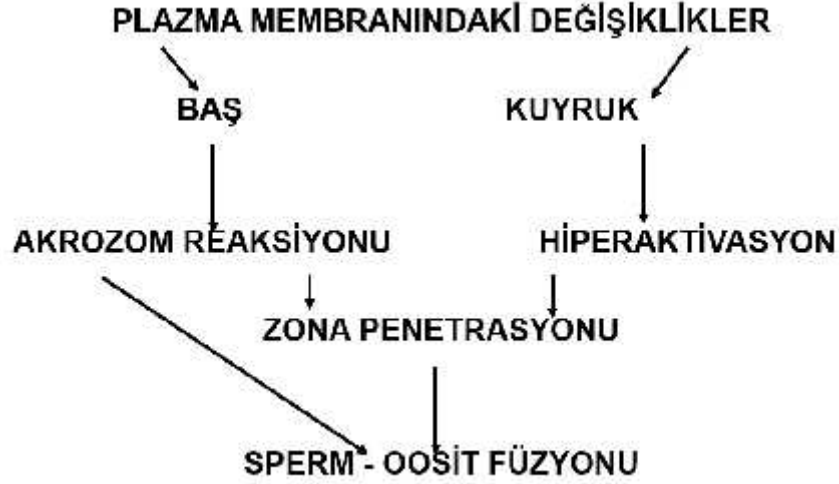
Yapılan çalı malarda D vitamini düzeyi ile sekonder hipogonadizm arasında ili ki oldu u gösterilmi tir [9]. Ayrıca D vitamini tedavisi ile testosteron düzeyinin arttı ı gösterilmi tir. 1 yıl boyunca D vitamini tedavisi alan erkeklerde bazal de erlere göre total testosteron, aktif testosteron ve serbest testosteron seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artı oldu u gösterilmi tir [105]. Erkek infertilitesinin tedavisinde D vitaminin yeri olup olmadı ına dair daha fazla çalı maya ihtiyaç vardır.

## **2.6. KALSİYUM MEKANİZMASI**

Fertilizasyonda kapasitasyonunu tamamlayan spermatozoanın, ZP'ya ba lanmasıyla akrozom reaksiyonu adı verilen süreç ba lar. Kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda kalsiyumun (Ca) önemli rolü bulunur.

Kapasitasyon sürecinde çe itli fiziksel ve biyokimyasal de i iklikler olur. Biyokimyasal de i iklikler; membran akı kanlı ında, bikarbonat ve kalsiyum iyonları geçirgenli inde artı , membran hiperpolarizasyonunu, protein kinaz aktivitesi ve protein fosforilasyonunda de i iklikleri, hücre içi bikarbonat, pH, Ca ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) konsantrasyonlarında artı ını içerir Sperm plazma membranından kolesterol salınımını, membran akı kanlı ını artırır ve Ca'a kar ı geçirgenli i artırır. Spermatozoada Ca düzenlenmesinde rol alan mekanizmalar plazma membranı, akrozom ve mitokondriden olu an hücre içi Ca depolarıdır. [106].

Spermin kadın üreme traktındaki kapasitasyonu sırasında hızlı ve yava olarak ayrılacak olaylar gerçekte ir. Ca ve bikarbonat ba ımlı adenilat siklaz ile PKA uyarılması ile hızlı olaylar ba lar. Hızlı olaylar spermin epididimisi terk etmesi ile ba layan asimetrik ve iddetli flajeller hareketidir. Yava olaylar ise hareket paterninin (hiperaktivasyon) de i mesidir. Yava olayların ba laması ise membrandan kolesterol ayrılması ve akı kanlı ın artması ile ba lar [106].



### ekil 8 Sperm kapasitasyonu

Kapasitasyon akrozomal ekzositoz için ön şarttır. Fertilizasyonda kapasitasyonunu tamamlayan spermatozoa ovumun kumulus oophorusuna penetre olur ve ZP'ya bağlanır. ZP'ya bağlanmasıyla akrozom reaksiyonu adı verilen egzositik süreç başlar [106].

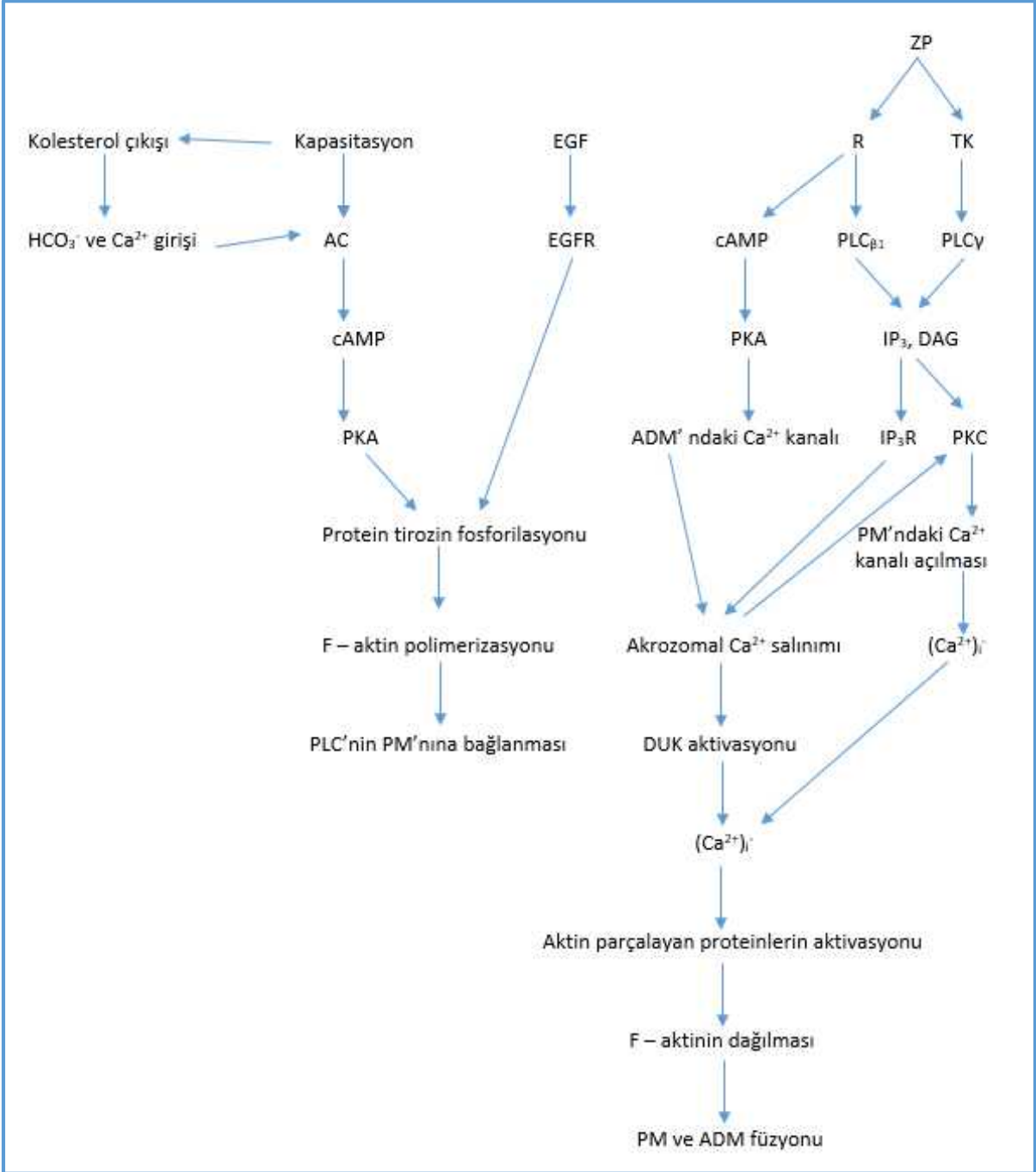
ZP, 3 glikoproteinden oluşur. ZP2 ve ZP3 kompleks olarak bulunurken, ZP1 bu kompleksleri düzenli aralıklarla birleştirir. ZP3 sperm bağlanmasından asıl sorumlu glikoproteindir, sadece akrozom reaksiyonu olan sperm ile bağlanabilir ve türe özgü bağlanmadan sorumludur. Bağlanma sperm reseptörleri ile ZP3'e bağlı oligosakkaridler arasında gerçekleşir. Bağlanma sırasında sperm başının çevresinde yer alan galaktozil transferaz enzimi ile ZP3 üzerindeki galaktoz ile etkileşir [107].

Kapasitasyonunu tamamlayan spermatozoanın zona pellusidaya bağlanması, zayıf seçici katyon kanalını uyararak membran depolarizasyonuna ve Gi - proteini bağlı hücre içi pH artışına neden olur. Bu durumu voltaj bağlı Ca kanallarının açılması ve Ca artışı takip eder [12]. Hücre içinde mitokondri dışı Ca depoları ATP bağlı Ca pompası ile Ca depolar, Thapsigargin ile bu pompanın inhibe edilmesi önce sperm başı ve sonra orta bölümünde olmak üzere hızlı Ca artışına neden olur. Kapasitasyonunu tamamlamış sperm hücrelerinde bu artış iki kat fazla olur ve akrozomal ekzositoz ile sonuçlanır [108].

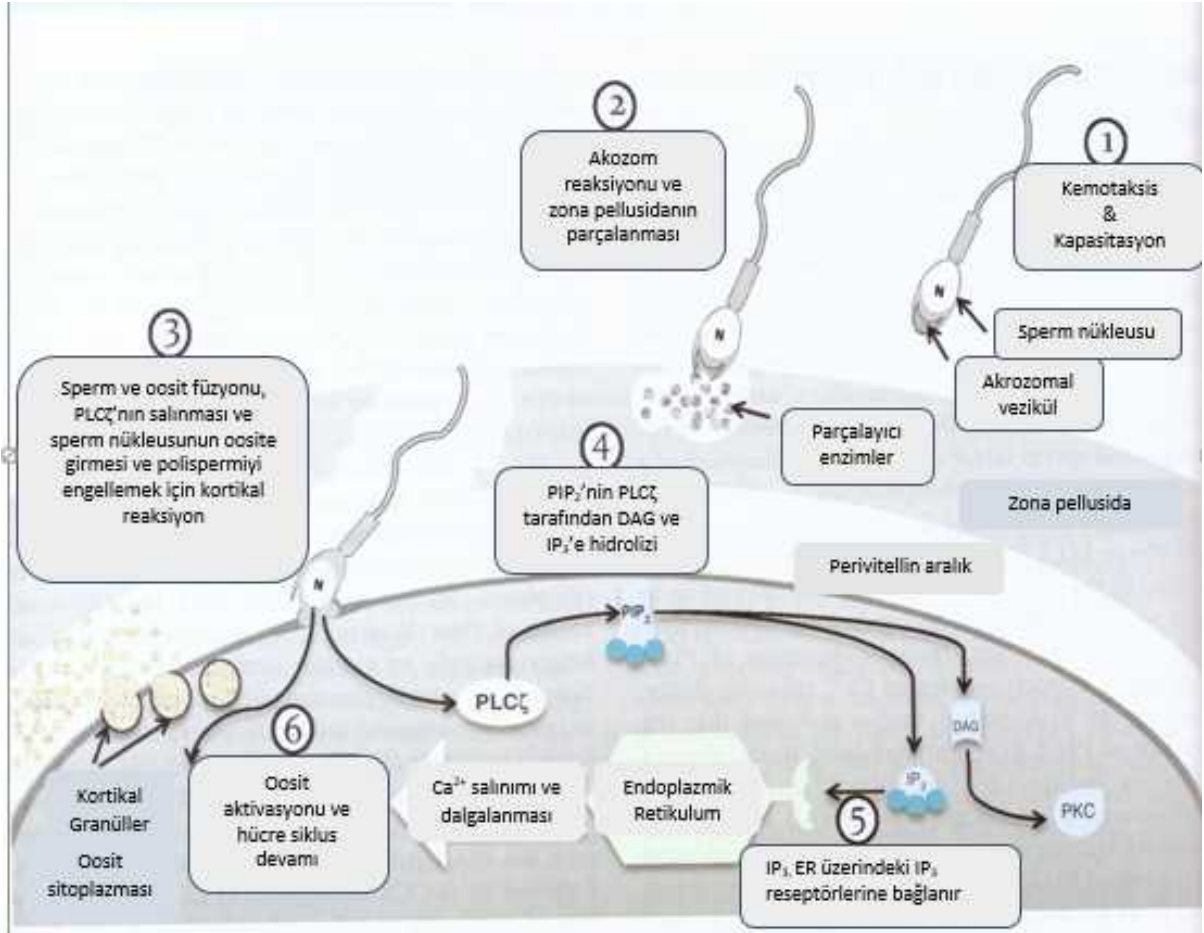
Thapsigargin, endoplazmik retikulumdaki Ca pompasının spesifik inhibitörüdür ve onun sperm üzerine etkilerinin fark edilmesi hücre içi kalsiyum depolarının olduğunu ilk bulgusudur.

Thapsigargin ile Ca artışı sonucu uyarılan akrozom reaksiyonu sadece hücre dışı Ca bulunduğunda gerçekleşir. Bu durum kapasitatif kalsiyum girişi veya depo ile uyarılan Ca girişi (DUK) olarak adlandırılır. Bu mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen hücre içi depolarda Ca azalmasına bağlı plazma membranındaki Ca kanallarının açıldığı kabul edilir [12].

Thapsigargin ile akrozomal egzozitozis uyarılabilmesi için hücre içi Ca depolarının spermin başındaki akrozomal bölge gibi yakın yerleşimi beklenir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda IP<sub>3</sub> reseptörünün akrozomda yer aldığı ve Ca depoları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [108]. Hücre içi depoları ile uyarılan Ca ile IP<sub>3</sub> reseptörü arasında ilişkinin gösterilmesi plazma membranına yakın yer alan endoplazmik retikulum olabileceğini gösterir [109]. Sperm zona pellusidaya bağlanması adenilat siklazı cAMP'ye dönüştürerek aktive eder. cAMP protein kinaz A'yı akrozom membranındaki Ca kanallarını açmak için uyarır. Sonuçta sperm sitoplazmasında Ca artar ve fosfolipaz C, IP<sub>3</sub> ve diaçilgliserol üretimi için uyarılır. Diaçilgliserol protein kinaz C'yi plazma membranındaki Ca kanallarının açılması için uyarır. IP<sub>3</sub> bağımlı Ca kanalı yolu ile daha fazla akrozomal Ca salınımına neden olur. Bu süreç akrozomda Ca azalmasına ve kapasitatif kalsiyum girişi mekanizmasını uyarılmasına neden olur (ekil 9)[12]. Sperm sitoplazmasında Ca artışı olur. Ca akrozomal membranların birleşmesiyle vesiküllerin oluşumuna sağlar. Vezikülasyon sonucu ortaya çıkan proteolitik enzimler ZP'yı parçalamaya başlar. Bu sürece kortikal reaksiyon adı verilip polispermiyi önler. Membranların birleşmesi sağlandıktan sonra oositin aktivasyonu başlar. Ca'un oosit aktivasyonunda da rolü olduğuna dair çalışmalar vardır. Füzyonu takiben sperm bol miktarda Ca<sup>+2</sup>'u direkt olarak oositin içine sunduğundan, bununla birlikte oosit aktivasyonunda Ca<sup>+2</sup> osilasyonlarının başlatıldığı düşünülür. Bu teoriye göre sperm ve oosit füzyonunu takiben, sperm zarları kanal olarak çalışıp Ca<sup>+2</sup>'u direkt olarak yumurta içine alır, böylece Ca<sup>+2</sup> aracılı Ca<sup>+2</sup> salınımını tetikler. IP<sub>3</sub>-aracılı Ca<sup>+2</sup> salınımı oosit aktivasyonu için özel bir gereksinimdir. PLC'nin oosit aktivasyonunda önemli bir tetikleyici olduğuna dair kanıtlar vardır. Kapasite olmaması spermde PLC baş kısmının orta bölgesinde yerleşir ve kapasitasyon evresinde ve akrozom reaksiyonunda korunur. Aynı zamanda yerleştiği bu bölge oosite hızlı Ca salınımı için idealdir. PLC diğer PLC'lara göre Ca'a çok duyarlıdır. Oosite IP<sub>3</sub> üretimi ve Ca salınımına sebep olur (ekil 10)[107].



**ekil 9** Sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunun olası etki mekanizması. Kapasitasyon: Sperm plasma membranından kolesterol çıkışı  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  geçirgenliğini artırır ve adenil siklaz (AC) aktivasyonuna neden olarak cAMP üretimi ve protein tirozin fosforilasyonuna yol açan PKA aktivasyonuna neden olur. Tirozin fosforilasyonu aynı zamanda EGFR yoluyla da olabilir. Yüksek fosforilasyon düzeyleri F-aktin polimerizasyonu ve fosfolipaz C'nin (PLC) plasma membranına (PM) translokasyonuna neden olur. Akrozom reaksiyonu: ZP, PM'nda en az iki farklı reseptöre (R) bağlanır. Sonucunda PKA ve  $\text{IP}_3$  akrozom dışı membranındaki (ADM)  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarını aktive eder ve DAG PM'ndaki  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarını açan PKC'yi aktive eder. Sonucunda sitozolik  $\text{Ca}^{2+}$  artar ve akrozomal  $\text{Ca}^{2+}$  azalır ve depo uyarımlı kalsiyum girişi (DUK) aktive olur ve sitozolik  $\text{Ca}^{2+}$  artışı sürdürülür. Göreceli olarak yüksek  $\text{Ca}^{2+}$  aktin parçalayan proteinleri PM ile ADM arasında yer alan F-aktinin bariyerinin dağılması için aktive eder. Bunun sonucunda 2 membran etkileşime geçer ve füzyon olur. EBF = Epidermal büyüme faktörü EBFR = Epidermal büyüme faktörü reseptörü TK = Tirozin kinaz



**ekil 10** Sperm ve oosit etkile imi

## 2.7. OKS DAT F HASAR

infertil erkeklerin büyük bir kısmında etyolojisi bilinmeyen anormal semen analizi mevcuttur [110]. Olası etyolojiler; çevresel, besinsel, tıbbi, genetik ve psikolojik nedenler olabilir [111]. Çalı malarda infertil erkeklerin %40-80'inde artmış reaktif oksijen radikalleri (ROR) seviyeleri gösterilmiştir [15]. Normal semen parametreleri olan infertil erkeklerin %11-78,5'inde artmış ROR seviyeleri bulunmuştur [18, 19].

Reaktif oksijen radikalleri; oksidatif metabolizma sonucu ortaya çıkan, stabil olmayan oksijen molekülleridir. Bu moleküller, hidroksil iyonları ve süperoksit gibi serbest radikaller ve hidrojen peroksit ve lipid peroksit gibi serbest olmayan radikallerdir [112]. Peroksinitrit, nitroksil iyonu, nitroz oksid içeren reaktif nitrogen türleri de ROR kategorisine girer [113].



Semende ROR'nin ana üretim yerleri lökositler ve immatür spermatozodur [114]. Spermatozoa'da ROR iki yolla oluşur: plazma membranında NADPH oksidaz sistemi ve mitokondriyal NADH bağımlı oksido-redüktaz sistemi [115].

Enfeksiyonlar gibi inflamatuvar hücrelerin genital organlarda toplanmasını uyaran durumlar veya varikozel gibi immatür sperm üretimine yol açan durumlar, sigara gibi çevresel faktörler aynı ROR üretimine neden olur [116]. Seminal lökositlerin, %50-60'ını polimorfonükleer lökositler ve %20-30'unu makrofajlar oluşturur [117]. Bu lökositler enfeksiyon ve inflamasyonla aktive olurlar ve aktive olmayan lökositlere göre 100 kat fazla ROR üretme kapasitesine sahip olurlar [118]. Ek olarak, düşük lökositospermi seviyelerinde bile (< 1 milyon lökosit/ml) zararlı olduğu ve tedavi edilmesinin gebelik oranlarının iyileşmesinde etkili olduğu saptandı [116].

Sigaranın artmış ROR ile ilişkili olduğu kana dair kanıtlar mevcut. Sigara içen ve içmeyen infertil erkeklerle yapılan bir çalışmada sigara içenlerde %48 fazla seminal lökosit konsantrasyonu ve %107 artmış ROR seviyeleri saptandı [119]. Aynı zamanda alkol kullanımı, radyasyon maruziyeti ve toksik kimyasallar da seminal ROR'ni artırabilir [120].

ROR, kapasitasyon, hareket, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gibi normal sperm fonksiyonları için gereklidir [14], ancak artmış ROR miktarı fizyolojik antioksidanların arasındaki dengenin bozulmasına ve oksidatif hasara neden olur [15]. Plasma membranı fazla miktarda ROR'nin hasarına en hassas makromoleküller olan çoklu doymamış yağ asidi içerir [16]. Plasma membranında oksidatif stres hasarı, sperm hareketini azaltır, DNA hasarını artırır ve oosit-sperm füzyonunu azaltır [17]. Kao ve ark. Yapmış oldukları bir çalışmada seminal sıvıda lipid peroksidasyonun göstergesi olan malondialdehit ile sperm motilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki gösterilmiştir [121].

Artmış ROR semen analizindeki tüm parametreleri etkiler. Çok sayıda çalışmada ROR'nin sperm konsantrasyonu, hareketi, morfolojisi [122] ve sperm DNA'sı hasarı ve apoptozisi [123] ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna karşın ROR ile sperm hareketi arasında ilişki olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [124]. Son yapılan çalışmalarda ROR değerlerinin infertilitede erkek faktörünü %68,8 duyarlılık ve %93,8 spesifiklik ile gösterdiği bulunmuştur. Çalışmada kadın faktör bulunmayan anormal semen analizine bağlı infertilitede yapılmıştır [122].

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Etik Kurul Onayı**

Çalı mamız, Dünya Tıp Birli i Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak düzenlenmi tir. Çalı ma protokolü 22.03.2016 tarihinde toplanan, Hacettepe Üniversitesi Giri imsel Olmayan Klinik Ara tırmalar Etik Kurulu'nun GO 16/63-43 numaralı kararınca uygun görülmü tür.

#### **3.2. Hasta Seçimi**

nfertilite ikayeti ile Eylül 2016 – Ekim 2016 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Do um Anabilim Dalı poliklini ine ba vuran ara tırma için uygun artları sa layan ve ara tırmaya katılmayı kabul eden sperm ve kan örne i verebilen 100 erkek hasta çalı maya dahil edilmi tir. Tüm katılımcılardan yazılı aydınlatılmı onam alınmı tir. Sperm fonksiyonlarını etkileyebilecek bilinen sistemik hastalı ı bulunan, bilinen kromozomal gen defekti olan, D vitamini kullananlar, BMI >30 olan ve steroid kullanımı olan hastalar çalı ma dı ı bırakılmı tir. Sperm de erlendirilesi sonucunda azospermi saptanan 13 hasta çalı ma dı ı bırakılmı tir.

#### **3.3. Çalı mada Ara tırılması Planlanan De i kenler**

Çalı mada sonuçları etkileyebilecek demografik özelliklerden; ya , BMI, sigara, alkol kullanımı, dahili hastalık, ilaç kullanımı ve infertilite süresi ba ımsız de i kenler olarak belirlenmi tir.

Rutin infertilite tetkikleri olarak kanda folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), total ve serbest testosteron ölçümlerine ek olarak kanda 25 hidroksi vitamin D düzeyi bakılan parametrelerdir.

Sperm parametreleri WHO kriterlerine göre manuel olarak ölçülmü tür, morfoloji Kruger/Strict kriterlerine göre de erlendirilmi tir.

Seminal sıvıda ise 25 hidroksi vitamin D, hücre içi kalsiyum miktarı ve malondialdehit (MDA) ölçümü yapılmı tir.

### **3.4. Sperm ve Kan Örneklerinin De erlendirilmesi**

2-6 gün koitus yasa ı sonrasında hastanede mastürbasyon ile elde edilen sperm örne i özel steril plastik bir kaptaki toplandı. Likefaksiyon için oda sıcaklığı ında 30 dakika bekledikten sonra de erlendirilmeye ba landı. Sperm örne inden sperm konsantrasyon, motilite ve progresif motilite *Makler Chamber* kullanılarak, mikroskop altında WHO kriterlerine göre de erlendirildi. Morfoloji de erlendirilmesi için örnekler lama yayıldı, *Diff-Quick* yöntemi ile boyandıktan sonra, tek kör tekni ine uygun olarak tek ki i tarafından Kruger kriterlerine göre de erlendirildi. 100 sperm sayılıp anormal olanların yüzdesi kaydedildi.

Sperm örne i verilen gün hastaların sabah açlık kanından alınan örneklerde aynı gün Hacettepe üniversitesi laboratuvarlarında FSH, LH, total testosteron ve 25 (OH) vitamin D çalı ılmı tır.

### **3.5. Seminal MDA ve D Vitamini De erlendirilmesi**

Ejakulat örneklerin sperm de erlendirilmesinden sonra kalan kısımları malondialdehit, 25(OH) vitamin D ve hücre içi kalsiyum çalı ılması için Hacettepe Üniversitesi Merkez laboratuvarında - 80 derece buzdolabında saklandı. Örneklerin tamamı toplandıktan sonra örnekler çözülerek 25(OH) vitamin D düzeyleri LC-MS/MS yöntemi ile MDA düzeyleri HPLC yöntemi ile çalı ıldı.

### **3.6. Hücre içi Kalsiyum Miktarının Ölçümü**

MDA ve 25(OH) vitamin D düzeyleri ölçümü yapıldıktan sonra kalan örneklerden Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında bulunan fluorescence plate reader cihazı ile ejakülat için uygun kalibrasyon yapıldıktan sonra hücre içi (sperm) kalsiyum ölçümü yapıldı.

### **3.7. Statistikselsel Yöntemler**

Parametrik verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren verilerde student T testi ve ikiden fazla de i kenin olduğu verilerde ANOVA testi kullanılmı tır. Non – parametrik verilerde Mann Whitney U testi ve ikiden fazla de i kenin olduğu verilerde Kruskal Wallis testi kullanılmı tır.  $p<0,05$  anlamlı kabul edilmi tır.

#### 4. BULGULAR

infertilite şikayeti ile Eylül 2016 – Ekim 2016 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran, sperm fonksiyonlarını etkileyebilecek bilinen sistemik hastalığı bulunmayan, bilinen kromozomal gen defekti olmayan, D vitamini kullanmayan, steroid kullanımı olmayan ve BMI <30 olan 100 erkek hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Katılımcılara sperm örneğinin verileceği gün çalışmaya hakkında ayrıntılı bilgi verilip yazılı onam alınmıştır. Hastaların tamamı yaşı, infertilite süresi, biyolojik çocuk varlığı, varikosel, testiküler travma ve kriptoridizm hikayesi, sistemik hastalıkları ve kullandıkları ilaçlar yönünden sorgulanmış ve verilen bilgiler kaydedilmiştir. Uygun şartlarda sperm örneği verebilen hastalardan, sabah açlık kanı alınmıştır. Alınan kan örneğinden FSH, LH, total testosteron ve 25(OH) vitamin D çalışılmıştır. Sperm örnekleri usulüne uygun olarak değerlendirildikten sonra örneğin kalan kısmı seminal 25(OH) vitamin D, hücre içi kalsiyum ve MDA çalışılmak üzere -80 derece buzdolabında saklanmıştır. Sperm değerlendirilmesi sonucunda azospermi saptanan 13 hasta çalışmaya dâhil bırakılmıştır.

##### 4.1 Hastaların Özellikleri ve Grupların Karşılaştırılması

Azospermi saptanan 13 hasta çalışmaya dâhil bırakıldıktan sonra kalan 87 hasta kanda bakılan 25(OH) vitamin D düzeylerine göre gruplandı. Hacettepe Üniversitesi laboratuvarının 25(OH) vitamin D için verdiği değeri  $1 \mu\text{gram/L}$  değerleri literatürde mevcut olan diğer çalışmalarda uyumlu olması açısından 2,5 ile çarpılarak  $\text{nmol/L}$  çevrildi. Kanda bakılan 25(OH) vitamin D düzeylerine göre hastalar, daha önceki çalışmaya verilerine göre, 25(OH) vitamin D düzeyi düşük ( $< 50\text{nmol/L}$ ), normal ( $50-75 \text{nmol/L}$ ) ve yüksek ( $> 75\text{nmol/L}$ ) olarak 3 gruba ayrıldı. 87 hastanın 25(OH) vitamin D düzeylerine göre sayı dağılımı sırasıyla 32 (% 36,8) grup 1 (düşük), 37 (% 42,5) grup 2 (normal) ve 18 (% 20,7) grup 3 (yüksek) olarak hesaplandı.

Hastaların ortalama yaşı  $32 \pm 7$  yıl, infertilite süresi  $27,1 \pm 33$  ay, FSH değeri  $4,5 \pm 3,1$  mIU/mL, LH değeri  $4,3 \pm 1,8$  mIU/mL ve total testosteron ortalama değeri  $384,8 \pm 157$  ng/dl olarak hesaplanmıştır. Yaş ve infertilite süreleri ve hormon ölçümleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Gruplar arası klinik özelliklerin ve hormon düzeylerinin dağılımı Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7** Hasta gruplarının klinik özellikleri\*

<b>25 (OH) Vitamin D Grupları</b>				
	Grup 1 ( < 50 nmol/L)	Grup 2 (50 – 75 nmol/L)	Grup 3 ( > 75 nmol/L)	
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	<i>p</i> de eri
<b>Ya</b>	29,5 (21-58)	34 (21-55)	31,5 (24-38)	0,095
<b>Infertilite süresi (ay)</b>	12 (0-84)	18 (0-144)	16 (0-132)	0,496
<b>FSH</b>	3,6 (1,4-9,5)	3,8 (0,9-10,7)	4,0 (1,1-14,6)	0,482
<b>LH</b>	3,7 (1,6-7,6)	4,2 (0,9-8,3)	4,0 (1,6-10,8)	0,573
<b>Total testosteron</b>	375 (179-1057)	316 (176-781)	415 (125-764)	0,352

\* Normal dağılım göstermedikleri için median (minimum – maksimum) olarak verilmiştir.

Sigara faktörü incelendiğinde, sigara kullanımı olan hastaların kullanım miktarı 1-2 paket olması nedeniyle sigara kullanımı var veya yok olarak sınıflandırılmıştır. Sigara kullanan hastaların gruplar arası dağılımı grup 1 %46,8, grup 2 %54,0 ve grup 3 %72,2 olarak bulunmuştur ve gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir. Hastalar varikozel durumlarına göre; varikozeli olmayanlar ve varikozel hikayesi bulunanlar olarak sınıflandırılmıştır. Varikozel hikayesi olan hastalar sırasıyla grup 1’de %46,9, grup 2’de %16,3 ve grup 3’te %33,3 olarak hesaplanmıştır. Varikozel durumu 25 (OH) vitamin D gruplarına göre incelendiğinde ise anlamlı bir fark izlenmemiştir.

#### 4.2. Hasta Grupları ile Sperm Parametrelerinin Karşılaştırılması

Hastaların ortalama sperm konsantrasyonu  $26,9 \pm 20,7$  milyon/ml, total motilite yüzdesi  $54 \pm 18$ , ileri motilite yüzdesi  $40 \pm 16$ , ileri hareketli sperm sayısı  $12,6 \pm 11,8$  milyon, normal morfoloji yüzdesi  $2,6 \pm 2,8$  olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında sperm konsantrasyonu, total motilite yüzdesi ve ileri motilite yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. 25 (OH) vitamin D grupları ile ileri hareketli sperm sayısı ( $p=0,037$ ) ve morfoloji yüzdeleri ( $p=0,049$ ) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Sperm parametrelerinin gruplar arası dağılımları Tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8** Hasta grupları ile sperm parametrelerinin karşılaştırılması\*

<b>25 (OH) Vitamin D Grupları</b>				
	Grup 1 ( < 50 nmol/L)	Grup 2 (50 – 75 nmol/L)	Grup 3 ( > 75 nmol/L)	
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	<i>p</i> değeri
<b>Sperm konsantrasyonu (milyon/ml)</b>	20,5 (0,2-71)	28 (1-82)	15,5 (0,7-52)	0,072
<b>Total motilite (%)</b>	52,5 (25-84)	56 (0-83)	51 (21-77)	0,403
<b>İleri motilite (%)</b>	39 (11-71)	45 (0-71)	36 (8-70)	0,261
<b>İleri hareketli sperm sayısı (milyon)</b>	8,5 (0,1-50)	14 (0-44)	4 (0,1-21)	<b>0,037<sup>a</sup></b>
<b>Normal morfoloji (%)</b>	2 (0-7)	3 (0-13)	1,5 (0-11)	<b>0,049<sup>b</sup></b>

\* Normal dağılım göstermedikleri için median (minimum – maksimum) olarak verilmiştir. <sup>a</sup>Grup 3, grup 2 ile karşılaştırıldı, <sup>b</sup>Grup 2, grup 1 ile karşılaştırıldı

İleri hareketli sperm sayısı ile serum D vitamini grupları arasında diğer etkileyici faktörler göz önüne alındığında anlamlı ilişkinin devam etmediğinin anlaşılabilmesi için regresyon analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda yaş, varikosel, sigara ve hücre içi kalsiyum düzeyi etkileyici faktörler olarak alındığında D vitamini düzeyi ile ileri hareketli sperm sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın devam etmediği izlenmiştir. Tüm etkenler karşılaştırıldığında ileri hareketli sperm sayısı üzerine etkili olan tek faktörün varikosel hikayesi olduğu görülmüştür (Tablo 9).

**Tablo 9** İleri hareketli sperm sayısı için regresyon analizi

<b>Etkileyen Faktörler</b>	<b>Beta katsayısı</b>	<b>Standart Hata</b>	<b><i>p</i> değeri</b>
Serum 25(OH) vitamin D düzey grupları	-0,326	1,749	0,852
Hasta yaşı	-0,188	0,184	0,310
Varikosel hikayesi	-6,043	2,993	<b>0,047*</b>
Sigara var-yok	0,063	2,665	0,981
Hücre içi kalsiyum	0,009	0,013	0,478

Normal sperm morfoloji yüzdesi ile serum D vitamini grupları arasında di er etkileyici faktörler göz önüne alındı nda anlamlı ili kinin devam edip etmedi inin anlaşılabilmesi için regresyon analizi yapılmı tır. Analiz yapılırken hasta ya ı, varikozel durumu ve sigara kullanımı etkileyici faktörler olarak alınmı tır. Analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farkın devam etti i gösterilmi tir (Tablo 10).

**Tablo 10** Normal sperm morfoloji yüzdesi için regresyon analizi

Etkileyen Faktörler	Beta katsayısı	Standart Hata	p de eri
Serum 25(OH) vitamin D düzey grupları	0,814	0,405	<b>0,048*</b>
Hasta ya ı	-0,062	0,043	0,151
Varikozel hikayesi	-1,004	0,694	0,152
Sigara var-yok	-0,512	0,616	0,408

#### 4.3.Hasta Grupları ile Seminal Sıvı Ölçümlerinin Kar ıla tırılması

Hastaların seminal sıvı örneklerinden çalı ılan hücre içi kalsiyum ortalaması  $550,9 \pm 102,1$   $\mu\text{mol/L}$ , 25 (OH) vitamin D ortalaması  $2,51 \pm 1,14$   $\mu\text{g/L}$  ve malondialdehit ortalaması  $2,66 \pm 0,93$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülmü tür. Ölçülen parametreler için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamı tır (Tablo 11).

**Tablo 11** Seminal sıvı parametrelerinin gruplar arası da ılımları\*

	25 (OH) Vitamin D Grupları			p de eri
	Grup 1 ( < 50 nmol/L)	Grup 2 (50 – 75 nmol/L)	Grup 3 ( > 75 nmol/L)	
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Seminal vitamin D ( $\mu\text{g/l}$ )	2,2 (1-5,6)	2,5 (0,9-5,6)	1,9 (1,1-5,8)	0,463
Hücre içi kalsiyum (nmol/L)	574 (191-781)	564 (261-711)	545 (407-692)	0,878
Malondialdehit ( $\mu\text{mol/L}$ )	2,9 (0,5-4,9)	2,7 (1,1-4,3)	2,8 (1,1-5,2)	0,791

\* Normal da ılım göstermedikleri için median (minimum – maksimum) olarak verilmi tir.

#### 4.4.Seminal Sıvı 25 (OH) Vitamin D De erleri ile Sperm Parametrelerinin Kar ıla tırılması

Serum ve seminal sıvı 25 (OH) vitamin D düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmamı tır. Aynı zamanda seminal 25 (OH) vitamin D düzeyi ile sperm konsantrasyonu, total motilite yüzdesi, ileri hareketli sperm motilite yüzdesi, ileri hareketli sperm sayısı ve morfoloji yüzdesi arasında da anlamlı fark saptanmamı tır (Tablo 12).

**Tablo 12** Seminal sıvı 25 (OH) vitamin D düzeyleri ile sperm parametreleri arasındaki korelasyon.

<b>Korelasyon Katsayısı</b>	<b>Rho*</b>
Serum 25(OH) vitamin D (nmol/L)	-0,074
Sperm konsantrasyonu (milyon/mL)	-0,117
Total sperm motilitesi (%)	-0,055
leri sperm motilitesi (%)	-0,030
leri hareketli sperm sayısı (milyon)	-0,110
Normal sperm morfolojisi (%)	-0,152

\* Kar ıla tırılan parametreler arasında anlamlı fark saptanmamı tır.

#### 4.5. Hücre İçi Kalsiyum De erleri ile Sperm Motilite Yüzdelerinin Kar ıla tırılması

Serum 25 (OH) vitamin D düzeyi ile seminal sıvı hücre İçi kalsiyum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmamı tır. Aynı zamanda serum 25 (OH) vitamin D düzeyi ile sperm motilite düzeyleri arasında da anlamlı korelasyon bulunmamı tır (Tablo 13).

**Tablo 13** Serum 25 (OH) vitamin D düzeyi ile hücre İçi kalsiyum düzeyi ve sperm motilite yüzdelerinin korelasyonu

<b>Korelasyon Katsayısı</b>	<b>Rho*</b>
Hücre İçi kalsiyum düzeyi (nmol/L)	-0,037
Total sperm motilitesi (%)	-0,053
leri sperm motilitesi (%)	-0,072

\* Kar ıla tırılan parametreler arasında anlamlı fark saptanmamı tır.



Seminal sıvı hücre içi kalsiyum düzeyleri ile total sperm motilite yüzdesi ve ileri hareketli sperm motilite yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır. Tablo 14’de hücre içi kalsiyum düzeyi korelasyonları verilmiştir. Seminal sıvı hücre içi kalsiyum düzeyleri ile total sperm motilite yüzdesi arasında 0,241 ve ileri sperm motilite yüzdesi arasında 0,217 istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmıştır.

**Tablo 14** Hücre içi kalsiyum düzeyi ile serum 25 (OH) vitamin D düzeyi ve sperm motilite yüzdelerinin korelasyonu

<b>Korelasyon Katsayısı</b>	<b>Rho</b>
Serum 25(OH) vitamin D (nmol/L)	-0,037
<b>Total sperm motilitesi (%)</b>	<b>0,241<sup>a</sup></b>
<b>İleri sperm motilitesi (%)</b>	<b>0,217<sup>b</sup></b>

<sup>a</sup>, p=0,024, <sup>b</sup>, p=0,043

Total sperm motilite yüzdesi ile hücre içi kalsiyum düzeyleri arasındaki anlamlı ilişkinin diğer etkileyici faktörler göz önüne alındığında devam edip etmediğinin anlaşılabilmesi için regresyon analizi yapılmıştır. Analiz yapılırken hasta yaşı, testosteron düzeyi, varikosel durumu, sigara kullanımı ve MDA etkileyici faktörler olarak alınmıştır. Analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farkın devam ettiği gösterilmiştir (Tablo 15).

**Tablo 15** Total sperm motilite yüzdesi için regresyon analizi

<b>Etkileyen Faktörler</b>	<b>Beta katsayısı</b>	<b>Standart Hata</b>	<b>p değeri</b>
Serum 25(OH) vitamin D düzey grupları	-0,259	2,581	0,920
Hasta yaşı	-0,404	0,274	0,145
Testosteron düzeyi	0,007	0,013	0,573
Varikosel hikayesi	-5,554	4,556	0,226
Sigara kullanımı var-yok	-4,531	4,050	0,267
Hücre içi kalsiyum	0,040	0,018	<b>0,035*</b>
MDA	3,170	2,031	0,122

İleri sperm motilite yüzdesi ile hücre içi kalsiyum düzeyleri arasındaki anlamlı ilişkinin diğer etkileyici faktörler göz önüne alındığında devam edip etmediğinin anlaşılabilmesi için regresyon analizi yapılmıştır. Analiz yapılırken hasta yaşı, testosteron düzeyi, varikosel durumu, sigara kullanımı ve MDA etkileyici faktörler olarak alınmıştır. Analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farkın devam ettiği gösterilmiştir (Tablo 16).

**Tablo 16** İleri sperm motilite yüzdesi için regresyon analizi

Etkileyen Faktörler	Beta katsayısı	Standart Hata	p değeri
Serum 25(OH) vitamin D düzey grupları	0,066	2,385	0,978
Hasta yaşı	-0,371	0,254	0,147
Testosteron düzeyi	0,004	0,012	0,736
Varikosel hikayesi	-7,223	4,211	0,090
Sigara kullanımı var-yok	-1,017	3,744	0,787
Hücre içi kalsiyum	0,036	0,017	<b>0,036*</b>
MDA	3,352	1,877	0,078

#### 4.6.Seminal Sıvı MDA Değerleri ile Sperm Motilitesi ve Morfolojisinin Karşılaştırılması

Serum 25 (OH) vitamin D düzeyi ile seminal sıvı MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Aynı zamanda seminal sıvı MDA düzeyleri ile total sperm motilite yüzdesi, ileri hareketli sperm motilite yüzdesi veya normal morfoloji yüzdesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Tablo 17’de seminal sıvı MDA düzeyi korelasyonları verilmiştir.

**Tablo 17** MDA değerleri ile serum vitamin D düzeyi ve sperm yüzdelerinin karşılaştırılması

Korelasyon Katsayısı	Rho*
Serum 25(OH) vitamin D (nmol/L)	-0,008
Total sperm motilitesi (%)	0,070
İleri sperm motilitesi (%)	0,099
Normal sperm morfoloji (%)	-0,010

\* Karşılaştırılan parametreler arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

## 5. TARTI MA

Çalı mamız bildi imiz kadarıyla seminal sıvı D vitamini, hücre içi kalsiyum düzeyi ve MDA ile serum D vitamini düzeyi ve sperm parametrelerini kar ıla tıran ilk çalı madır. Çalı mamızın sonucunda serum D vitamini düzeyleri ile normal sperm morfolojisi arasında pozitif yönlü anlamlı ili ki saptanmı tır. Serum D vitamini düzeyleri ile seminal sıvı D vitamini, hücre içi kalsiyum ve MDA arasında anlamlı ili ki bulunmamı tır. Hücre içi kalsiyum düzeyleri ile total ve ileri sperm motilitesi arasında anlamlı pozitif yönlü ili ki saptanmı tır.

nfertilite üreme ça ındaki çiftlerin %15'ini etkileyen önemli bir sa lık problemidir.[1]. Erkek infertilitesi tek ba ına infertilite nedenlerinin %25'ini olu tururken, infertilite nedenlerinin %50'si kombine kadın ve erkek faktöründen olu ur [2]. Erkek infertilitesi ile vitamin D düzeyi arasında ili ki olabilece ine dair kanıtlar mevcuttur. Erkek infertilitesi üzerine yapılan çalı malarda dü ük D vitamini düzeyi ile androjen dü üklü ü, sekonder hipogonadizm, sperm parametrelerinde bozulma arasında ili ki oldu una dair yayınlar vardır [9]. Aynı zamanda D vitamininin, sperm hareketini, akrozom reaksiyonunu ve fertilizasyon kapasitesini arttırdı ı gösterilmi tir [10]. D vitamininin erkek fertilitesi üzerine olan etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamı olmasına ra men çe itli çalı malarda olası mekanizmalar üzerinde durulmaktadır. Çalı mamızda serumda ve seminal sıvıda bakılan D vitamini düzeylerinin erkek fertilitesi üzerine olan etkileri sperm parametreleri bakılarak ara tırılmı tır.

Erkek infertilitesi de erlendirilmesinde ilk ve en önemli test semen analizidir. Standart semen analizinde bakılan parametreler: likefaksiyon süresi, viskozitesi, semen hacmi, pH'sı, sperm agglütinasyonu, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, toplam hareketli ve ileri hareketli sperm yüzdesi, normal morfoloji yüzdesi ve sperm dı ı hücre varlı ı/miktardır [4]. Standart semen analizi parametrelerinin hiçbiri spermin fertilizasyon kapasitesini göstermede spesifik de ildir ve standart semen analizi kesin fertil - infertil ayırımında yetersiz kalabilmektedir. Ancak bu parametrelerden konsantrasyon, hareket ve morfoloji; fertil – subfertil ayırımında sıklıkla kullanılan ve fertilizasyon potansiyelini göstermede daha duyarlı kabul edilen parametrelerdir [5]. Total hareketlilik için en dü ük referans de er %40, progresif hareket için ise %32'dir. 15 milyon/mL sperm konsantrasyonu, %40'ın üzerinde motil sperm normal kabul edilir [4].

Sperm parametrelerini etkileyebilecek çok sayıda faktör bulunmaktadır. Yaş, hormonal faktörler, genetik hastalıklar, belirli sistemik hastalıklar, ilaçlar, BMI, sigara –alkol kullanımı testiküler travma, kriptoridizm, varikozel durumu ve obstrüktif nedenler sperm parametrelerini etkileyebilecek faktörlerin en önemlileridir [25]. Çalışmamızda sonuçların doğrusu açısından tüm bu parametreler sorgulanmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 100 hastadan sperm değerlendirilmesi sonucu azospermi saptanan 13 hasta D vitamini etkisini saptamada karıtıcı parametre olması nedeniyle çalışmamızı bırakılmıştır. Çalışmaya 87 hasta üzerinden yapılmıştır.

Erkeklerde yaşla birlikte fertilité azalması kadınlardaki kadar belirgin değildir. 35 yaşından itibaren erkek fertilitésinde azalma görülmektedir. Ancak belirgin azalma görülen yaş 50'li yaşlardır [23]. Artan erkek yaşlı semen volümünde, sperm motilitesinde ve sperm morfolojisinde azalma ilişkili bulunmuştur, sperm konsantrasyonunda azalma ilişkili bulunmamıştır [125]. Bizim çalışmamızda ortalama erkek yaş  $32 \pm 7$  olarak hesaplanmıştır. Sperm parametreleri sonuçlarını etkileyebilecek olması nedeniyle çalışmamız grupları arasında yaş dağılımı değerlendirilmiştir. Çalışmamız grupları arasında yaş dağılımının benzer olması nedeniyle D vitamini düzeyi ile yaş arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ( $p=0,095$ ).

Erkeklerde normal spermatogenezis için doğrudan bir hipotalamus hipofiz gonad aksına gerek vardır. İnfertil erkekte endokrin değerlendirilmede bakılması gereken testler FSH, LH ve testosteron düzeyi ölçümüdür. Serum testosteron düzeyi düşükken, serum FSH ve LH düzeyleri yüksekse primer hipogonadizmi, düşük veya normal ise sekonder hipogonadizmi düşündürür. Kanda serum testosteron düzeyinin sabah saatlerinde en yüksek olması nedeniyle sabah kanında testosteron ölçümü yapılmalıdır [2]. Çalışmamıza katılan tüm hastaların sabah kanından FSH, LH ve total testosteron düzeyi ölçümü yapılmıştır. FSH düzeyi tüm hasta grubunda normal aralıktayken ortalaması  $4,5 \pm 3,1$  mIU/mL, LH düzeyi ortalaması  $4,3 \pm 1,8$  mIU/mL ve total testosteron ortalaması  $384,8 \pm 157$  ng/dl olarak bulunmuştur. Sperm parametresi sonuçlarını etkileyebilecek olmaları nedeniyle çalışmamız grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı değerlendirilmiştir. FSH ( $p=0,482$ ), LH ( $p=0,573$ ), total testosteron ( $p=0,352$ ) olmak üzere gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığı gösterilmiştir.

Pek çok genetik neden erkek infertilitesine neden olabilmektedir. Erkek infertilitesinin en sık genetik nedeni Klinefelter's Sendromudur. Azospermisi veya düşük sperm konsantrasyonu

olan infertil erkeklerin %10-15'ini oluşturmaktadır. [37, 38]. Erkek infertilitesinin 2. en sık genetik nedeni Y kromozomu mikrodelsiyonlarıdır. AZFa veya AZFb bölgeleri komplet delesiyonları tipik olarak azoospermiye neden olmaktadır. AZFc gen bölgesi mutasyonları oligospermiden azoospermiye kadar değişen şekilde infertiliteye neden olabilmektedir. [39]. Androjen duyarsızlığı sendromu ve 5 $\alpha$ -redüktaz eksikliği infertiliteye neden olabilen diğer genetik hastalıklardır. [41, 44]. Bir diğer infertilite nedeni olan ejakülator kanal obstrüksiyonunun en önemli nedenlerinden biri sıklıkla kistik fibrosis (CFTR gen mutasyonu) olan hastalarda görülen konjenital bilateral vas deferens yokluğudur [37, 45] Aynı zamanda Prader-Labhart-Willi sendromu, Laurence-Moon-Biedl – Bardet sendromu, Leopard sendromu, Carpenter sendromu, Rud sendromu, Loewe Sendromu ve Familial Serebellar Ataxia sendromu gibi erkek infertilitesine neden olabilen pek çok genetik sendrom bulunmaktadır. Genetik nedenlerin sperm parametrelerini olumsuz etkileyebilecek olması nedeniyle çalınmaya katılacak olan hastalar genetik hastalıklar yönünden sorgulanmalı ve bilinen genetik hastalığı olan hastalar çalınmaya alınmamalıdır.

Klinik olarak belirgin hipotiroidi ve hipertiroidi normal spermatogenezini bozarak erkek subfertilitesine neden olabilir [51]. Konjenital adrenal hiperplazi, Cushing sendromu gibi adrenal hastalıkları testiküler steroidogenez ve spermatogenezin bozulmasına ve erkek subfertilitesine neden olabilir [52]. Ejakülasyon fonksiyon bozuklukları sıklıkla diyabet ve diğer sistemik hastalıklara bağlı nöropati durumlarında veya spinal kord lezyonu gibi santral sinir sistemi hastalıklarında görülür. Mesane boynunun nöroregülasyonunu etkileyen her türlü neden infertiliteye sebep olabilir. İlaçlar, mesane boynu cerrahisi veya disotonomi ana nedenlerdir. Anejakülasyon ise sıklıkla nörolojik bozukluklara bağlı olarak ancak depresyon tedavisinde kullanılan serotonin geri alımı inhibitörlerine bağlı gelişebilir [53, 54]. Bu nedenle çalınmaya sonuçlarının olumsuz yönde etkilenmemesi için çalınmaya katılacak olan hastalar tiroit hastalıkları, adrenal hastalıkları, diyabet, nörolojik hastalıklar ve kullandıkları ilaçlar yönünden sorgulanmalı ve mevcut hastalığı bulunan veya ilaç kullanımı olan hastalar çalınmaya alınmamalıdır.

infertilite ile ilişkili olabilecek bir diğer faktör ise BMI yükseklidir. Çalınmalardaki verilerin çoğu obezitedeki primer hipogonadizm mekanizmasının LH ve FSH'nin baskılanması nedeniyle olduğunu göstermektedir. Obezite ile uyarılan hipogonadotropik hipogonadizm ve subfertilite

testosteronun periferik dokularda östrodiol aromatisasyonuna ba lı olabilir. [35]. Aynı zamanda yapılan çalı malarda androjen dü üklü ü ile obezite arasında ili ki bulundu u gösterilmi tir [101, 102]. Çalı maya katılan tüm hastaların vücut kütle endeksleri hesaplanıp BMI >30 olan hastalar sperm sonuçlarının olumsuz etkilenmesini önlemek amaçlı çalı ma dı ı bırakılmı tir. Çalı maya katılan hastaların BMI aralı ı 23-27 olarak hesaplanmı tir.

Düzenli alkol kullanımı, radyasyon maruziyeti sigara ve toksik kimyasallar ve seminal oksidatif hasarı; ROR'ni arttırabilir [120].Sigaranın artımı ROR ile ili kili oldu una dair kanıtlar vardır. Sigara içen ve içmeyen infertil erkeklerle yapılan bir çalı mada sigara içenlerde %48 fazla seminal lökosit konsantrasyonu ve %107 artımı ROR seviyeleri saptanmı [119]. Nedeni açıklanamayan anormal semen analizi olan infertil erkeklerin %40 -80'inde artımı reaktif oksijen radikalleri oldu u gösterilmi tir [15]. Daha önce yapılan çalı mada ROR üretimi ile morfolojisi bozuk sperm sayısı arasında pozitif ili ki oldu u gösterilmi tir [78]. Sigara içen erkeklerde sperm dansitesinde ve motilitesinde azalma, morfolojideki anormalliklerde ise artı görülür. Sperm konsantrasyonunda azalma yakla ık %22 kadardır ve içilen sigara miktarı ile de i mektedir [126]. Sperm parametrelerini etkileyen nedenler olmaları nedeniyle çalı maya katılan hastalarda düzenli alkol tüketimi ve sigara kullanımı sorgulanmı tir. Düzenli alkol tüketimi olan hastalar çalı ma dı ı bırakılmı tir. Sigara kullanımı açısından hastalar incelendi inde ise kullanımı olan tüm hastaların 20-40 adet/gün sigara içti i görülmü tür. Hastaların sigara kullanımı olan ve olmayan olarak çalı ma grupları arasındaki da ılımı göz önüne alındı nda ise çalı ma sonuçlarını etkileyebilecek gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamı tir (p=0,220).

Testiküler travma, torsiyon, kriptomidizme ba lı artımı testiküler ısı veya varikosel azalmı spermatogenesis ile ili kili olabilir. Geni varikoseller, testiküler ısı yoluyla veya intratestiküler ROR artı ı nedeniyle spermatogeneziste bozulmaya neden olabilir. Varikoselin infertiliteyle ili kili oldu una dair çeli kili bulgular mevcuttur Çeli kili bulgular olmasına ra men dü ük sperm konsantrasyonu olan subfertil erkeklerde geni varikoseller için varikoselektomi önerilmektedir [45, 46]. Yapılan bir çalı mada varikoseli olan erkekler ile olmayanlar kar ıla tırıldı nda, normal sperm morfolojisinde ve ileri hareketli sperm sayısında belirgin dü üklük izlenmi tir [127]. Varikoseli olan hastaların sperm konsantrasyonunda, motilitesinde ve morfolojisinde dü üklük oldu u ve bu sperm parametrelerinin varikoselektomi sonrası

anlamli iyile me gösterdi i gösterilmi tir. Ancak varikoselektomi sonrası erkek fertilitesinde geli me oldu u gösterilememi tir [128]. Torsiyon ve travma hikayesi bulunan hastalar çalı maya dahil edilmemi tir. Çalı maya dahil olan hastaların varikozel durumu ayrıntılı olarak sorgulanmı ve hastalar varikozeli olmayan (65 hasta) ve varikozel hikayesi olan (22 hasta) olarak gruplanmı tir. Çalı ma grupları sperm parametrelerini etkileyebilecek önemli bir etken olması nedeniyle varikozel durumlarına göre kar ıla tırlmı tir. Gruplar arası sperm parametrelerini etkileyebilecek istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamı tir ( $p=0,240$ ).

D vitamini vücutta özellikle kalsiyum ve fosfat metabolizmasında rol oynayan, iskelet sistemi, paratiroid bezi, deri, immün sistem, üreme organları gibi çe itli dokularda etkisini gösteren steroid türevi bir hormondur [6]. Total D vitaminin %80-90'ı ultraviyole ı ınları uyarısı ile ciltte üretilir. Az bir kısmı ise diyet ile besinlerden alınır. Üretilen D vitamini, karaci erde 25 (OH) vitamin D'ye metabolize edilir. Daha sonra böbrekte aktif form olan 1,25 dihidroksi vitamin D'ye dönü ür [7]. D vitamini dokulardaki biyolojik etkisini D vitamini reseptörü (VDR) üzerinden gösterir. Kadın ve erkek üreme organlarında VDR ekspresyonu oldu u gösterilmi tir. [8].

Vücutta D vitamini düzeyini ve yeterlili ini gösteren 25 (OH) vitamin D düzeyidir. Serum 25 (OH) vitamin D düzeylerine göre  $< 50$  nmol/L dü ük,  $50-75$  nmol/L normal ve  $> 75$ nmol/L yüksek olarak sınıflanır [11]. Çalı mamamızda çalı ma gruplarını belirlerken literatürde sıkça kullanılan bu düzeyler temel alınmı tir. Hastaların ortalama 25 (OH) vitamin D düzeyi  $58,2 \pm 22,3$  olarak bulunmu tur. 87 hastanın 25 (OH) vitamin D düzeylerine göre sayı da ılımı sırasıyla 32 (% 36,8) grup 1  $< 50$  nmol/L (dü ük), 37 (% 42,5) grup 2  $50-75$  nmol/L normal (normal) ve 18 (% 20,7) grup 3  $> 75$ nmol/L (yüksek) olarak hesaplanmı tir.

Son yıllarda, D vitamini eksikli i ve yetersizli inin; kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozis, sistemik skleroz, tip 1 diyabet, inflamatuvar barsak hastalıklarının dahil oldu u bir çok kronik hastalıklarla ili ki içinde oldu u bulunmu tur. Kortikosteroidler kalsiyum emilimini ve D vitamini metabolizmasını bozarak D vitamini eksikli ine neden olabilirler [129]. Hem D vitamini dü üklü ü hem de androjen dü üklü ü obezite ile ili kilidir [101, 102].D vitamini düzeyi mevsimsel farklılık göstermektedir. En yüksek 25 (OH) vitamin D düzeyi yaz ve sonbahar mevsiminde gözlenmektedir [83]. D vitamini düzeyini etkileyebilecek olan bu faktörler göz önüne alınarak

çalı maya katılacak tüm hastalar bu hastalıklar, BMI ve steroid kullanımı açısından sorgulandılar. BMI >30 olanlar, bu hastalıkları olanlar veya steroid kullanımı olan hastalar çalı maya dahil edilmediler. Tüm hastalar eylül – ekim arasında toplanarak hastalar arası mevsimsel D vitamini düzeyi de i ikli i etkileyici bir faktör olmaktan çıkarıldı.

Literatürde bildi imiz kadarıyla seminal sıvıda D vitamini düzeyini gösteren herhangi bir çalı ma bulunmamaktadır. Ancak serum 25(OH) vitamin D düzeyi ile erkek infertilitesini ve sperm parametrelerini kar ıla tıran çok sayıda çalı ma bulunmaktadır. Avrupa’da yapılan çok merkezli 40 – 79 ya aralı nda 3369 hasta ile yapılan çalı mada D vitamini düzeyleri ile serum testosteron düzeyleri arasında pozitif korelasyon oldu u gösterilmi tir. Dü ük testosteron seviyesi olan hastalarda ve hipogonadotropik hipogonadizmi olan hastalarda 25(OH) vitamin D düzeyi anlamlı olarak dü ük bulunmu tur [9]. Yine Avrupa’da yapılan rutin kardiyovasküler anjiyo olan 2299 hastayı içeren bir çalı mada D vitamini ile testosteron düzeyi arasındaki ili ki incelenmi tir. Hastaların ortalama ya ı  $62 \pm 11$  olarak hesaplanmı ve D vitamini düzeyleri ile testosteron düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmı tur [101]. Bu çalı mada serum D vitamini düzeyleri ile seminal sıvı D vitamini düzeyleri kar ıla tırılmı ve aralarında anlamlı bir ili ki olmadı ı gösterilmi tir ( $p=0,463$ ). Serumda veya seminal sıvıda bakılan D vitamini düzeyleri ile total testosteron düzeyleri arasında yine anlamlı bir ili ki gösterilememi tir ( $p=0,567$ ,  $p=0,712$ ). Literatür ile uyumlu olmayan bu sonuçların olası nedenleri çalı mamıza katılan hastaların ya ortalamasının literatüre göre daha dü ük olması, mevsimsel de i iklikler, ırk, çalı manın yapıldı ı yerin ekvatora yakınlık durumu veya hasta sayımızın kısıtlılı ı olabilir.

Blomberg Jensen ve ark. semen kalitesi ve D vitamin düzeyi ili kisini ara tırmak için 300 erkek ile yaptıkları çalı mada kanda 25(OH)D seviyesi ile sperm motilitesi arasında pozitif ili ki oldu unu göstermi lerdir. Vitamin D eksikli i olan erkeklerde motil ve morfolojik olarak normal spermatozoa sayısının normal D vitamini düzeyi saptanan erkeklere göre dü ük oldu unu göstermi lerdir [11]. Bu çalı madan farklı olarak ya ları 18-21 arasında de i en 307 erkek üzerinde vitamin D düzeyini ara tıran ba ka bir çalı mada yüksek vitamin D düzeyi ile azalmı sperm sayısı ve sperm morfolojisi gösterilmi tir. Ancak mevsim, sistemik hastalıklar, sigara, cinsel perhiz süresi ve benzeri faktörler göz önüne alındı nda anlamlı fark gösterilememi tir [98]. Çalı mamızda serum D vitamini düzeyi grupları ile sperm parametreleri kar ıla tırıldı nda sperm konsantrasyonu ( $p=0,072$ ), total sperm motilitesi ( $p=0,403$ ) ve ileri



hareketli sperm motilitesi ( $p=0,261$ ) arasında anlamlı ili ki izlenmemi tir. Normal morfoloji yüzdesi ( $p=0,049$ ) ve ileri hareketli sperm sayısında ( $p=0,037$ ) ise gruplar arası anlamlı fark saptanmı tir. Di er etkileyici faktörler göz önüne alınarak yapılan analizler sonucunda ise D vitamin düzeyleri ile ileri hareketli sperm sayısı arasında anlamlı fark bulunamazken ( $p=0,852$ ), normal morfoloji yüzdesi ile arasındaki anlamlı ili kinin devam etti i görülmü tür ( $p=0,048$ ). Sonuçlar literatür sonuçları ile kıyaslandı nda morfoloji sonuçları literatür ile uyumlu iken motilite sonuçlarında uyumsuzluk mevcuttur. Motilite sonuçlarında gruplar arasında fark gösterilememesinin olası nedenleri sperm de erlendirilmesinin otomatize CASA yöntemi ile de il manuel yöntemle tek-kör olarak yapılmı olması veya hasta sayısının az olu u olabilir. Seminal sıvıda vitamin D düzeyi ile sperm parametreleri kar ıla tırıldı nda ise sperm konsantrasyonu ( $p=0,268$ ), total sperm motilitesi ( $p=0,426$ ), ileri hareketli sperm motilitesi ( $p=0,272$ ), ileri hareketli sperm sayısı ( $p=0,495$ ) ve normal morfoloji yüzdesi ( $p=0,795$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı ili ki gösterilememi tir.

D vitaminin erkek fertilitesi üzerine olan etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamı olmasına ra men çe itli çalı malarda olası mekanizmalar üzerinde durulmaktadır. Bu çalı mada D vitamini olası etki mekanizmalarından en çok üzerinde durulan 2 tanesi ara tırılmı tir. İlk olarak D vitamini düzeyi ile hücre içi kalsiyum artı ı ve sperm motilitesi arasındaki ili ki ara tırılmı tir. İkinci olarak D vitamini düzeyi ile ROR olu umu ve sperm morfoloji ve motilitesi arasındaki ili ki ara tırılmı tir.

in vitro olarak yapılan bir çalı mada D vitaminin sperm üzerine etkisinin VDR üzerinden hücre içi kalsiyum miktarının artı na ba lı olabilece i gösterilmi tir [11]. Sperminin zona pellusidaya ba lanmasını takiben hücre depolarizasyonu ve voltaj ba ımlı kalsiyum kanallarının açılması gerçekleşir. E zamanlı olarak hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salınımı gerçekleşir. Hücre içi kalsiyum miktarı artı na ba lı olarak fertilizasyon için gerekli olan sperm hareketi artı ı ve hiperaktivasyon gerçekleşir [12]. Bu çalı mada bildi imiz kadarıyla literatürde ilk defa seminal sıvıda hücre içi kalsiyum düzeyi ile serum ve seminal sıvı D vitamini düzeyleri kar ıla tırılmı tir. D vitamini düzeyine göre belirlenen çalı ma grupları ile hücre içi kalsiyum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamı tir ( $p=0,878$ ). Ancak hücre içi kalsiyum miktarları ile total sperm motilitesi ( $r=0,241$ ) ve ileri hareketli sperm motilitesi ( $r=0,217$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptanmı tir. Total ve ileri

sperm motilite yüzdeleri ile hücre içi kalsiyum düzeyleri arasındaki anlamlı ilişiminin etkileyici faktörler göz önüne alındığında devam edip etmediğinin anlaşılabilmesi için regresyon analizi yapılmıştır. Analiz yapılırken hasta yaşı, testosteron düzeyi, varikozel durumu, sigara kullanımı ve MDA etkileyici faktörler olarak alınmıştır. Analiz sonucunda total motilite yüzdesi ( $p=0,035$ ) ve ileri motilite yüzdesi ( $p=0,036$ ) istatistiksel olarak anlamlı farkın devam ettiğini gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucu hücre içi kalsiyum miktarı artışı mekanizması ile sperm motilitesinin arttığını göstermektedir. Ancak D vitamini düzeyi artışı ile kalsiyum düzeyi arasında ilişki bulunmamıştır. Bunun olası nedenleri hücre içi kalsiyum miktarı artışıında D vitamininin yanı sıra rol oynayan başka etkenlerin bulunması veya bizim hasta sayımızın bu korelasyonu göstermede yetersiz kalması olabilir.

Aynı zamanda D vitamininin antioksidan etkisine dair çeşitli çalışmalar mevcuttur. D vitamininin antioksidan mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli teoriler öne atılmıştır. Bu teorilerden en çok kabul göreni, vitamin D eksikliğinde hücre içi kalsiyum miktarının artması ve reaktif oksijen radikallerinin (ROR) oluşumunun uyarılmasıdır [13]. ROR, kapasitasyon, hareket, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gibi normal sperm fonksiyonları için gereklidir [14], ancak artmış ROR miktarı fizyolojik antioksidanların arasındaki dengenin bozulmasına ve oksidatif hasara neden olur [15]. Plasma membranı fazla miktarda ROR'nin hasarına en hassas makromoleküller olan çoklu doymamış yağ asidi içerir [16]. Plasma membranında oksidatif stres hasarı, sperm hareketini azaltır, DNA hasarını artırır ve oosit-sperm füzyonunu azaltır [17]. Nedeni açıklanamayan anormal semen analizi olan infertil erkeklerin %40-80'inde [15] ve normal semen parametreleri olan infertil erkeklerin %11-78,5'inde [18, 19] artmış reaktif oksijen radikalleri olduğu gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonun en duyarlı belirteci MDA ölçümüdür. Fertil 18 ve infertil 93 hastada yapılan bir çalışmada MDA düzeylerinin infertil hasta grubunda fertil gruba göre anlamlı oranda yüksek olduğu gösterilmiştir [130]. Bu çalışmada seminal MDA ortalaması  $2,66 \pm 0,93$  ile literatürdeki çalışmanın fertil – infertil MDA ortalamalarıyla karşılaştırıldığında oldukça yüksek saptanmıştır. Bildiğimiz kadarıyla D vitamini ile seminal MDA düzeyleri arasında ilişkiyi gösteren literatür çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk defa bu ilişki araştırılmış olup çalışmada grupları arasında MDA düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0,791$ ). Yine MDA düzeyleri ile sperm parametrelerinden total sperm motilitesi ( $r=0,070$ ), ileri hareketli sperm motilitesi ( $r=0,099$ ) ve normal morfoloji yüzdeleri ( $r=-0,010$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmamıştır.

Enfeksiyonlar gibi inflamatuvar hücrelerin genital organlarda toplanmasını uyaran durumlar veya varikozel gibi immatür sperm üretimine yol açan durumlar, sigara gibi çevresel faktörler de a rı ROR üretimine neden olur [116]. Sigaranın artımı ROR ile ili kili oldu una dair kanıtlar vardır. Sigara içen ve içmeyen infertil erkeklerle yapılan bir çalı mada sigara içenlerde %48 fazla seminal lökosit konsantrasyonu ve %107 artımı ROR seviyeleri saptanmı tır [119]. Bu çalı mada seminal MDA düzeyleri ile ya (p=0,977), varikozel (p=0,357), sigara kullanımı (p=0,715) ve yuvarlak hücre sayısı arasında (p=0,779) anlamlı fark izlenmemi tir. Bu durumun olası nedenleri seminal MDA maddesinin tek ba ına oksidatif hasarı göstermede yetersiz kalı ı veya hasta sayısının yetersizli i olabilir.

Literatürde 2 çalı mada D vitamini tedavisi ile testosteron düzeyinin arttı ı gösterilmi tir. 1 yıl boyunca D vitamini tedavisi alan erkeklerde bazal de erlere göre total testosteron, aktif testosteron ve serbest testosteron seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artı oldu u gösterilmi tir [105]. Prostatitli hastalar ile yapılan bir çalı mada testosteron tedavisi ile IL-8 seviyesinin dü tü ü, sperm kalitesinin ve sperm ileri motilite yüzdesinin arttı ı gösterilmi tir. Ancak çalı ma testosteronun üriner yan etkileri nedeniyle iptal edilmi tir [131]. Bizim çalı ma sonuçlarımız D vitamininin infertil erkeklerin tedavisinde kullanılabilirli i için yeterli gözükmemektedir. Literatür ile uyumsuzlu un olası sebepleri bizim çalı ma grubumuzun infertilite ikayeti ile ba vuran hastalar olması, literatürdeki çalı maların ise infertilite ikayeti olmayan hastalar ile yapılmı olması olabilir. D vitamininin tedavide kullanılabilirli i açısından daha fazla hasta sayısına sahip ileri çalı malara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇ

Erkek infertilitesi ve serum D vitamini düzeyleri arasındaki ilişkiyi de erlendiren çok sayıda çalışmada mevcuttur. Literatürde serum D vitamini düzeyi ile seminal sıvı D vitamini düzeylerini karşılaştıran ve sperm parametreleri ile ilişkiyi de erlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda bu çalışmada literatürde bildiğimiz kadarıyla ilk seminal D vitaminini de erlendiren çalışmanın olması nedeniyle önemlidir. Çalışma sonucunda serum D vitamini düzeyleri ile ileri hareketli sperm sayısı ve normal morfolojideki sperm yüzdesi arasında anlamlı pozitif yönlü ilişki saptanmıştır. Ancak diğer parametreler göz önünde bulunduruldukları regresyon analizi yapıldığında morfoloji yüzdesindeki bu anlamlı ilişki devam ederken, ileri hareketli sperm sayısında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Seminal sıvı D vitamini ölçümleri ile sperm parametreleri arasında ise anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak serum D vitamini düzeylerinin, seminal sıvı D vitamini düzeylerine göre sperm parametrelerini göstermede daha duyarlı olduğu varsayımında bulunabiliriz. Öte yandan seminal sıvı D vitamini düzeyleri için serum düzeyleri gibi belirli cut-off değerleri olmaması nedeniyle veya hasta sayımızın yetersiz olması nedeniyle seminal sıvı D vitamini düzeyleri ile sperm parametreleri arasında anlamlı sonuç da bulunamamıştır olabilir. Statistiksel olarak seminal sıvı D vitamini seviyelerinin serum D vitamini seviyelerine kıyasla çok daha düşük olması nedeniyle hasta sayımız anlamlı ilişki gösterilmesinde yetersiz kalmıştır olabilir. Seminal sıvı D vitamini ölçümünün önemini anlamabilmesi için daha fazla olgu sayısına sahip ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

D vitamininin erkek infertilitesi ve sperm parametreleri üzerine etkilerini açıklayabilecek olası mekanizmalar üzerinde durulmaktadır. Özellikle üzerinde durulan 2 mekanizma olan hücre içi kalsiyum artışı ve antioksidan etki mekanizması bu çalışmada sperm parametreleri ile karşılaştırılarak de erlendirilmiştir. Yine bildiğimiz kadarıyla seminal sıvıda hücre içi kalsiyum ölçümü yapılarak sperm parametreleri de erlendirilen ilk çalışmanın olması açısından önemlidir. D vitamininin sperm üzerindeki etki mekanizmasının hücre içi kalsiyum artışına sekonder motilite artışı olduğuna dair yayınlar mevcuttur. Bu çalışmada serumda ya da seminal sıvıda ölçülen D vitamini düzeyleri ile seminal sıvı hücre içi kalsiyum düzeyleri arasında direkt ilişki gösterilememiş olmasına rağmen seminal sıvı hücre içi kalsiyum düzeyleri ile hem total sperm motilitesi hem de ileri hareketli sperm motilitesi arasında pozitif anlamlı ilişki olduğu

bulunmu tur. Bu sonuçlardan sperm motilitesinin kalsiyum artı ı ile ili kili oldu u ancak kalsiyum artı ında D vitamininin tek etken olmadığı varsayımında bulunabiliriz. Öte yandan hasta sayımız D vitamini ile seminal sıvı hücre içi kalsiyum ili kisini göstermede yetersiz kalmı olabilir.

D vitamini eksikli inde oksidatif hasara neden olan ROR artı ına ve bu durumun sperm parametrelerini olumsuz yönde etkiledi ine dair çalı malar mevcuttur. Bizim çalı mamızda oksidatif hasarın belirlenmesi için lipid peroksidasyonunun duyarlı bir belirteci olan MDA maddesi kullanılmı tır. Serumda ya da seminal sıvıda ölçülen D vitamini düzeyleri ile seminal sıvı MDA düzeyleri arasında anlamlı ili ki gösterilememi tir. MDA maddesi ile sperm parametreleri arasında da korelasyon saptanamamı tır. Bu sonuçlardan MDA maddesinin tek ba ına oksidatif hasarı göstermede yetersiz kaldı ı varsayımında bulunabiliriz. Öte yandan belirli cut-off de erleri olmaması nedeniyle de anlamlı sonuç elde edilememi olabilir. Veya hasta sayımız seminal MDA düzeyleri ile sperm parametreleri arasında anlamlı sonuç bulunması için yetersiz kalmı olabilir. Seminal sıvı MDA ölçümünün öneminin anla ılabilmesi için daha fazla olgu sayısına sahip ileri ara tırmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalı mada D vitamininin erkek infertilitesi ve sperm parametreleri üzerine etkilerini açıklayabilecek olası mekanizmalardan hem hücre içi kalsiyum artı ı hem de antioksidan etki mekanizması de erlendirilmi olup anlamlı ili ki gösterilememi tir. Ancak D vitamini düzeyleri ile sperm parametreleri arasında belirgin bir ili ki mevcuttur. Bu sonuçlardan yola çıkarak her ne kadar hasta sayımız kısıtlı olsa da D vitamininin sperm parametreleri üzerine aynı anda pek çok farklı mekanizma ile etki etti i çıkarımında bulunabiliriz.

Literatürde D vitamini tedavisinin sperm parametrelerini ve testosteron düzeylerini iyile tirmede ve bu sayede erkek infertilitesinde tedavi yakla ımı olarak kullanılabilen olmasına dair çalı malar vardır. Her ne kadar literatürde az sayıda D vitamini tedavisine dair olumlu çalı malar bulunsa da bizim çalı mamızda sperm morfolojisi üzerine olan olumlu etkisi dı ında etkisi izlenmemi tir. Bu nedenle D vitamini eksikli i olan infertil erkeklerde sperm parametrelerinin iyile tirilmesinde ve oksidatif stresten korunmada D vitamininin tedavide kullanılabilirli inin anla ılabilmesi için daha fazla olgu sayısına sahip ileri ara tırmalara ihtiyaç vardır.

## REFERANSLAR

1. *Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss.* Fertil Steril, 2008. **90**(5 Suppl): p. S60.
2. Sharlip, I.D., et al., *Best practice policies for male infertility.* Fertil Steril, 2002. **77**(5): p. 873-82.
3. Hatasaka, H., *An efficient infertility evaluation.* Clin Obstet Gynecol, 2011. **54**(4): p. 644-55.
4. Cooper, T.G., et al., *World Health Organization reference values for human semen characteristics.* Hum Reprod Update, 2010. **16**(3): p. 231-45.
5. Oehninger, S., D.R. Franken, and W. Ombelet, *Sperm functional tests.* Fertil Steril, 2014. **102**(6): p. 1528-33.
6. Jones, G., S.A. Strugnell, and H.F. DeLuca, *Current understanding of the molecular actions of vitamin D.* Physiol Rev, 1998. **78**(4): p. 1193-231.
7. Holick, M.F., *Vitamin D deficiency.* N Engl J Med, 2007. **357**(3): p. 266-81.
8. Anagnostis, P., S. Karras, and D.G. Goulis, *Vitamin D in human reproduction: a narrative review.* Int J Clin Pract, 2013. **67**(3): p. 225-35.
9. Lee, D.M., et al., *Association of hypogonadism with vitamin D status: the European Male Ageing Study.* Eur J Endocrinol, 2012. **166**(1): p. 77-85.
10. Aquila, S., et al., *Human male gamete endocrinology: 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism.* Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 140.
11. Blomberg Jensen, M., et al., *Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa.* Hum Reprod, 2011. **26**(6): p. 1307-17.
12. Breitbart, H., *Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction.* Mol Cell Endocrinol, 2002. **187**(1-2): p. 139-44.
13. Sun, X. and M.B. Zemel, *1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte reactive oxygen species production.* Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(8): p. 1944-53.
14. Griveau, J.F. and D. Le Lannou, *Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology.* Int J Androl, 1997. **20**(2): p. 61-9.
15. Agarwal, A., R.A. Saleh, and M.A. Bedaiwy, *Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction.* Fertil Steril, 2003. **79**(4): p. 829-43.
16. Aktan, G., et al., *Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk?* Fertil Steril, 2013. **99**(5): p. 1211-5.
17. Rajesh Kumar, T., et al., *Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility.* Mutat Res, 2002. **513**(1-2): p. 103-11.
18. Agarwal, A. and T.M. Said, *Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility.* Hum Reprod Update, 2003. **9**(4): p. 331-45.
19. Venkatesh, S., et al., *Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men.* Indian J Med Res, 2011. **134**: p. 396-8.
20. Ombelet, W., et al., *Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries.* Hum Reprod Update, 2008. **14**(6): p. 605-21.
21. Boivin, J., et al., *International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care.* Hum Reprod, 2007. **22**(6): p. 1506-12.
22. Gurunath, S., et al., *Defining infertility--a systematic review of prevalence studies.* Hum Reprod Update, 2011. **17**(5): p. 575-88.
23. Dunson, D.B., B. Colombo, and D.D. Baird, *Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle.* Hum Reprod, 2002. **17**(5): p. 1399-403.
24. *Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589.* Fertil Steril, 2014. **101**(3): p. 633-4.
25. *Optimizing natural fertility: a committee opinion.* Fertil Steril, 2013. **100**(3): p. 631-7.

26. Fritz, M.A., *The modern infertility evaluation*. Clin Obstet Gynecol, 2012. **55**(3): p. 692-705.
27. McLaren, J.F., *Infertility evaluation*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2012. **39**(4): p. 453-63.
28. Basaria, S., *Male hypogonadism*. Lancet, 2014. **383**(9924): p. 1250-63.
29. Mawhinney, M. and A. Mariotti, *Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system*. Periodontol 2000, 2013. **61**(1): p. 232-51.
30. Samplaski, M.K., et al., *New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests*. Int J Urol, 2010. **17**(10): p. 839-47.
31. Balasubramanian, R. and W.F. Crowley, Jr., *Isolated GnRH deficiency: a disease model serving as a unique prism into the systems biology of the GnRH neuronal network*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **346**(1-2): p. 4-12.
32. Schneider, H.J., et al., *Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review*. Jama, 2007. **298**(12): p. 1429-38.
33. Siemons, L.J. and C.H. Mahler, *Hypogonadotropic hypogonadism in hemochromatosis: recovery of reproductive function after iron depletion*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **65**(3): p. 585-7.
34. Anawalt, B.D., *Approach to male infertility and induction of spermatogenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(9): p. 3532-42.
35. Teerds, K.J., D.G. de Rooij, and J. Keijer, *Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models*. Hum Reprod Update, 2011. **17**(5): p. 667-83.
36. Nachtigall, L.B., et al., *Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism--a treatable form of male infertility*. N Engl J Med, 1997. **336**(6): p. 410-5.
37. McLachlan, R.I. and M.K. O'Bryan, *Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(3): p. 1013-24.
38. Wikstrom, A.M. and L. Dunkel, *Klinefelter syndrome*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(2): p. 239-50.
39. Pryor, J.L., et al., *Microdeletions in the Y chromosome of infertile men*. N Engl J Med, 1997. **336**(8): p. 534-9.
40. Krausz, C., et al., *Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(6): p. 2638-42.
41. Hiort, O. and P.M. Holterhus, *Androgen insensitivity and male infertility*. Int J Androl, 2003. **26**(1): p. 16-20.
42. Werner, R., H. Grottsch, and O. Hiort, *46,XY disorders of sex development--the undermasculinised male with disorders of androgen action*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010. **24**(2): p. 263-77.
43. Mazen, I., et al., *A novel mutation (c.2735\_2736delTC) in the androgen receptor gene in 46,XY females with complete androgen insensitivity syndrome in an Egyptian family*. Horm Res Paediatr, 2014. **82**(6): p. 411-4.
44. Kang, H.J., et al., *The effect of 5alpha-reductase-2 deficiency on human fertility*. Fertil Steril, 2014. **101**(2): p. 310-6.
45. *Report on evaluation of the azoospermic male*. Fertil Steril, 2006. **86**(5 Suppl 1): p. S210-5.
46. Kim, H.H. and M. Goldstein, *Adult varicocele*. Curr Opin Urol, 2008. **18**(6): p. 608-12.
47. Schilsky, R.L., et al., *Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer*. Ann Intern Med, 1980. **93**(1): p. 109-14.
48. Meistrich, M.L., *Relationship between spermatogonial stem cell survival and testis function after cytotoxic therapy*. Br J Cancer Suppl, 1986. **7**: p. 89-101.
49. Sawka, A.M., et al., *A systematic review of the gonadal effects of therapeutic radioactive iodine in male thyroid cancer survivors*. Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **68**(4): p. 610-7.

50. Waylen, A.L., et al., *Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(1): p. 31-44.
51. Krassas, G.E., K. Poppe, and D. Glinoeer, *Thyroid function and human reproductive health*. Endocr Rev, 2010. **31**(5): p. 702-55.
52. Claahsen-van der Grinten, H.L., et al., *Testicular adrenal rest tumours in congenital adrenal hyperplasia*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(2): p. 209-20.
53. Jefferys, A., D. Siassakos, and P. Wardle, *The management of retrograde ejaculation: a systematic review and update*. Fertil Steril, 2012. **97**(2): p. 306-12.
54. Ohl, D.A., et al., *Anejaculation and retrograde ejaculation*. Urol Clin North Am, 2008. **35**(2): p. 211-20, viii.
55. *Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion*. Fertil Steril, 2012. **98**(2): p. 302-7.
56. Gougeon, A., *Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses*. Endocr Rev, 1996. **17**(2): p. 121-55.
57. Lambalk, C.B., et al., *Testing ovarian reserve to predict age at menopause*. Maturitas, 2009. **63**(4): p. 280-91.
58. Broekmans, F.J., M.R. Soules, and B.C. Fauser, *Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences*. Endocr Rev, 2009. **30**(5): p. 465-93.
59. Battaglia, D.E., et al., *Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women*. Hum Reprod, 1996. **11**(10): p. 2217-22.
60. Hansen, K.R., et al., *A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause*. Hum Reprod, 2008. **23**(3): p. 699-708.
61. Broekmans, F.J., et al., *A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(6): p. 685-718.
62. Hendriks, D.J., et al., *Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level*. Fertil Steril, 2005. **83**(2): p. 291-301.
63. Ledger, W.L., *Clinical utility of measurement of anti-mullerian hormone in reproductive endocrinology*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(12): p. 5144-54.
64. Mol, B.W., et al., *Is hysterosalpingography an important tool in predicting fertility outcome?* Fertil Steril, 1997. **67**(4): p. 663-9.
65. Evers, J.L., J.A. Land, and B.W. Mol, *Evidence-based medicine for diagnostic questions*. Semin Reprod Med, 2003. **21**(1): p. 9-15.
66. *Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion*. Fertil Steril, 2012. **98**(2): p. 294-301.
67. *[Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction]*. Ann Ist Super Sanita, 2001. **37**(1): p. I-xii, 1-123.
68. Du Plessis, S.S., S. Gokul, and A. Agarwal, *Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures*. Front Biosci (Elite Ed), 2013. **5**: p. 224-31.
69. Mikhailichenko, V.V. and A.S. Esipov, *Peculiarities of semen coagulation and liquefaction in males from infertile couples*. Fertil Steril, 2005. **84**(1): p. 256-9.
70. Talwar, P. and S. Hayatnagarkar, *Sperm function test*. J Hum Reprod Sci, 2015. **8**(2): p. 61-9.
71. Baldi, E., et al., *Progesterone and spermatozoa: a long-lasting liaison comes to definition*. Hum Reprod, 2011. **26**(11): p. 2933-4.
72. Samavat, J., et al., *Acrosome reaction is impaired in spermatozoa of obese men: a preliminary study*. Fertil Steril, 2014. **102**(5): p. 1274-1281.e2.



73. Liu, D.Y., et al., *Frequency of disordered zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-ZP binding*. Hum Reprod, 2001. **16**(6): p. 1185-90.
74. Cross, N.L. and S. Meizel, *Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm*. Biol Reprod, 1989. **41**(4): p. 635-41.
75. Hwang, K. and D.J. Lamb, *The sperm penetration assay for the assessment of fertilization capacity*. Methods Mol Biol, 2013. **927**: p. 103-11.
76. Stanger, J.D., et al., *Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation*. Reprod Biomed Online, 2010. **21**(4): p. 474-84.
77. Henkel, R., et al., *Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients*. Fertil Steril, 2005. **83**(3): p. 635-42.
78. Aziz, N., et al., *Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index*. Fertil Steril, 2004. **81**(2): p. 349-54.
79. Palermo, G.D., et al., *Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity*. Fertil Steril, 2014. **102**(6): p. 1508-17.
80. De Braekeleer, M. and T.N. Dao, *Cytogenetic studies in male infertility: a review*. Hum Reprod, 1991. **6**(2): p. 245-50.
81. Wang, Z., et al., *Analysis by mass spectrometry of 100 cystic fibrosis gene mutations in 92 patients with congenital bilateral absence of the vas deferens*. Hum Reprod, 2002. **17**(8): p. 2066-72.
82. Thonneau, P., et al., *Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989)*. Hum Reprod, 1991. **6**(6): p. 811-6.
83. Lerchbaum, E. and B. Obermayer-Pietsch, *Vitamin D and fertility: a systematic review*. Eur J Endocrinol, 2012. **166**(5): p. 765-78.
84. Parikh, G., et al., *Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells*. Horm Metab Res, 2010. **42**(10): p. 754-7.
85. Agic, A., et al., *Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers*. Reprod Sci, 2007. **14**(5): p. 486-97.
86. Vigano, P., et al., *Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system*. J Mol Endocrinol, 2006. **36**(3): p. 415-24.
87. Habib, F.K., S.Q. Maddy, and K.J. Gelly, *Characterisation of receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the human testis*. J Steroid Biochem, 1990. **35**(2): p. 195-9.
88. Aquila, S., et al., *Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete*. J Anat, 2008. **213**(5): p. 555-64.
89. Blomberg Jensen, M., et al., *Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract*. Hum Reprod, 2010. **25**(5): p. 1303-11.
90. Hirai, T., et al., *Effect of 1,25-dihydroxyvitamin d on testicular morphology and gene expression in experimental cryptorchid mouse: testis specific cDNA microarray analysis and potential implication in male infertility*. J Urol, 2009. **181**(3): p. 1487-92.
91. Selva, D.M., et al., *The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility*. J Lipid Res, 2004. **45**(6): p. 1040-50.
92. Zanatta, L., et al., *Effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in plasma membrane targets in immature rat testis: ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity*. Arch Biochem Biophys, 2011. **515**(1-2): p. 46-53.

93. Akerstrom, V.L. and M.R. Walters, *Physiological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in TM4 Sertoli cell line*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 1): p. E884-90.
94. Hamden, K., et al., *Inhibitory effects of 1alpha, 25dihydroxyvitamin D3 and Ajuga iva extract on oxidative stress, toxicity and hypo-fertility in diabetic rat testes*. J Physiol Biochem, 2008. **64**(3): p. 231-9.
95. Kwiecinski, G.G., G.I. Petrie, and H.F. DeLuca, *Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat*. J Nutr, 1989. **119**(5): p. 741-4.
96. Osmundsen, B.C., et al., *Multiple sites of action of the vitamin D endocrine system: FSH stimulation of testis 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors*. J Steroid Biochem, 1989. **34**(1-6): p. 339-43.
97. Kinuta, K., et al., *Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads*. Endocrinology, 2000. **141**(4): p. 1317-24.
98. Ramlau-Hansen, C.H., et al., *Are serum levels of vitamin D associated with semen quality? Results from a cross-sectional study in young healthy men*. Fertil Steril, 2011. **95**(3): p. 1000-4.
99. Foresta, C., et al., *Bone mineral density and testicular failure: evidence for a role of vitamin D 25-hydroxylase in human testis*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(4): p. E646-52.
100. Yoshida, M., N. Kawano, and K. Yoshida, *Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(21): p. 3446-57.
101. Wehr, E., et al., *Association of vitamin D status with serum androgen levels in men*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **73**(2): p. 243-8.
102. Wehr, E., et al., *Low free testosterone is associated with heart failure mortality in older men referred for coronary angiography*. Eur J Heart Fail, 2011. **13**(5): p. 482-8.
103. Somjen, D., et al., *25 hydroxy-vitamin D(3)-1alpha hydroxylase expression and activity in cultured human osteoblasts and their modulation by parathyroid hormone, estrogenic compounds and dihydrotestosterone*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **107**(3-5): p. 238-44.
104. Mordan-McCombs, S., et al., *Tumor progression in the LPB-Tag transgenic model of prostate cancer is altered by vitamin D receptor and serum testosterone status*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **121**(1-2): p. 368-71.
105. Pilz, S., et al., *Effect of vitamin D supplementation on testosterone levels in men*. Horm Metab Res, 2011. **43**(3): p. 223-5.
106. Ickowicz, D., M. Finkelstein, and H. Breitbart, *Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases*. Asian J Androl, 2012. **14**(6): p. 816-21.
107. Nomikos, M., et al., *Phospholipase Czeta rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility*. Fertil Steril, 2013. **99**(1): p. 76-85.
108. Dragileva, E., S. Rubinstein, and H. Breitbart, *Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa*. Biol Reprod, 1999. **61**(5): p. 1226-34.
109. Ma, H.T., et al., *Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca2+ channels*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1647-51.
110. Agarwal, A. and L.H. Sekhon, *The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility*. Hum Fertil (Camb), 2010. **13**(4): p. 217-25.
111. Auger, J., et al., *Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities*. Hum Reprod, 2001. **16**(12): p. 2710-7.
112. Petersen, B.H., et al., *Human seminal plasma inhibition of complement*. J Lab Clin Med, 1980. **96**(4): p. 582-91.
113. Sikka, S.C., *Relative impact of oxidative stress on male reproductive function*. Curr Med Chem, 2001. **8**(7): p. 851-62.

114. Garrido, N., et al., *Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility*. Asian J Androl, 2004. **6**(1): p. 59-65.
115. Gavella, M. and V. Lipovac, *NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men*. Arch Androl, 1992. **28**(2): p. 135-41.
116. Mahfouz, R., et al., *Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species*. Fertil Steril, 2010. **94**(6): p. 2141-6.
117. Thomas, J., et al., *Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology*. Hum Reprod, 1997. **12**(11): p. 2418-21.
118. 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*. Fertil Steril, 1994. **62**(2): p. 387-93.
119. Saleh, R.A., et al., *Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study*. Fertil Steril, 2002. **78**(3): p. 491-9.
120. Maneesh, M., et al., *Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males*. Indian J Physiol Pharmacol, 2006. **50**(3): p. 291-6.
121. Kao, S.H., et al., *Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility*. Fertil Steril, 2008. **89**(5): p. 1183-90.
122. Agarwal, A., et al., *Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men*. Reprod Biol Endocrinol, 2014. **12**: p. 33.
123. Desai, N., et al., *Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men*. Fertil Steril, 2009. **92**(5): p. 1626-31.
124. Pasqualotto, F.F., et al., *Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation*. Fertil Steril, 2000. **73**(3): p. 459-64.
125. Kovac, J.R., et al., *The effects of advanced paternal age on fertility*. Asian J Androl, 2013. **15**(6): p. 723-8.
126. *Smoking and infertility*. Fertil Steril, 2008. **90**(5 Suppl): p. S254-9.
127. Yue, H.X., et al., *[Semen quality and sperm morphologic study of infertile men with varicocele]*. Zhonghua Nan Ke Xue, 2005. **11**(12): p. 933-5.
128. Ollandini, G., et al., *Should older patients be offered varicocele correction to improve their fertility?* Andrology, 2014. **2**(3): p. 402-7.
129. Delvin, E., et al., *Role of vitamin D in acquired immune and autoimmune diseases*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2014. **51**(4): p. 232-47.
130. Li, K., X. Shang, and Y. Chen, *High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility*. Clin Chim Acta, 2004. **346**(2): p. 199-203.
131. Tiwari, A., *Elocalcitol, a vitamin D3 analog for the potential treatment of benign prostatic hyperplasia, overactive bladder and male infertility*. IDrugs, 2009. **12**(6): p. 381-93.