

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**MELATONİNİN İNSAN SPERM HÜCRESİ FONKSİYONU VE
DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO FERTİLİZASYON
AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra Aydın

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Şeyda Şebnem Özkal

İSTANBUL
Nisan 2018

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/04/2018

Prof. Dr. İmer Okar
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Meriç Karacan
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Doç. Dr. Ş. Şebnem Özkal
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

İÇİNDEKİLER	SAYFA
Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller	iv
Tablolar	v
Kısaltmalar	vi
Önsöz	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi	3
2.1.1. Testisler	3
2.1.2. Seminifer Tübüller	3
2.1.3. Sertoli Hücreleri	4
2.1.4. Spermatogonyum	6
2.1.5. Spermatogenez	6
2.1.6. Spermatozoon	7
2.1.7. Semen	9
2.2. İnfertilite	10
2.2.1. Erkek İnfertilite	10
2.3. Erkek İnfertilitesinde Sperm DNA Bütünlüğünün Rolü	11
2.3.1. Spermatozoon DNA'sında Hasara Neden Olan Faktörler	12
2.4. Sperm DNA Hasarını Belirleme Yöntemleri	13
2.4.1. Toluidin Mavisı Boyaması (Toluidine Blue, TB)	13
2.4.2. DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence İn Situ Hybridisation) Yöntemi	13
2.4.3. Akridin Turuncu Testi (Acrydine Orange Test, AOT)	14
2.4.4. Anilin Mavisı Boyaması (Aniline Blue)	14
2.4.5. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi	14
2.4.6. İn Situ-Nick Translasyon (NT) Yöntemi	14
2.4.7. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (Sperm Chromatin Dispersion Test, SCD, HALOSPERM Testi)	15

2.4.8. COMET (Cluster of Motifs E-value Tool) Yöntemi	15
2.4.9. TUNEL (TdT-mediated-dUTP Nick End Labeling) Yöntemi	16
2.4.10. Sperm Kromatin Yapı Analizi (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA)	18
2.4.11. Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography HPLC) Yöntemi	19
2.5. İnfertilite Tedavisinde Yardımcı Üreme Teknikleri	19
2.5.1. İnrauterin İnseminasyon (IUI)	19
2.5.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)	20
2.5.3. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)	21
2.6. Melatonin	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ	39
7. ÖZET	40
8. SUMMARY	41
9. KAYNAKLAR	42
10. ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER	SAYFA
Şekil 1: Erkek Üreme Sistemi	3
Şekil 2: Seminifer tübül ve interstisyel bağ dokusunun şematik gösterimi	4
Şekil 3: Spermatogenez	7
Şekil 4: Normal bir spermatozoonun gösterimi	8
Şekil 5: a) Toluidin mavisi boyaması b)DBD-FISH yöntemi ve c) Akridin turuncu boyaması	14
Şekil 6: Görsel analiz ile COMET skorlaması	16
Şekil 7: TUNEL metodu şematik gösterimi	18

TABLolar	SAYFA
Tablo 1: Kontrol grubundaki örneklerin sayı, motilite ve hasta eşlerindeki gebelik durumlarının dağılımı	26
Tablo 2: Çalışma grubundaki örneklerin sayı, motilite ve hasta eşlerindeki gebelik durumlarının dağılımı	27
Tablo 3: Sperm örneklerinin grup içi ve gruplar arası değerlendirmesi	28
Tablo 4: Hasta sperm örneklerinin sayı ve motilite ve farklı zamanlardaki DNA fragmentasyon oranlarının dağılımı	29
Tablo 5: Melatonin uygulanmayan örneklerin farklı zamanlardaki DNA fragmentasyon oranlarının değerlendirilmesi	30
Tablo 6: Melatonin uygulanan örneklerin farklı zamanlardaki DNA fragmentasyon oranlarının değerlendirilmesi	30
Tablo 7: Melatonin uygulanan ve uygulanmayan sperm örneklerinin farklı zamanlardaki DNA fragmentasyon oranlarının değerlendirilmesi	31

KISALTMALAR

8-OHdG: 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-Hidroksideoksiguanozin)

AOT: Acridine Orange Test (Akridin Turuncu Testi)

CMA3: Chromomycin A3 (Kromomisin A3)

COMET: Cluster of Motifs E-value Tool

DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridisation

DFO: DNA Fragmantasyon Oranı

DNA: Deoxyribo Nucleic Acid (Deoksiribo Nükleik Asit)

dUTP: Deoxyuridine triphosphate (Deoksiuridin Trifosfat)

FSH: Follicle Stimulating Hormone (Folikül Uyarıcı Hormon)

GIFT: Gamete Intrafallopian Transfer

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone (Gonadotropin Salgılatıcı Faktör)

HCG: Human Chorionic Gonadotropin Hormone (İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu)

HFT: Human Tubal Fluid (İnsan Tubal Sıvı)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

ICI: Intra Cervical Insemination (İntra Servikal İnseminasyon)

ICSI: Intra Cytoplasmic Sperm Injection (İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

ISNT: In Situ-Nick Translation (İn Situ Nick Translasyonu)

IUI: Intra Uterin Insemination (İntra Uterin İnseminasyonu)

IVF: In Vitro Fertilization (İn Vitro Fertilizasyon)

IVF-ET: In Vitro Fertilization-Embryo Transfer (İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi)

OH: Hidroksit

PZD: Partial Zona Dissection (Parsiyel-Kısmi Zona Diseksiyonu)

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

SCD: Sperm Chromatin Dispersion (Sperm Kromatin Dağılımı)

SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay (Sperm Kromatin Yapı Analizi)

SUZI: Sub Zonal Insemination (Subzonal İnseminasyon)

TB: Toluidine Blue (Toluidin Mavisi)

TET: Tubal Embryo Transfer (Tubal Embriyo Transferi)

TUNEL: TdT-mediated-dUTP Nick End Labeling

WHO: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri

ZIFT: Zygote Intra Fallopian Transfer (Zigot İnter Fallopian Transferi)



ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca emeği geçen tüm öğretim üyelerine ve danışmanım Doç. Dr. Şeyda Şebnem Özkal'a, tezimde bilgilerini benimle paylaşan Prof. Dr. İmer Okar ve Doç. Dr. Meriç Karacan'a, bu süreçte yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Evrim Ünsal'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen, sevgilerini her daim hissettiğim canım annem Kıymet Aydın, canım babam Nusret Aydın'a,

Kardeşlik kelimesinin onlarda en anlamlı olduğu canım abim Ümit Aydın, Hasan Deniz Aydın, Servet Aydın ve yengemlere,

İyiki kelimesini onda öğrendiğim ve attığım her adımda her zaman yanımda hissettiğim, bu süreçte beni hep destekleyen nişanlım Melih Ergülen'e,

Bana kız kardeş olan, tez çalışmamda emeklerini esirgemeyen Gizem Gökçen Yılmaz ve Sultan Şahin'e,

Bu süreçte bana göstermiş oldukları anlayış, sabır, saygı ve sevgilerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esra Aydın

1. GİRİŞ

Korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınamaması olarak tanımlanan infertilite (kısırlık), %40-%50 kadına ait, %30-%40 erkeğe ait nedenlerden ortaya çıkmakla, çiftlerin %25'inde ise erkek ve kadın faktörü birlikte bulunmaktadır. Kadınlarda görülen en önemli infertilite sebepleri; endometriozis, yumurtlama bozuklukları, tüplerin hasarlı veya tıkalı olmasıdır. Erkeklerde görülen infertilite nedenleri ise; sperm sayısının, hareketliliğin yetersiz olması ve yapısının anormal olmasıdır. Erkeklerde infertilite tanısının konulmasında semen analizi yapılmakta, sperm sayısı ve özelliklerinin verimli dölleme için yeterli ve uygun olmaması halinde yıkama işlemi veya melatonin uygulaması ile sperm sayısının ve motilitesinin artırılabilmesi bazı çalışmalarda öne sürülmektedir. Sperm sayısı ve motilitesinin yeterli ve uygun olması halinde sperm DNA'sının fragmentasyon oranı da infertilite sebebiyle ilgili bilgi verebilmektedir. Çünkü spermatozoondaki DNA hasarı; apoptozis erken embriyo fragmentasyonu ya da daha sonra düşüklerle (abort) sonuçlanabilir. DNA fragmentasyon oranlarının da melatonin uygulaması ile değiştiğine dair çalışmalar mevcuttur. Çeşitli tekniklerle ölçülen DNA fragmentasyon oranına göre de infertilite tanısı konulan çiftlere uygun yardımcı üreme teknikleri kullanılır ve çiftlerin bebek sahibi olması sağlanır.

Melatonin uzun zamandan beri bilinen pineal bez hormonudur. Temel olarak immün modülatör, gün içi ve mevsimsel ritmi ayarlayıcı, uyku düzenleyici etkileri vardır. Tüm vücutta yaygın melatonin reseptörleri bulunmaktadır. Epifiz bezi tarafından özellikle karanlıkta salgılanan ve sirkadiyen ritim kontrolünden sorumlu olan melatoninin, son zamanlarda hem antioksidan özelliği hem de üreme sistemi üzerine etkileri incelenmektedir. Bu sebeple fertilitenin artırılmasına yönelik çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadır.

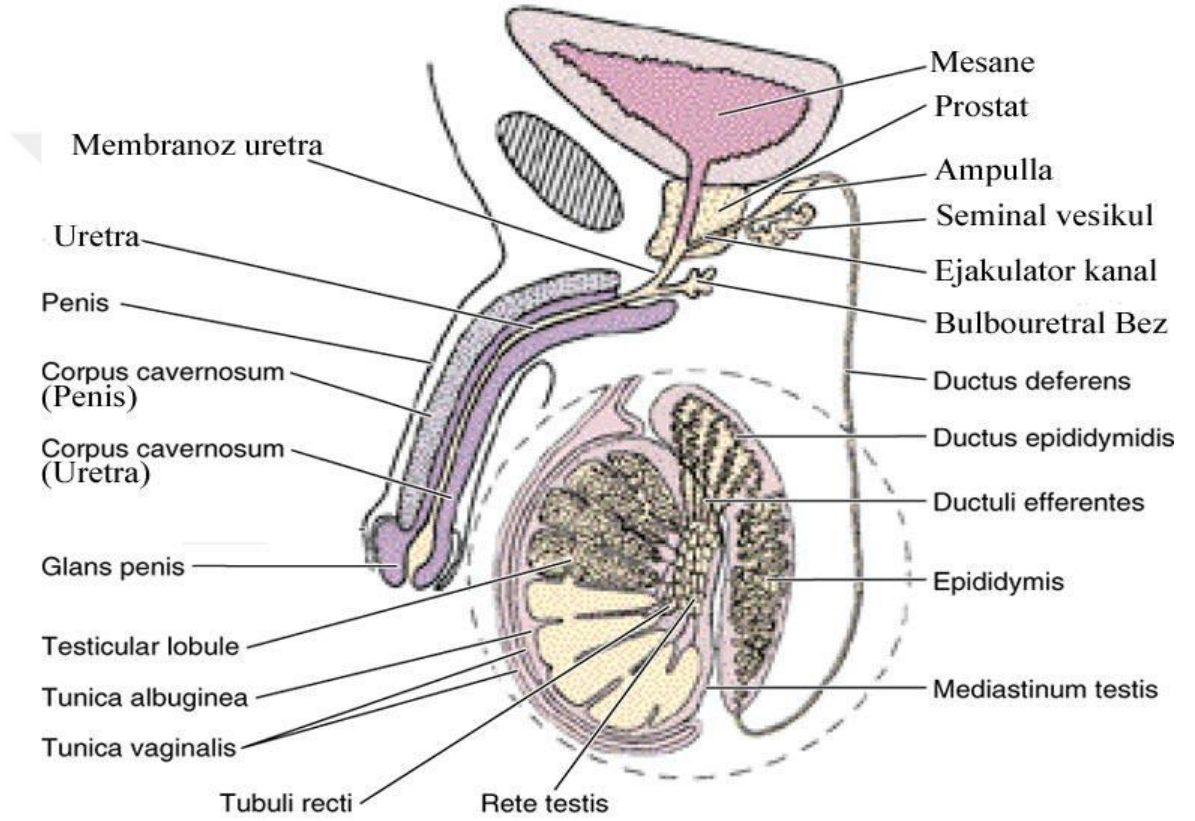
Bu çalışmada melatoninin insan sperm hucresi fonksiyonu ve DNA hasarı üzerine etkisinin in vitro fertilizasyon açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla melatonin hormonu uygulamasının sperm parametreleri üzerine ve DNA hasar oranına etkisi incelenmiştir.



1. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi; testisler, yardımcı bezler, genital kanallar ve penisten oluşur ¹ (Şekil 1).



Şekil 1: Erkek üreme sistemi ¹

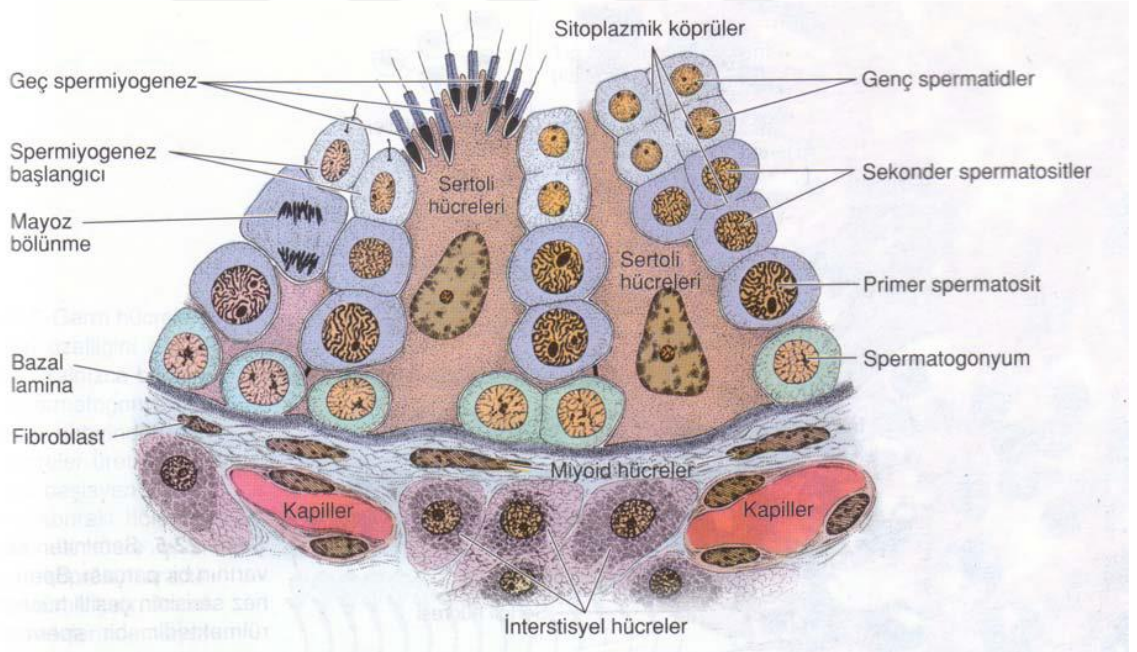
2.1.1. Testisler

İnsanda 15 gram ağırlığında olan testisler, oval yapıda olan organlardır. Skrotum içinde asılı olarak bulunurlar ². Skrotumun derisi çok incedir ve melanin pigmenti içerdiği için kahverengi renktedir. Yağ ve ter bezleri bol miktarda bulunur. Skrotum testis ısısının ayarlanmasında önemli rol alır ¹.

2.1.2.Seminifer Tübüller

Testiste yaklaşık olarak 250-1000 kadar seminifer tübül bulunur. Her bir tübül 150-250 µm çapında 30-70 cm uzunluğundadır ¹.

Seminifer tübüller, fibröz bağ dokusu kılıfı, çok katlı seminifer epitel, belirgin bir bazal membrandan ve lamina propria'dan oluşur. Seminifer tübüller arasında interstisyel doku bulunur. Seminifer tübülü, fibroz tunika propria sarar. Fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman yassılaştırmış miyoid hücreler içermektedir. Bu hücreler düz kas özellikleri göstermektedir ¹(Şekil 2).



Şekil 2: Seminifer tübül ve interstisyel bağ dokusunun şematik gösterimi ¹.

2.1.3.Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan piramidal hücrelerdir. Destekleyici hücreler olan Sertoli hücreleri, puberteye kadar dominant halde bulunur. Puberteden sonra ise

postmitotiktir. Bir başka deyişle, erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi olmaz. Fakat herhangi bir hasar meydana geldiğinde kendini yenileyecek yapıya sahiptirler. İlerleyen yaşlarda ise Sertoli hücreleri tekrar epitelin esas elemanı haline gelir ¹.

Sertoli hücrelerinin sınırları düzensizdir ve sitoplazmada derin çöküntüler içerirler ³. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur. Apikal uçları ise seminifer tübülün lümenine uzanır. Sertoli hücreleri spermatogenik seri hücrelerine göre daha dirençlidir. Özellikle kötü beslenme, X ışını gibi olumsuz koşullara dayanıklıdır ⁴. Komşu Sertoli hücrelerinin uzantıları sıkı bağlantılarla birbirlerine bağlanmıştır. Bu sıkı bağlantılar kan testis bariyerini oluşturur. Bu bağlantılar sayesinde sertoli hücreleri immünojenik koruma sağlamış olur ⁵. Spermatozidler ve spermatidler sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Sertoli hücrelerinin bağlantıları sayesinde spermatozidler ve spermatidler kandan gelen ürünlerden korunurlar.

Sertoli hücrelerinin diğer işlevleri; spermiyogenezin sonunda atılan artık cisimleri fagosite etmek, spermiyasyon süresince olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak, gelişmekte olan spermatogenik hücreleri beslemek, korumak, Anti müllerian hormonu üretmek, seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamaktır ^{1,5,6}. İnhibin ve aktivin alt birimleri de sertoli hücreleri tarafından salgılanır. İnhibin, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve Gonadotropin Salgılatıcı faktör (GnRH) üzerine negatif geri bildirim etkisi gösterir. Bunun tam tersi olarak aktivinde FSH salınımı üzerine pozitif geri bildirim etkisi gösterir ¹.

Sertoli hücreleri, germ hücreleriyle sıkı iletişim halinde olup germ hücrelerinin gelişimi için oldukça önemlidir. Bu iletişimdeki amaç, spermatogenez için uygun bir çevre oluşturmaktır ⁷. Germ hücre ölümünün düzenlenmesini parakrin uyarılar sağlar ⁸. Spermatogenik hücreler; düzenli sertoli hücrelerinin arasında sürekli gelişen, düzensiz şekilde yerleşmiş

katmanlar oluşturan hücreslerdir ⁶. Spermatojenik hücrelerden bazal membrana en yakın olan spermatojenyumlardır. Lümeneye en yakın olan olgun hücreler ise spermatoitlerdir. Lümeneye ise spermiumlar izlenir ¹.

2.1.4.Spermatojenyum

Spermatojenyumlar, 12 µm çapında diploid spermatojenik hücrelerdir. Bazal lamina ile direkt ilişki içerisindedirler ve bazal kompartmana yerleşiklerdir.

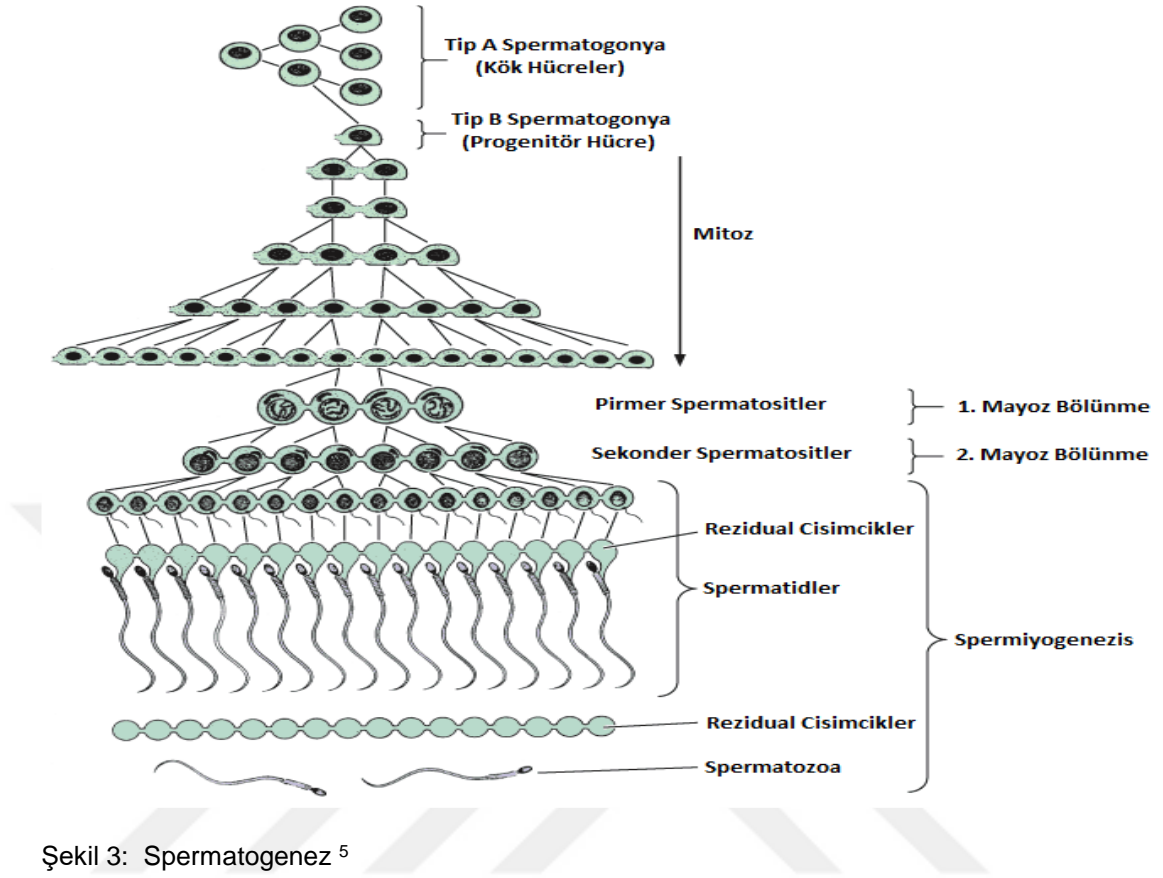
Küçük hücreler olan spermatojenyumlar, seksüel olgunlaşmada bir seri mitoz bölünme geçirirler. Yeni oluşan farklılaşmamış hücreler, ya tip A spermatojenyum olarak devam eder, ya da mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatojenyumları oluştururlar.

Spermatojenyumlar kök hücreden köken alırlar. İnsan testisinde koyu ve açık olarak gözlenenler Tip A Spermatojenyumlarıdır. Mitotik hücre bölünmeleri geçirirler. Tip A koyu spermatojenyumlar bölünerek spermatojenyumların sayısını korurlar ve bu bölünmeden sonra Tip A açık spermatojenyumları oluştururlar ¹.

2.1.5.Spermatojeniz

Spermatojenyumların puberteden sonra bölünüp farklılaşarak sperm oluşturmasıdır ⁹ (Şekil 3).

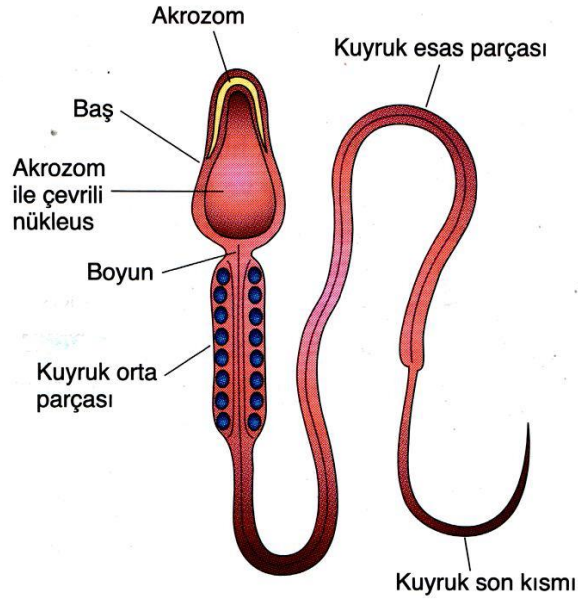
İnsanda spermatojenyumdan spermatozoon (olgun sperm hücresi) oluşumuna kadar geçen süre yaklaşık 64 gündür ¹.



Şekil 3: Spermatojenez⁵

2.1.6. Spermatozoon (Spermiyum, Sperm)

Spermatozoon, özelleşmiş bir morfolojiye sahip, olgun germ hücresidir. Spermin toplam uzunluğu 60 μm ' dir¹. Spermiyum, hareketlilik ve enerji üretilmesinden sorumlu olan kuyruk ve DNA'yı içeren, oositin zona pellusidayı tanıyarak sperm oosit birleşmesini sağlayan baş bölgesinden meydana gelir¹⁰. (Şekil 4).



Şekil 4: Normal bir spermatozoonun gösterimi ¹¹

Kuyruk, spermiyumun enerji üretim bölgesidir ve sperm hareketinden sorumludur. Kuyruk bölgesi oldukça gelişmiş bir bölgedir ¹².

Spermin hareketliliği fertilizasyon için önemlidir. İnsan spermiyum kuyruğu dört ana bölgeden oluşur: boyun, orta parça, esas parça ve son parça ¹⁰. Kuyruk ile sperm başı arasında 0.5 μm uzunluğunda kısa bir parça vardır. Bu parçaya boyun denir. Orta parça, kuyruğun 3,5 μm uzunluğundaki parçasıdır. Esas parça, 55 μm olmakla birlikte kuyruğun en uzun parçasıdır. Orta parça bağlantı parçasının en distalindeki anulus hizasına kadar uzanırken, esas parça anulustan termina parçasının proksimaline kadar uzanır ¹³. İnsan spermiyumu kuyruğun bağlantı ve orta parçası etrafında çok fazla sayıda mitokondri gibi organel fazlalıklarını içeren sitoplazmik bir damla içerir ¹⁴. Mitokondri kılıfının varlığı orta parçanın en önemli özelliğidir. Bu kılıf aksonemin çevresini sarar. Spermin mitokondrisi diğer hücrelerin mitokondrisinden daha sağlam bir dış zar içermektedir. Bu nedenle deterjan etkisine ve ozmotik değişikliklere karşı güçlüdür ¹². Son parça ise fibröz kılıfın erken sonlanmasından ve yoğun liflerden dolayı kuyruğun en kısa parçasıdır ve sadece aksonema içerir ¹. Son parçada kalın

fibriller ve fibröz tabaka kaybolur. Aksonemin mikrotübüler yapısı sona erer
12.

Normal sperm başı yaklaşık olarak 4.5 µm uzunluğunda ve 3 µm genişliğindedir. Sperm başının fonksiyonları; DNA' yı içermesi, koruması ve fertilizasyon esnasında içeriğini oosite aktarmasıdır. Bütün memelilerde sperm başının görevinin aynı olmasına rağmen, hem nukleus hemde akrozomun bundan ötürü de sperm başının şekli ve boyutu farklıdır ve türe özgüdür ¹⁵. Plazma membranı, zona pellusidayı tanıma ve bağlanma ile ekzositotik akrozom reaksiyonu esnasında dış akrozomal membranla birleşmeyi sağlayarak iki önemli işlevde görev alır ve aynı zamanda plazma membranı sperm bölgesinin ön bölgesini çevreler ¹⁶.

2.1.7.Semen

Semen, olgun germ hücresi olan spermatozoonlar ile testis ile epididimisin salgısının ve ejakülasyon esnasında seminal vezikül, prostat ve bulboüretal bezlerinin salgılarının birleşmesiyle oluşur ¹⁷. Semen, vizkoz, mat, beyazımsı-gri bir renge sahiptir. Kendine özgü keskin bir kokusu vardır. Semen vücuttan atıldıktan sonra yaklaşık 15-20 dakika sonra bulanıklaşarak akışkan bir görünüm kazanır ¹⁸.

Semen analizi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen kriterlere göre yapılmaktadır ¹⁹. Bu kriterler şöyle listelenir:

Semen hacmi	: 1.5ml
Total sperm (10 ⁶ /ejekülat)	: 39 (33-46)
Sperm sayısı/ml (10 ⁶ /ml)	: 15 (12-16)
Total motilite (%)	: 40 (38-42)
Progresif hareketli (%)	: 32 (31-34)
Canlılık (vitalite) testi (%)	: 58 (55-63)
Normal morfolojide sperm (%)	: 4 (3.0-4.0)
pH ≥ 7.2	

2.2. İnfertilite

Korunmasız olarak cinsel ilişkiye girilmesine rağmen, bir yıldan sonra çocuk sahibi olamama durumuna infertilite (kısırlık) denir. Tüp bebek merkezlerine çocuk sahibi olmak için başvuran çiftlerde bazı araştırmalar yapılarak, çiftlerin infertilite nedenleri saptanmaya çalışılır. İnfertilitenin nedeni sonucunda gerekli durumlarda yardımcı üreme teknikleri (YÜT) kullanılır. İn vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yardımcı üreme teknikleri arasında yer alır.

İnfertilite, kadın veya erkek nedenli olabileceği gibi her ikisinden de kaynaklanabilir. Bireylerin ikisinde de sorun olmadığı halde gebelik gerçekleşmiyorsa buna açıklanamayan infertilite denir ²⁰.

2.2.1. Erkekte İnfertilite

Erkeğin infertilitesinin değerlendirilmesindeki en önemli başlangıç, semen analizidir ²¹. Semen analizi, ejakülatın değerlendirilmesine dayanır. Semen analizi için, incelenecek ejakülat en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrasında mastürbasyon ile steril bir kaba alınmalıdır. Cinsel perhiz süresi 7 günü geçmemelidir. Ejakülatın makroskobik muayenesinde, miktarı, likefaksiyon zamanı, görünümü, pH'ı ve viskozitesi değerlendirilir. Bu incelemede; sperm sayısı, hareketliliği, morfolojisi, yuvarlak hücre sayısı ve sınıflandırılması incelenir ²². Mililitredeki spermatozoa sayısına ve kalitesine göre ejakülat değerlendirilmesi yapılır ²³.

Azoospermia: Ejakülatta spermin olmaması

Normozoospermia: Normal semen

Hemospermia: Ejakülatta kan olması

Lökositospermia: Ejakülatta normalin üzerinde lökosit bulunması

Hipospermia: Ejakülat volümünün <1 ml olması

Hiperspermia: Ejakülat volümünün >6 ml olması

Oligozoospermia: Normalden az sperm konsantrasyonu (<20milyon/ml)
Polizoospermia: Normalden fazla sperm konsantrasyonu (>250 milyon / ml)
Astenozoospermia: Zayıf motilite (a+b) veya zayıf ileri doğru (a) hareketlilik
Teratozoospermia: Normal morfoloji yüzdesinin azalmış olması
Nekrozoospermia: Tüm spermlerin ölü olması
Globozoospermia: Yuvarlak başlı, akrozomsuz sperm hücrelerinin bulunması

2.3. Erkek İnfertilitesinde Sperm DNA Bütünlüğünün Rolü

DNA baz dizisinin replikasyon sırasında doğru dizilimle oluşması, yeni nesillere aktarılması açısından önemlidir. Bu nedenle DNA üzerinde oluşan hasarları onaran spesifik onarım sistemleri vardır. DNA hasarı düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından verimli bir şekilde onarılır. DNA bazlarının yapısında oluşan kimyasal değişimler replikasyon sırasında yanlış eşleşmeye ve sonuçta mutasyona neden olur. Radyasyonların iyonize edici etkisi ile oluşan radikaller nükleik asit baz modifikasyonlarını etkileyerek DNA'da hasara yol açarlar ²⁴. DNA şeker-fosfat iskeletinde oluşan kopmalar ise replikasyonun durmasına neden olurken hücreyi ölüme bile yönlendirebilir ²⁵. DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır ²⁶.

Erkek germ hücre hattındaki DNA hasarı iki tiptedir ²⁷:

- Replikasyon hataları
- DNA tek ve çift kırıkları ile oluşan DNA fragmantasyonu.

Nükleer DNA hasarının kaynağı hakkında üç teori mevcuttur. İlki matürasyon sırasında yanlış paketlenme ve ligasyonun hasara yol açtığıdır ²⁸. İkinci teori apoptosis mekanizmalarının fragmantasyona yol açması iken, üçüncü teori ise oksidatif stresin hasar kaynağı olduğudur ²⁹.

Spermatozoon DNA hasarı, fertilité potansiyeliyle negatif korelasyon gösterir. Normal testislerdeki germ hücreleri %5'ten daha az DNA zincir kırığına sahiptir ³⁰. DNA kırıklarının seviyeleri infertillerde fertillere göre daha yüksektir. Spermatozoon DNA hasarlarının infertilitedeki önemi çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir ³¹.

2.3.1. Spermatozoon DNA'sında Hasara Neden Olan Faktörler

Çeşitli nedenlerden dolayı spermatozoon DNA'sında farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. Örneğin; protamin eksikliği kromatin yoğunlaşmasını engellemekte, DNA'yı hasara açık hale getirmektedir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %5-15'lik bir bölümünde total protamin eksikliği bulunmaktadır ²⁸. Reaktif oksijen türleri (ROT), mitokondrilerde ATP üretimi sırasında metabolik yan ürün olarak oluşan sperm hücrelerinin hiperaktivasyonunda, kapasitasyonunda ve akrozom reaksiyonlarında fizyolojik role sahiptir. Ancak seminal plazmadaki miktarlarının artışı oksidatif hasara neden olmaktadır. Sperm hücreleri ROT'lerin indüklediği hasarlara çok duyarlıdır. Bunun sebebi plazma membranlarının yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşmasıdır ³².

Apoptozun da DNA hasarlanması ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Apoptoz ile ortaya çıkan germ hücre kaybı spermatogenez sırasında oluşan dominant bir süreçtir ve p53, p21, kaspaz, bc1-2 ve Fas düzeylerince değişik yollarla ayarlanır. Spermatogenez sırasında apoptozun çeşitli nedenleri vardır. Eğer spermatogonyum sayısı, sertoli hücrelerinin destek kapasitesini aşarsa, fazla hücreler apoptoz ile parçalanır. Testosteronun da apoptoza neden olabileceği düşünülmektedir ³³.

Hücre düzeyinde gerçekleşen fizyolojik olarak programlanmış hücre ölümü olan apoptoz sırasında hücrelerde, kromatin yoğunlaşarak çekirdek ve sitoplazma membranları kaynaşır. Sonuçta çekirdek fragmentasyona uğrar ve hücre apoptotik cisimlere dönüşür ³⁴. Yaşlanmaya paralel olarak DNA çift sarmalındaki hasar ile spermatozoondaki apoptozun

arttığı düşünölmektedir. Spermatogenez esnasında ve sonrasında hücre seçim sistemindeki yetersizlik sonucu bu artış oluşabilmektedir ³².

2.4.Sperm DNA Hasarını Belirleme Yöntemleri

Erkek infertilitesi tanı ve tedavisinde spermde DNA hasarının olup olmadığının değeriendirilmesi ayrı bir önem taşır ³⁵.

Spermde DNA hasarının belirlenmesi için çeşitli yöntemler vardır:

2.4.1. Toluidin Mavisı Boyaması (Toluidine Blue, TB)

Toluidin mavisı bazı nükleer bir boya olup, kromatin ve DNA yapısındaki fosfat kalıntılara bağlanır ³⁶. Zayıf spermatozoon bütönlüğünü ve şiddetli DNA hasarını gösterir. Bu boya DNA paketlenmesine hassas olduğu için kromatinin metakromatik boyanmasında kullanılır ³⁵.

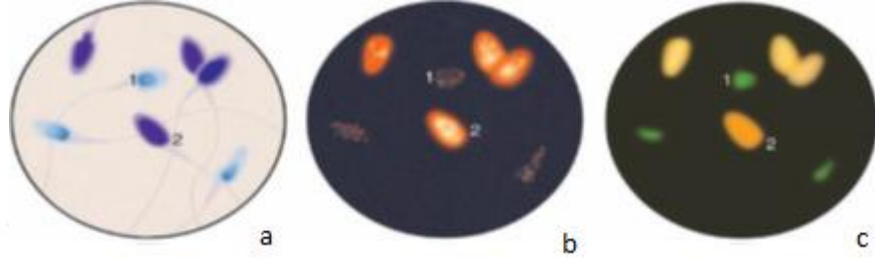
Toluidin mavisı ile kromatin yapısı sağlam sperm başları açık maviye boyanırken bütönlüğü bozulmuş kromatinler ise mora boyanır ³⁶.

2.4.2. DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence İn Situ Hybridisation) Yöntemi

Agaroz matriks içine hücreler gömölerek alkali solüsyona maruz bırakıldığında DNA iplikçığı çözölür. Nötralizasyon ve proteinlerin uzaklaştırılması sağlanarak, elde edilen tek iplikli DNA, bütün genom ya da spesifik DNA problemleriyle hibritlenerek floresan yoğunluğunda incelenir. Sperm hücrelerindeki anormal kromatin paketlenmesi DNA'yı alkali denatürasyonuna karşı daha duyarlı hale getirir, bu da floresan yoğunluğunu artırır ³⁷. Pahalı, zaman alıcı ve özel prosedürler gerektiren bir yöntem olduğu için klinik kullanımı azdır ³⁸.

2.4.3. Akridin Turuncu Testi (Acrydine Orange Test, AOT)

Akridin turuncu boyası, çift zincirli DNA'da iki zincir arasına girerek monomer oluştururken, tek zincirli DNA'da bir araya toplanarak agregat oluşturur ³⁹ (Şekil 5).



Şekil 5: a) Toluidine mavisi boyaması b) DBD-FISH yöntemi c) Akridin oranj boyaması ³⁵

2.4.4. Anilin Mavisi Boyaması (Anilin Blue)

Anilin mavisi, lizinden zengin histonlarla, arjinin/sistein zengini protaminlerin ayırımında kullanılan bir boyadır ³⁵. İmmatür spermlerdeki histon taşıyan nükleusların zengin lizin grupları ile reaksiyona girerek mavi renk oluşturur. Lizin miktarı az olan, bol miktarda protamin içeren matür spermatozoada mavi renk oluşmaz ⁴⁰.

2.4.5. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi

Guanin-sitozin spesifik DNA'da protoaminlerle aynı yere bağlanan bir florokromdur. Bu yüzden yüksek CMA3 floresansı, az protaminasyon düzeyini, dolayısı ile de gevşek paketlenmiş kromatin yapısını ifade eder ⁴¹.

2.4.6. İn Situ-Nick Translasyon (ISNT)Yöntemi

Bu yöntem biyotinlenen deoksiuridin trifosfatın (dUTP) tek iplikli DNA kırıklarında DNA polimeraz I enzimi tarafından kalıba eklenmesi

reaksiyonuna dayanır. Spermatozoonda, nükleer DNA'nın yeniden modellenmesi sırasında meydana gelen anomalileri gösterir ³⁵.

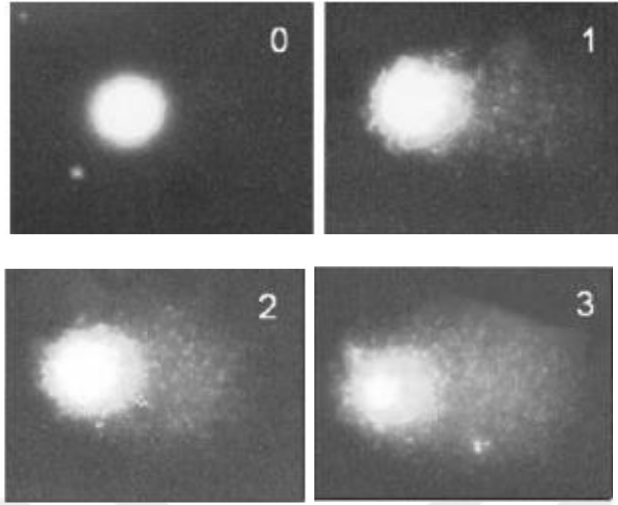
2.4.7. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (Sperm Chromatin Dispersion Test, SCD, HALOSPERM Testi)

Spermatozoon, liziz solüsyonundan önce asit solüsyonuyla muamele edilir ve fragmente olmayan DNA'lı spermatozoonda nükleer protein uzaklaştırılır. Bu işlemlerden sonra DNA dağılım haloları meydana gelir. Fragmente DNA'lı spermatozoonda bu halolar ya hiç yoktur ya da çok küçüktür ^{42, 43}. Halonun oluşması veya büyüklüğü DNA fragmentasyonunun olmadığını gösterir. Çünkü halonun bulunmaması ya da çapının çok küçük olması fragmentasyonun varlığını ifade eder ⁴⁴.

2.4.8. COMET (Cluster of Motifs E-value Tool) Yöntemi

Mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde kullanılan sitogenetik yöntemlerden biridir ⁴⁵.

COMET yönteminde; elektrik akımı uygulanması, kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanlarının, çekirdekten hızla göçünü sağlar. Kırık DNA'nın katottan anoda göçü floresans bir boya ile boyanarak görüntülenmiştir. Elektroforez işlemi sonunda hasarlı DNA çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız (comet) görüntüsünün oluşmasına neden olur. Bu nedenle hasarlı hücrelere "comet" adı verilir ⁴⁶ (Şekil 6).



Şekil 6: Görsel analiz ile comet skorlaması ⁴⁷

Comet testinin az sayıda hücre gerektirmesi, değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir hassas, kolay, hızlı ve ekonomik bir yöntem olmasının yanı sıra, çeşitli türlerde DNA hasarlarını tespit edebilir olması, en önemlisi tek hücre seviyesinde bilgi veriyor olması endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlenimleri DNA onarım ve hasarının temel mekanizması gibi çalışmalarda kullanılabilmesindeki avantajlarıdır ⁴⁸.

Süre, uygulanan voltaj gibi elektroforez şartları, tuz konsantrasyonu ve pH gibi lizis tamponunun parametreleri Comet tekniği etkileyen faktörlerdir. Kişiler arasında DNA hasarında değişiklik oluşturan faktörler; yaş, hava kirliliği, diyet, cinsiyet, sigara, güneş ışığına maruziyet, enfeksiyon ve meslek olarak sayılabilir ⁴⁵.

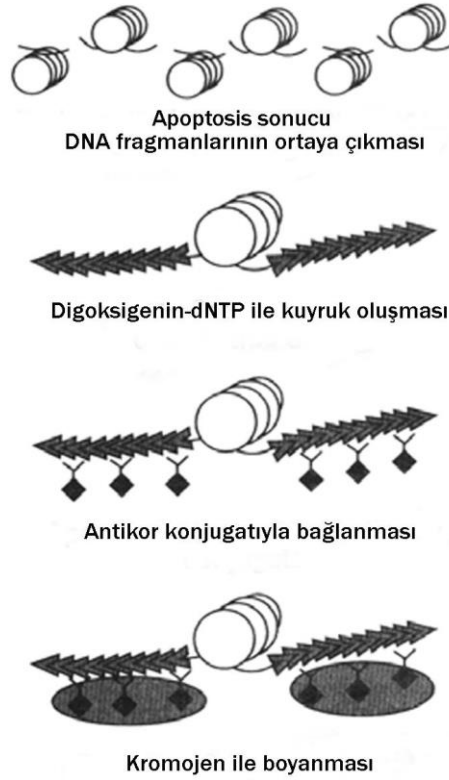
2.4.9.TUNEL (TdT-mediated-dUTP Nick End Labeling) Yöntemi

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transpherase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) metodu apoptoziste ortaya çıkan DNA fragmentasyonunu göstermenin bir yoludur. DNA

fragmentasyonundan kökenlenen serbest 3'OH uçları modifiye nükleotidlerle enzimatik olarak terminal deoksinükleotidiltransferaz (TdT) enzimi tarafından işaretlenir. Serbest uçlara TdT enzimi tarafından biyotinlenmiş uridin trifosfat (dUTP) bağlanır. Bu serbest uçlar çekirdeklerde ve apoptotik cisimciklerde bulunurlar. Bu yüzden bu yöntem, kromatin kondensasyonu oluşmuş ve DNA kırıkları bulunan erken evre apoptozise özgüdür ⁴⁹. TdT enzimi tek sarmallı ya da çift sarmallı DNA'nın 3'OH uçlarına serbest olarak eklenen nükleotid trifosfatları katalizler. Digoksinin-konjugat eklenmesiyle serbest olarak bulunan nükleotidler bir oligomer oluşturarak digoksinin ile konjuge olurlar. Sonrasında bu nükleotidlerin peroksidaz reaksiyonu verebilen anti-digoksinin antikoru ile bağlanması ve sonuçta 3'OH uçlarının spesifik boyanması sağlanır ⁵⁰ (Şekil 7).

Programlanmış hücre ölümü, normal spermatogenezin gelişimi ve kontrolü için gereklidir. Ancak ağır testiküler germ hücre apoptozu, yardımcı üreme tekniklerinden elde edilecek başarıyı düşürür. TUNEL tekniği apoptotik olduğuna inanılan semendeki sperm popülasyonunun tanımlanması için ilk defa Gorczya ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır ⁵¹.

TUNEL yöntemi ile sperm sayısı, motilitesi ve normal morfoloji yüzdesi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu korelasyonla TUNEL sonuçlarının prediktif etkinliğinin yüksek olabileceği, intrauterin inseminasyondaki (IUI) gebelik oranı, İn vitro fertilizasyonda (IVF) embriyo kalitesi, intra sitoplazmik sperm enjeksiyonunda ise (ICSI) fertilizasyon oranı hakkında fikir verebileceği ve tekrarlayan gebelik kayıplarına bir açıklama getirebileceği düşünülmektedir ⁵².



Şekil 7: TUNEL metodu şematik gösterimi ⁵³

2.4.10. Sperm Kromatin Yapı Analizi (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA)

Isı ya da asitle muamele ile DNA denatürasyonu metakromatik olarak değişen akrinin oranı boyaması ile flow sitometrik incelenmesi esasına dayanır. SCSA asit metot kullanımı daha kolaydır. Hasarlı DNA (tek zincirli DNA) kırmızı renkte floresan verirken, hasarlanmamış DNA (çift zincirli DNA) yeşil renkte floresan verir. SCSA'da tespit edilen DNA hasarı, DNA fragmentasyon oranı (DFO) ile belirlenir. DFO sınırı, fertil ve infertillerde genelde %30'dur ^{42,43}.

2.4.11. Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) Yöntemi

Spermatozoonda oksidatif DNA hasarı yan ürünü olan 8-hidroksideoksi guanozin (8-OHdG) seviyesi ölçümünü esas alan bir yöntemdir³⁵.

2.5. İnfertilite Tedavisinde Yardımcı Üreme Teknikleri

Son yıllarda çeşitli sebeplerle infertilite sorunu yaşayan çiftlerde tedavi yöntemi olarak yardımcı üreme tekniklerine başvurulmaktadır. Bunlar spontan olarak gebelik elde edemeyen çiftlere uygulanan yöntemlerdir. 1978 yılında ilk kez yardımcı üreme teknikleri ile gebelik sonucu bir bebek dünyaya gelmiştir. Erkek infertilitesi, açıklanamayan infertilite, endometriozis, polikistik over sendromu, immünolojik infertilite, uterin faktör, ileri anne yaşı gibi nedenler için farklı yardımcı üreme teknikleri kullanılır^{54,55}.

Tarihsel gelişim süreci içinde birçok yardımcı üreme tekniği tanımlanmış ve uygulanmıştır. Bu tekniklerden bazıları; İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi (IVF-ET), Gamet İntra Fallopiyan Transferi (GIFT), Zigot İntra Fallopiyan Transferi (ZIFT), Tubal Embriyo Transferi (TET), Kısmi Zona Diseksiyonu (PZD), Subzonal İnseminasyon (SUZI), İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)'dir⁵⁶.

2.5.1. İntra Uterin İnseminasyon (IUI)

Cinsel ilişki dışında bir yöntemle, erkekten alınan spermin laboratuvarında özel işlemlerden geçirilerek kadının ovülasyon döneminde üreme sistemi içerisine bırakılması yöntemi İntrauterin İnseminasyon (IUI) olarak adlandırılır⁵⁷.

Oositin overden direkt olarak alındığı yöntemler yardımcı üreme teknikleri tarafından kapsandığından yardımcı üreme teknikleri arasına dahil

edilemez. Overlerde olgun oositler içeren foliküller oluşturmak için, işlem öncesinde kadına folikülogenezisi sağlayan ilaçlar verilir ⁵⁸.

İntrauterin inseminasyonda alınan sperm, sayı ve hareketlilik oranlarının artırılması için çeşitli yıkama işlemlerinden geçirilerek çok az bir sıvı içinde konsantre edilir ^{58, 59}. Yıkanmış ejakülat, özel kanül ya da enjektör ile direkt olarak uterus içine verilir. İşlemler ağrılı değildir ve sonrasında istirahat gerektirmez ⁶⁰.

Erkeklerde yetersiz sperm miktarında, sperm motilitesi sorunu varlığında, kadında vaginal ya da servikal faktörler olduğunda veya çiftte açıklanamayan infertilite söz konusuysa, intrauterin inseminasyon (IUI) işlemi, başlangıç tedavisi olarak denir ^{58, 59}.

IUI işleminin başarısı; kadının yaşı, erkekte sperm morfolojisi, sperm sayısı veya sperm motilitesi gibi çeşitli parametrelere bağlıdır.

Inseminasyon zamanı da işlem başarısında oldukça önemli bir parametredir ve genellikle İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu (HCG) enjekte edilmesinden 34-38 saat sonradır ^{61, 62}.

Intrauterin inseminasyon dışında İntra Servikal İnseminasyon (ICI) da vardır. İntraservikal inseminasyonda hiçbir muameleden geçmemiş ejakülat, enjektör ya da özel kanül yardımı ile vajina ya da servikse bırakılmaktadır. Ancak bu yöntem günümüzde pek fazla uygulanmamaktadır ⁶⁰.

2.5.2. İn Vitro Fertilizasyon

Spermatozoon ve oositin laboratuvar ortamında bir kültür kabı içinde bir araya getirilerek, spermatozoonların kendi yetenekleri ile oositi döllemesi temeline dayanan bir yöntemdir ⁶³.

Günümüzde yerini mikroinjeksiyon işlemine bırakmasına rağmen daha az maliyetli, uygulamasının basit olması ve spermatozoonun herhangi bir işlem uygulanmadan oosite penetre olması daha avantajlı bir yardımcı yöntem olmasını sağlar ⁶⁴.

Son yıllarda embriyolar kültür ortamında beş gün bekletilerek blastosist safhasına geldikten sonra da transfer edilmeye başlanmıştır. Standart üç günlük embriyo transferi ile karşılaştırıldığında blastosist transferlerinin implantasyon oranları daha yüksek görülmektedir ⁶⁵. Bu yöntemde fertilizasyon oranı; sperm parametrelerinin düşük olması, normal morfolojinin %4'ün altına düşmesi ile azalır ⁶⁶. Erkek subfertilitesi de IVF ile fertilizasyon oranını düşürmektedir. Bu nedenle ve yeterli sayıda kaliteli embriyo elde etmek amacıyla daha etkin manipülasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar; Parsiyel Zona Disseksiyonu (PZD), Subzonal İnseminasyon (SUZI), İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) gibi tekniklerdir ⁵⁷.

2.5.3. İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

Mikropipet yardımıyla tek bir spermi, oosit zona pellusidasında bir delik açılarak buradan oosit sitoplazması içine verme işlemidir ⁵⁷. Bu yöntemde yumurta içerisine en iyi kalitede tek bir sperm aktarıldığı için çok düşük sperm sayılarında bile fertilizasyon gerçekleşebilmektedir ⁵⁶.

ICSI, erkekten kaynaklanan infertilite tedavisinde en çok tercih edilen mikromanipülasyon tekniğidir ⁶⁷. Birden fazla oosit elde etmek için, hastanın yaşına, eğer varsa önceki tedavilerine, oosit rezervine, FSH düzeyine göre özel bir indüksiyon uygulanır. Östrojen seviyesi uygun düzeye geldiğine ve oositler olgun büyüklüğe ulaştığında hastaya HCG enjekte edilir. HCG uygulamasından 36 saat sonra oositler toplanır ve daha sonra etraflarındaki kümülüs ve granüloza hücrelerinden arındırılan oositlerin olgun (Metafaz II) olanları spermatozoonlarla birleştirilir ³⁸.

IUI ve IVF'deki başarının önceden tahmin edilebilmesi ve hangi yöntemin kullanılacağına yardımcı olabilmek adına sperm kromatin yapısının değerlendirilmesi kullanılabilir. Örneğin eğer hastanın sperm parametreleri normal fakat hasarlı DNA oranı yüksekse IUI yerine ICSI önerilebilir ⁶⁸.

Aksine çalışmalarda ise ICSI olgularında eğer morfolojisi normal spermatozoon enjekte edilmişse, fertilizasyon ve gebelik oranlarının DNA hasarlı spermatozoon oranları ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir ³³.

2.6. Melatonin

Melatoninin gün içi değişimi göz önüne alındığında, kanda ve hücre içinde melatoninin gece konsantrasyonları gündüze nazaran 3-10 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Melatoninin salgılanması genelde akşam saat 21.00-22.00 saatlerinde başlar, 02.00-04.00 saatleri arasında ise maksimum seviyesine ulaşırken, sabah 07.00-09.00 arasında ise azalır. Salgılanma hızı ise; 29 mg/gün'dür ⁶⁹⁻⁷¹.

Yaşa göre incelendiğinde ise, hayatın ilk üç ayında melatonin düşükken, üç-altı ay arasında yükselmeye ve gece gündüz farklılığı oluşmaya başlar. Bir-beş yaşta nokturnal değer 250 pg/mL, 5-15 yaşta 65 pg/mL, 50-70 yaşta 20 pg/mL'dir. Gündüz değerleri 20 pg/mL civarındadır. Yetişkinlerde plazmada ortalama düzeyleri 50-70 pg/mL'dir ⁷⁰.

Melatoninin bazı toksinlerle oluşan oksidatif stres üzerinde önleyici etkisi vardır. Melatonin hem suda ve hem de lipid fazda çözünebilen bir özelliğe sahip olması, tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşmasını ve hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından korumasını sağlar. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasını sağlar. Melatonin hücre zarının dış yüzeyine bağlanarak radikalleri membrandan önce tutar ve onları detoksifiye ederek membranı korur ⁷².

Melatonin salınımının uyku üzerine etkisi total uyku süresinden çok, uykunun başlangıcı, kalitesi ve latent evresi ile ilgili olduğu ve bunu hipotermik etki sağladığı düşünülmektedir. Ancak Melatonin salgısı için uyku şart değildir, karanlık yeterlidir. Melatonin salınımı artışı, vücut ısısını düşürür ve bu da uyku hissi oluşturur, yani direkt hipnotik etkisi yoktur ⁷³.

Melatonin hücre zarının dış yüzeyine bağlanarak radikalleri membrandan önce tutar ve onları detoksifiye ederek membranı korur. Melatonin, prooksidatif aktivitesi olmayan ve kolayca oksitlenmeyen bir moleküldür. Ayrıca redoks döngüsüne ve radikal üreten reaksiyonlara girmez ⁷⁴.

Melatoninin üreme üzerinde mevsimsel etkisine bakıldığında; melatoninin uzun süreli ve yüksek düzeylerde bulunduğu dönemlerde yani uzun günlerde dölveren türlerin üremesi engellenirken, kısa günlerde dölveren türlerin üremesini uyardığı görülmüştür ⁷⁵. Sonuçları kesin olmamakla birlikte, melatoninin kadınlarda kontraseptif olarak tek başına ya da progestin ile birlikte verildiğinde dört ayın sonunda ovulasyonu inhibe ettiği görülmüştür. İnsanda bu uygulamaların fertilité için bir alternatif uygulama olduğu ileri sürülmektedir ⁷⁶. Melatoninin, ikizlik ve ovulasyon oranında artışa neden olduğu görülmüştür. Östrusların başarılı bir şekilde uyarabileceği, granüloza hücrelerdeki progesteron sentezini artırmasıyla bağlantılı olarak embriyonun yaşama şansını da artırdığı gözlemlenmiştir ⁷⁷.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada infertilite tanı ve tedavisi için Mikrojen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Laboratuvarları'na (Ankara) başvurmuş, toplam 130 erkek hastaya ait sperm örneğinin sayı, motilite, DNA fragmantasyon oranı verileri ve melatonin uygulaması ile bu verilerin değişimi incelenmiştir.

Çalışmada laboratuvar kayıtlarına göre; üç farklı grup kullanılmıştır:

Kontrol Grubu: Laboratuvara infertilite tanısı için başvurmuş hasta sperm örnekleri (N=45). Bu gruba ait sperm örneklerine melatonin uygulanmamış, yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm sayı ve motiliteleri incelenmiştir.

I. Grup: Laboratuvara infertilite tanısı için başvurmuş hasta sperm örnekleri (N=45). Bu gruba ait sperm örneklerine melatonin uygulanmış, melatonin inkübasyonu öncesi ve sonrası sperm sayı ve motiliteleri incelenmiştir.

II. Grup: Laboratuvara infertilite tedavisi için başvurmuş hasta sperm örnekleri (N=40). Bu gruba ait sperm örneklerinin önce sayısı, motilite oranları ve DNA Fragmantasyon Oranları (DFO) incelenmiş, melatoninin DNA hasarına etkisinin analiz edilebilmesi için örnekler daha sonra melatoninsiz ve melatoninli ortamlarda dört saat ve bir gece inkübe edildiğinde elde edilen DNA fragmantasyon oranları değerlendirilmiştir.

Çalışmada gruplardan elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirildi ve niceliksel verilerin normal dağılıma uygunluk göstermediği saptandı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma, frekans) yanı sıra niceliksel

verilerin iki grup arası değerlendirmelerde Mann Whitney U testi kullanıldı. Tekrarlayan ölçümlerin değerlendirilmesinde Friedman testi, farklılığa neden olan ölçümün tespitinde ise Wilcoxon İşaretili Sıralar testi kullanıldı. Niteliksel verilerin değerlendirilmesinde Continuity (Yates) Düzeltmeli Ki-Kare testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.



3. BULGULAR

Çalışmada kontrol grubu olarak belirlenen, melatonin uygulanmamış, sadece yıkama yapılmış olan hasta sperm örneklerinde (N=45), yıkama öncesi ve sonrası sperm sayı ve motiliteleri incelendiğinde aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Yıkama öncesi sperm sayıları 3 ile 170 milyon arasında değişmektedir. Ortalaması $55,27 \pm 36,56$ ve medyanı 53 milyon olarak hesaplanmıştır. Yıkama sonrasındaki sperm sayıları ise 4 ile 180 milyon arasında değişmekte olup, ortalaması $59,96 \pm 38,03$ milyon ve medyanı 58 milyondur (Tablo 1).

Yıkama öncesi sperm motilite oranları %10 ile %86 arasında değişmekte olup, ortalaması $58,44 \pm 17,22$ ve medyanı %62'dir. Yıkama sonrasında ise sperm motilite oranları %12 ile %90 arasında değişmekte olup, ortalaması $63,84 \pm 17,62$ ve medyanı %70 olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: Kontrol grubundaki örneklerin sayı ve motilite dağılımları (N=45).

Kontrol Grubu		Min-Maks	Ort±SS (Medyan)
Sperm Sayısı (Milyon)	Yıkama öncesi	3-170	55,27±36,56 (53)
	Yıkama sonrası	4-180	59,96±38,03 (58)
Sperm Motilitesi Oranı (%)	Yıkama öncesi	10-86	58,44±17,22 (62)
	Yıkama sonrası	12-90	63,84±17,62 (70)
		n	%

Ort: Ortalama

SS: Standart Sapma

Çalışmada I.grup olarak belirlenen hasta sperm örneklerinde (N=45), melatonin uygulaması öncesinde ve sonrasında sperm sayı ve motiliteleri incelendiğinde aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Örneklerin melatoninde inkübasyon öncesinde sperm sayıları 13 ile 200 milyon arasında değişmekte olup, ortalaması $82,51\pm 36,68$ ve medyanı 82 milyondur. İnkübasyon sonrasında ise sperm sayıları 13 ile 200 milyon arasında değişmekte olup, ortalaması $82,98\pm 37,22$ milyon ve medyanı 85 milyondur (Tablo 2).

Örneklerin inkübasyon öncesi sperm motilite oranları %40 ile %90 arasında değişmekte olup, ortalaması $75,87\pm 12,64$ ve medyanı %80'dir. İnkübasyon sonrasında ise sperm motilite oranları %45 ile %95 arasında değişmiş, ortalaması $78,29\pm 12,15$ ve medyanı %80 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: I. Çalışma grubundaki örneklerin sayı ve motilite dağılımları (N=45).

Çalışma grubu	Min-Maks	Ort±SS (Medyan)	
Sperm Sayısı (Milyon)	İnkübasyon öncesi	13-200	82,51±36,68 (82)
	İnkübasyon sonrası	13-200	82,98±37,22 (85)
Sperm Motilitesi Oranı (%)	İnkübasyon öncesi	40-90	75,87±12,64 (80)
	İnkübasyon sonrası	45-95	78,29±12,15 (80)
	n	%	

Ort: Ortalama

SS: Standart Sapma

Kontrol grubu ve I.gruptaki örnekler, yıkama veya melatoninde inkübasyonun sperm sayı ve motilitesine etkisinin belirlenebilmesi amacıyla, grup içi ve gruplar arası farklılıklar açısından istatistiksel olarak analiz edilmiş ve bulgular Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 3: Kontrol grubu ve I. Grup sperm örneklerinin grup içi ve gruplar arası değerlendirilmesi

Örnekler	İşlemler	Çalışma	Kontrol	Z	¹ p
		Grubu (n=45)	grubu (n=45)		
		Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)		
Sperm Sayısı (Milyon)	Yıkama/İnkübasyon öncesi	82,51±36,68 (82)	55,27±36,56 (53)	-3,433	0,001*
	Yıkama/İnkübasyon sonrası	82,98±37,22 (85)	59,96±38,03 (58)	-2,864	0,004*
	Fark	0,47±2,77 (0)	4,69±4,67 (5)	-6,592	0,001*
	Z	-1,325	-5,342		
	² p	0,001*	0,001*		
Sperm Motilitesi Oranı (%)	Yıkama/İnkübasyon öncesi	75,87±12,64 (80)	58,44±17,22 (62)	-5,289	0,001*
	Yıkama/İnkübasyon sonrası	78,29±12,15 (80)	63,84±17,62 (70)	-4,327	0,001*
	Fark	2,42±3,96 (2)	5,40±2,61 (5)	-4,867	0,001*
	Z	-4,371	-5,860		
	² p	0,001*	0,001*		

¹Mann Whitney U Test

²Wilcoxon İşaretili Sıralar Testi

*p<0,05

Çalışmada II. Grup olarak belirlenen hasta sperm örneklerinde (N=40), sperm sayı, motiliteleri ve DNA fragmentasyon oranları incelendiğinde aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Sperm sayıları 0,4 ile 150 milyon arasında değişmekte olup, ortalaması 54,14±38,00 milyon ve medyanı 51,5 milyondur. Sperm motilite oranları ise %14 ile %76 arasında olup, ortalaması %50,73±15,01 ve medyanı %54'tür (Tablo 4).

II. Gruptaki sperm örnekleri, DNA fragmentasyon oranları açısından değerlendirildiğinde; başlangıçtaki DNA fragmentasyon oranlarının %5 ile %25 arasında değiştiği, ortalamasının %12,64±4,80 ve medyanının %11 olduğu görülmüştür. Melatoninsiz ortamda 4 saat bekletilmiş örneklerde DNA fragmentasyon oranları %5 ile %26 arasında olup, ortalaması %14,55±4,96 ve medyanı %13'tür. Melatoninli ortamda 4 saat bekletilmiş örneklerde DNA fragmentasyon oranları ise %6 ile %38 arasında değişmiş, ortalaması %20,15±6,61 ve medyanı %19 olarak belirlenmiştir. Melatoninsiz ortamda 1 gece bekletilmiş sperm örneklerinde DNA fragmentasyonu %5 ile %42 arasında değişmekte olup, ortalaması %23,53±7,78 ve medyanı %22,5'tir. Melatoninli ortamda 1 gece bekletilmiş spermelerde ise DNA fragmentasyon oranları %6 ile %25 arasında olup, ortalaması %13,35±4,89 ve medyanı %12 olarak görülmüştür (Tablo 4).

Tablo 4: II. Grup sperm örneklerinin sayı ve motiliteleri ile birlikte farklı zaman ve farklı özellikteki ortamlardaki DNA fragmentasyon oranlarının dağılımı (N=40).

Örnekler	İşlem zamanları	Min-Maks	Ort±SS (Medyan)
Sperm Sayısı (Milyon)	Başlangıç	0,4-150	54,14±38,00 (51,5)
Sperm Motilitesi Oranı (%)	Başlangıç	14-76	50,73±15,01 (54)
	Başlangıç	5-25	12,64±4,80 (11)
	Melatoninsiz ortamda		
	4 saat bekletme	5-26	14,55±4,96 (13)
	Melatoninli ortamda		
	4 saat bekletme	6-38	20,15±6,61 (19)
DNA Fragmentasyon Oranı (%)	Melatoninsiz ortamda		
	1 gece bekletme	5-42	23,53±7,78 (22,5)
	Melatoninli ortamda		
	1 gece bekletme	6-25	13,35±4,89 (12)

II. Gruptaki sperm örnekleri için melatoninsiz ortamlarda başlangıçtaki, 4 saat ve 1 gece bekletmeye bağlı DNA Fragmantasyon Oranlarının istatistiksel karşılaştırması Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5: Melatonin uygulanmayan örneklerin farklı zamanlardaki DNA fragmantasyon oranlarının değerlendirilmesi

Melatoninsiz	Başlangıç	4 saat bekletme	1 gece bekletme	χ^2	p
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)		
DNA	12,64±4,80	14,55±4,96	23,53±7,78	57,035	0,001*
Fragmantasyon	(11)	(13)	(22,5)		
Oranı (%)					
		Başlangıç-4 saat bekletme		-3,023	0,001*
		Başlangıç-1 gece bekletme		-5,165	0,001*
		4 saat bekletme-1 gece bekletme		-5,285	0,001*
χ^2 : Friedman Testi		Z: Wilcoxon İşaretili Sıralar Testi		*p<0,05	

II. Gruptaki sperm örnekleri için melatoninli ortamlarda başlangıçtaki, 4 saat ve 1 gece bekletmeye bağlı DNA fragmantasyon oranlarının istatistiksel karşılaştırması ise Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6 : Melatonin uygulanan örneklerin farklı zamanlardaki DNA fragmantasyon oranlarının değerlendirilmesi

Melatoninli	Başlangıç	4 saat bekletme	1 gece bekletme	χ^2	p
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)		
DNA	12,64±4,80	20,15±6,61	13,35±4,89	53,603	0,001*
Fragmantasyon	(11)	(19)	(12)		
Oranı (%)					
		Başlangıç-4 saat bekletme		-5,271	0,001*
		Başlangıç-1 gece bekletme		-2,031	0,042*
		4 saat bekletme-1 gece bekletme		-5,378	0,001*
χ^2 : Friedman Testi		Z: Wilcoxon İşaretili Sıralar Testi		*p<0,05	

II. Gruptaki sperm örneklerinin melatoninsiz ve melatoninli ortamlarda 4 saat ve 1 gece bekletmeye bağlı DNA Fragmantasyon Oranları istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve bulgular Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Melatonin uygulanan ve uygulanmayan sperm örneklerinin farklı zamanlardaki DNA fragmantasyon oranlarının değerlendirilmesi.

		Melatoninsiz	Melatoninli		
		Ort±SS	Ort±SS	Z	p
		(Medyan)	(Medyan)		
DNA Fragmantasyon Oranı (%)	4 saat	14,55±4,96	20,15±6,61	-5,171	0,001*
	bekletme	(13)	(19)		
	1 gece	23,53±7,78	13,35±4,89	-5,295	0,001*
	bekletme	(22,5)	(12)		

4. TARTIŞMA

Normal doğurgan çiftlerde, normal bir sıklıktaki cinsel ilişki durumunda gebe kalma oranı %25'tir. Bu oran 1 yıl sonunda %85 iken, 2 yıl sonra %90 civarındadır. Düzenli ve korunmasız bir cinsel ilişkiye rağmen, bir yıl içerisinde gebelik oluşmaması durumuna infertilite denir. Gelişmiş ülkelerde infertilite sorunu %38 oranında kadına, %28 oranında erkeğe ve %35 oranında da her iki bireye bağlıdır ⁷⁸.

İnfertilite tanısı konulan çiftlerde, doğal yolla oluşamayan fertilizasyon invitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyon (ICSI) gibi yardımcı üreme teknikleri ile gerçekleştirilmektedir ⁷⁹. Bu tekniklerin başarısının artırılması için spermlerin yıkanması, melatoninin hormonu ilavesi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Bu çalışmada melatoninin insan sperm hücresi fonksiyonu ve DNA hasarı üzerine etkisinin in vitro fertilizasyon açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada infertilite tanısı ve tedavisi için Mikrogen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Laboratuvarları'na (Ankara) başvurmuş, toplam 130 erkek hastaya ait sperm örneğinin sayısı, motilite, DNA fragmentasyon oranı verileri ve melatonin uygulaması ile bu verilerin değişimi araştırılmıştır.

Çalışmada laboratuvar kayıtlarına göre; üç farklı grup kullanılmıştır:

Kontrol Grubu: Laboratuvara infertilite tanısı için başvurmuş hasta sperm örnekleri (N=45). Bu gruba ait sperm örneklerine melatonin uygulanmamış, yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm sayısı ve motiliteleri incelenmiştir.

I.Grup: Laboratuvara infertilite tanısı için başvurmuş hasta sperm örnekleri (N=45). Bu gruba ait sperm örneklerine melatonin uygulanmış, melatonin inkübasyonu öncesi ve sonrası sperm sayısı ve motiliteleri incelenmiştir.

II. Grup: Laboratuvara infertilite tedavisi için başvurmuş hasta sperm örnekleri (N=40). Bu gruba ait sperm örneklerinin önce sayısı, motilite oranları ve DNA Fragmentasyon Oranları (DFO) incelenmiş, melatoninin DNA hasarına etkisinin analiz edilebilmesi için örnekler daha sonra melatoninsiz ve melatoninli ortamlarda dört saat ve bir gece inkübe edildiğinde elde edilen DNA fragmentasyon oranları değerlendirilmiştir.

Çalışmadaki Kontrol grubu ve I. Grup için sperm sayı ve motiliteleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2010 yılında yayınlanan 'İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi ile ilgili Laboratuvar El Kitabı'nda verilen değerlerle karşılaştırılmıştır¹⁹. WHO'nun kriterlerine göre toplam sperm sayısının 33-46 milyondan (ortalama 39 milyon) fazla, sperm motilitesinin ise %38-42 (ortalama %40) olması verimli dölleme için yeterlidir.

Kontrol grubunda yıkama öncesi sperm sayısı ortalama 53 milyon olup, yıkama sonrasında sperm sayısı ortalaması da 58 milyondur. Sperm motilite oranı, yıkama öncesi ortalama %62, yıkama sonrası ise ortalama %70 olarak görülmüştür (Tablo 1). Çalışmamızdaki kontrol grubunun ortalama sperm sayısı ve motilitesinin, verimli dölleme için WHO'nun kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir.

I. gruptaki sperm örneklerinin sayısı, melatoninde inkübasyon öncesinde ortalama 82 milyon, inkübasyon sonrasında ise ortalama 85 milyon iken, sperm motilite oranı melatoninde inkübasyon öncesi ortalama %80, inkübasyon sonrasında ise %80'dir (Tablo 2). Bu gruptaki sperm motilitesi de WHO'nun kriterlerine uygun olarak görülmektedir.

Kontrol grubu ve I.gruptaki örneklerde, yıkama veya melatoninde inkübasyonun sperm sayı ve motilitesine etkisinin istatistiksel olarak incelendiği Tablo 3'te görüldüğü üzere, I. Gruptaki örneklerin yıkama/inkübasyon öncesi ve sonrası sperm sayıları, Kontrol grubundan

daha yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,05$). Kontrol ve I. Grubun her ikisinde de yıkama/inkübasyon öncesine göre yıkama/inkübasyon sonrası sperm sayılarında anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$). Fakat kontrol grubundaki artış miktarı, I. gruptakinden yüksek olarak belirlenmiştir. Bu durum, yıkama/melatoninde inkübasyonun sperm sayısını arttırmada etkili olduğunu göstermektedir.

I. gruptaki örneklerin yıkama/inkübasyon öncesi ve sonrası sperm motilite oranlarının, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Kontrol grubu ve I. gruptaki örneklerin her ikisinde de yıkama/inkübasyon öncesine göre yıkama/inkübasyon sonrası sperm motilite oranlarında anlamlı düzeyde bir artış olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Fakat kontrol grubundaki artış miktarı, I.gruptaki artıştan anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,05$). Bu durum, yıkama/melatoninde inkübasyonun sperm motilitesini arttırmada etkili olduğunu göstermektedir.

Leon ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada melatonin uygulamasının sperm sayılarının yüksek olmasını tetiklediği ifade edilmiştir⁸⁰. Bu çalışmanın bulguları tez çalışmasından elde edilen verilerle örtüşmektedir.

Benzer bir çalışma olan; Du Plessis ve çalışma ekibinin (2010), melatoninin insan sperm fonksiyonları üzerine yaptıkları çalışmada belirli molaritede melatonin inkübasyonu sonucu motilitenin melatonin uygulanan ve uygulanmayan grup arası fark olduğu, bu farklılığın hem hareketli hem statik hücrelerde aynı şekilde sonuç verdiği gözlemlenmiştir⁸¹.

Ortiz ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında da yarım saat 1mM melatonin uygulama sonrası sayı olarak değişiklik olmasa bile, motilitenin arttığı ve statik yani hareketsiz spermilerin melatonin uygulaması sonrası hareketlendiği gözlemlenmiştir (melatoninin mitokondri üzerindeki etkisi)⁸².

Succu ve arkadaşları da (2011) in vitro çalışmalarında melatonin uygulamasının, sperm hiperaktivitesini ve kapasitesini düzenlediğini kanıtlamışlardır ⁸³.

Karimfar ve arkadaşları (2015) İran popülasyonunda yaptıkları araştırmada, bu çalışmada elde edilen bulgularla aynı sonucu veren, melatonin ile inkübe edilmiş spermlerin yıkama sonunda elde edilen sayılarındaki oranın arttığını bildirmişlerdir ⁸⁴. Çalışmamızdaki sonuçlarda da inkübasyon sonrası sperm sayısının artışı gözlenmektedir.

Çalışmanın II. Grubu, sperm sayısı ve motilitesi açısından değerlendirilerek WHO kriterleri ile karşılaştırıldığında, Tablo 4'te verilen sperm sayılarının (0,4-150 milyon, ortalama 54 milyon) ve sperm motilite oranlarının (%14-76, ortalama %51), verimli dölleme için WHO kriterlerini karşılamakta olduğu görülmüştür.

II. Gruptaki sperm örnekleri melatoninsiz ortamda DNA Fragmentasyon Oranları açısından farklı zamanlarda (başlangıç, 4 saat ve 1 gece bekletme) incelendiğinde (Tablo 5), melatonin uygulanmayan örneklerde başlangıçtaki, 4 saat bekleme ve 1 gece bekleme sonrasındaki DNA fragmentasyon oranlarında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Farklılığın hangi zamandan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili post hoc karşılaştırmalar sonucunda; başlangıca göre 4 saat bekletme ve 1 gece bekletme sonrası DNA fragmentasyon oranlarındaki artış önem taşımaktadır ($p<0,05$). 4 saat bekletme sonrasındaki DNA fragmentasyon oranlarında görülen artışın 1 gece bekletme sonrasına göre daha yüksek olarak ortaya çıkması da önemlidir ($p<0,05$). Bu durum, DNA örneklerinin doğal koşullar altında bozulduğunu, zamanla bu bozulmanın hızlandığını göstermektedir.

II. Gruptaki sperm örnekleri melatoninli ortamda DNA Fragmentasyon Oranları açısından farklı zamanlarda (başlangıç, 4 saat ve 1

gece bekletme) incelendiğinde (Tablo 6), melatonin uygulanan örneklerde başlangıçtaki, 4 saat bekleme ve 1 gece bekleme sonrasındaki DNA fragmentasyon oranları arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Farklılığın hangi zamandan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili post hoc karşılaştırmalar sonucunda; başlangıca göre 4 saat bekletme ve 1 gece bekletme sonrası DNA fragmentasyon oranlarında görülen artışın anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Fakat 4 saat bekletmeye göre 1 gece bekletme sonrasında DNA fragmentasyon oranlarında görülen azalmanın istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği de görülmektedir ($p<0,05$). Bu durum, melatoninde inkübe edilen sperm örneklerinde DNA fragmentasyon oranlarındaki değişimin etkisinin zamana bağımlı olduğunu, 4 saat melatoninde bekletilen sperm örneklerinde DNA fragmentasyonunun arttığını, ancak 1 gece melatoninde bekletilen sperm örneklerinde DNA fragmentasyonunun azaldığını göstermiştir.

II. Gruptaki sperm örneklerinin melatoninsiz ve melatoninli ortamlarda 4 saat ve 1 gece bekletmeye bağlı DNA Fragmentasyon Oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 7), melatoninde bekletilmiş örneklerin 4 saat bekletme sonrasındaki DNA fragmentasyon oranlarının, melatoninsiz örneklerdeki DFO'dan daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Melatoninsiz örneklerin ise 1 gece bekletme sonrasındaki DNA fragmentasyon oranları, melatoninli örneklerden anlamlı düzeyde daha yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,05$). Bu durum; 4 saat gibi kısa bir süre melatonin ile muamelenin DFO'yu arttırdığını, dolayısıyla DNA'yı korumadığını, ancak spermleri 1 gece gibi uzun bir süre melatoninde bekletmenin DFO'yu azaltmada etkili olduğunu, dolayısıyla DNA'yı fragmentasyonun etkilerinden koruduğunu göstermektedir.

Melatonin hormonu hem yağda hem de suda çözünebilir özelliğe sahip olduğu için, nükleus dahil olmak üzere hücrenin her organeline ulaşabilir. DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında melatoninin bu özelliği önemlidir ⁸⁵. Ortiz ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında spermlere

melatonin inkübasyonu sonucunda TUNEL metodu uygulayarak apoptozis ve DNA fragmentasyonunun inhibe edildiği görülmüştür ⁸⁶. Tez çalışmasından elde edilen verilere göre de başlangıçtaki DFO oranı 4 saat sonra melatoninsiz ortamda artış göstermiştir. Melatoninli ortamda 4 saat bekletmede ise daha fazla artış göstermiştir. Fakat melatoninli ortamda bir gece bekletilmiş örneklerdeki DFO, melatoninsiz ortamda bir gece bekletilen örneklerinkinden azdır. Yani melatoninde uzun süre bekletmek DFO'yu azaltıcı etki göstermiştir.

Bu konuda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, ejakülasyondan sonra, örnekler suni dölleme için ele alındığında sperm DNA fragmentasyon oranı hızla değişebilir. Memeli türlerinde, sıcaklık değişim bölgeleri sperm DNA degradasyonunu (hasarını) artırır. 37°C'de uzun saatler sperm inkübasyonundan sonra, bazal değerler artma eğilimindedir. Böylece sperm DNA parçalanması, türler arası ve türler içi farklı bireylerde semenden elde edildiğinde zamanla artacaktır. Fertiliği kanıtlanmış insan donörlerinde, en yüksek sperm DNA hasar oranı artışı, IVF durumları altında ilk dört saat 37°C' de inkübasyonda gözlenmiştir. Bu saatte %8,3 fragmentasyon hızını verir. Geçmiş çalışmalarda gösterilmiştir ki, bir grupta 14 hastadan seçilen ve 0, 4 ve 24 saat 37°C' de insan tubal fluid (HFT) medium içinde inkübe edilen sperm örneklerinde de nova canlılık kaybı, propidium iodide-pozitif hücreler ve TUNEL assayi ile değerlendirilmiş, DNA hasarı arasında korelasyon bulunmuştur. Genellikle durum buysa, sperm DNA fragmentasyonunda daha az çeşit olmalıdır. Çünkü DNA parçalanması canlılık verilerinden sonuçlandırılmalıdır ⁸⁶.

Spermatozoondaki DNA hasarı; apoptozis erken embriyo fragmentasyonu ya da daha sonra düşüklere (abort) sonuçlanabilir ⁸⁷. Bu sebeple üremeye yardımcı tekniklerde spermelerde DNA hasarları araştırılarak, döllemenin verimliliği arttırılmaya çalışılır. Üremeye yardımcı tekniklerde DNA hasarı SCSA testi kullanıldığında %30, TUNEL testi kullanıldığında ise %12'den fazlaysa IUI ile fertilizasyon oranı neredeyse

sıfırdır. Bazı alışmalar sperm DNA hasarı ile IVF/ICSI sonuçları arasında bir ilişki bulunmadığını söylese de, yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda IVF sikluslarında embriyo kalitesi ve blastosist gelişimi ile sperm DNA hasarı arasında anlamlı bir negatif ilişkinin olduğunu göstermektedir ⁶⁸. Hem IVF hem de ICSI sikluslarında sperm DNA hasarı ile fertilizasyon oranı arasında negatif bir ilişkinin olduğunu bildiren görüşler de bulunmaktadır ^{88, 89}.



5. SONUÇ

Semen ile ilgili parametrelerin incelenmesi, infertilite tanısında ve tedavi yöntemlerinin hangisinin seçileceği ile ilgili karar vermede büyük önem taşır. Bu sebeple laboratuvarda yapılan çeşitli işlemlerle sperm sayı ve motilitesinin artırılabilmesi mümkündür. Bu amaç için yıkama solüsyonuyla spermlerin yıkanması sağlanır veya melatoninde inkübasyon uygulanır, böylece hareketli spermler seçilerek sperm kalitesi, dolayısıyla da döllemenin kalitesi artırılır.

Bu çalışmada yıkama işleminin ve melatonin uygulamasının sperm sayısını ve motilitesini arttırmada etkili olduğu gözlenmiştir.

Spermlerde DNA fragmentasyon oranları da çeşitli yöntemlerle ölçülerek infertilite tanısı ve tedavisi hakkında fikir verir. Laboratuvarda melatonin uygulamasının spermde DNA hasarını azalttığı yönünde çalışmalar literatürde görülmüş, bu çalışmada melatonin uygulamasının DNA Fragmentasyon Oranına etkisi araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular, literatürdeki görüşleri desteklemektedir. Sonuç olarak, melatoninli ortamda (0-4 saat) DFO zamanla artmaktadır. Ancak melatoninde uzun süre bekletmek DFO'yu azaltıcı yönde etki göstermektedir. Dolayısıyla yardımcı üreme tekniklerinde spermlerde DNA hasarlarının azaltılması amacıyla örneklerin uzun süre melatoninde inkübasyonu, tekniğin başarısı açısından yararlı olacaktır.

7. ÖZET

MELATONİNİN İNSAN SPERM HÜCRESİ FONKSİYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO FERTİLİZASYON AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Erkeklerde infertilite tanısının konulması için semen analizi yapılarak sperm sayısı ve motilitesi gibi özellikler incelenir. Verimli dölleme için yeterli sayı ve motilitede sperm olmaması halinde laboratuvarlarda çeşitli işlemlerle sperm sayısı ve motilitesi arttırılmaya çalışılır. Sperm sayısının ve motilitesinin verimli dölleme için yeterli olması halinde sperm DNA'sının fragmantasyon oranı (DFO) ölçülür, infertilite sebebiyle ilgili bilgi edinilmeye çalışılır ve infertilite tanısı konulan çiftlere uygun yardımcı üreme teknikleri kullanılarak çiftlerin bebek sahibi olması sağlanır. Bu çalışmada melatoninin insan sperm hücresi fonksiyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Ankara Mikrogen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Laboratuvarlarına infertilite tanısı veya tedavisi amacıyla başvuruda bulunmuş ve örnekleri daha önce incelenmiş 130 erkek hastanın sperm sayısı ve motilitesi, DNA hasar oranları, melatonin uygulamasının bu faktörler üzerine etkileri; istatistiki açıdan değerlendirilmiş, veriler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sonuç olarak, yıkama işleminin ve melatonin uygulamasının sperm sayısını ve motilitesini arttırmada etkili olduğu gözlenmiştir. Melatonin uygulamasının DNA fragmantasyon oranına etkisi incelendiğinde ise, melatoninde bekletmenin, melatoninsiz ortamda bekletmeye göre DFO'yu arttırdığı, ancak melatoninde uzun süre bekletmenin DFO'yu azalttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, DFO, ICSI, İnfertilite, IVF.

8. SUMMARY

THE EFFECTS OF MELATONIN ON HUMAN SPERM FUNCTION AND DNA FRAGMENTATION FROM THE POINT OF IN VITRO FERTILIZATION

Semen analysis is the first step in the diagnosis of male infertility, therefore sperm parameters such as sperm count, motility and structure are examined. In case of low sperm quantity and quality, the sperm count and motility are tried to be increased via sperm washing or melatonin incubation. If sperm quantity and quality are adequate for fertilization, then the rate of sperm DNA fragmentation is measured. Thus the cause of infertility might be revealed and infertile couples are provided having successful pregnancies by use of appropriate assisted reproductive techniques. This study aims to evaluate the effect of melatonin on human sperm function and DNA fragmentation. In accordance with this purpose, sperm parameters of 130 male patients who were applied for infertility diagnosis and treatment to Ankara Mikrogen Genetic Diagnostic Center were analyzed and statistically evaluated. As a conclusion it is revealed that sperm washing and melatonin treatment are efficient at increasing the sperm count and motility. When the effect of melatonin treatment in DNA fragmentation is analyzed, it is showed that melatonin incubation increases sperm DNA fragmentation, but incubation at a long period of time -even overnight in melatonin- decreases DNA fragmentation.

KEY WORDS: Melatonin, DFO, ICSI, Infertility, IVF.

9. KAYNAKLAR

1. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. baskı. Malatya: Medipress Yayıncılık Tic. Ltd. Şti.; 2009
2. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Oestrogenic, anti- oestrogenic and anti-fertility activities of various compounds. Journal of Reproduction Fertility, Human Reproduction Update, 2006;12(3): 275–282
3. Russell LD, Griswold Md. The Sertoli Cell. USA: Cache River Pres; 1993.
4. Aydın ÇY. Deneysel Testis Torsiyonunda Doku Hasarının Önlenmesinde N-Asetilsisteinin Rolü. Uzmanlık Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi; 2005.
5. Aytekin Y, Solakoğlu S. editörler. Temel Histoloji. 10. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.
6. Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
7. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. Biol Reprod. Mar, 2003; 68(3):1064-71.
8. Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, Schoenfeld HA. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. Proc Soc Exp Biol Med. 2000; 225(2): 105-15.
9. Dellmann HD, Brown EM. Textbook of Veterinary Histology. Third Edition. Wiley-Blackwell: The Laboratory Rat, Academic Press; 2000.
10. Farrell, KW. Purification and reassembly of tubulin from outer doublet microtubules. Methods Cell Biol, 1982; 24: 61-78.
11. Moore KL, Agur AML. Temel Klinik Anatomi. Elhan, A (Çev), 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi; 2006.

12. Grudzinskas GJ, Yovich JL. Gametes- The Spermatozoon III. Chapter Sperm- structure and function. England: Cambridge University Press; 1995.
13. Curry MR, WP. Sperm structure and function, in Gametes- the spermatozoon. England: Cambridge University Press; 1995.
14. Bedford JM, HD. The Mammalian Spermatozoan: Morphology, Biochemistry and Physiology, In: Lamming GE (ed) Marshall's Physiology of Reproduction; 1990: Edinburg: Churchill Livingstone. p. 379-568.
15. Siegel MS et al. Partial purification and characterization of human sperminogen. Biol Reprod 1987; 36(4): p. 1063-8.
16. Elgavish S, Shaanan B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. Trends Biochem Sci 1997. 22(12): p. 462-7.
17. Anafarta K, Bedük Y, Temel Üroloji. 4. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi,1999.
18. Kadioğlu A. Editör. WHO Laboratuvar el kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. 5. Baskı. İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2010.
19. Özçınar E. Semen Analizi: Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Spermiyogram. İzmir Üniversitesi Tıp Dergisi. 2014; 1: 48-51.
20. Vicdan K, Isık AZ. İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Ankara: Çağdas Medikal Kitapevi, 1999.
21. Whitman-Elia GF, Baxley EG. A primary care approach to the infertile couple: Clinical review. J Am Board Fam Pract 2001; 14:33-45.
22. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for semen characteristics. Hum Reprod Update 2010;16(3):231-45.
23. Makler A. The improve ten mikrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. Fertil Steril 1980; 33(3):337-338.

24. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı. Konya: Mimoza Yayınları; 1995.
25. Johnson RT, Collins AR, Squires S, Mulliner AM, Eliot GC, Downes CS, et al. DNA Repair under stress. J Cell Sci 1987; 6(Suppl): 263-88.
26. Ravanat JL, Guicherd P, Tuce Z, Cadet J. Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine. Chem Res Toxicol 1999; 12:802-808.
27. Aktan G, Şanlı Ö, Kadioğlu A. Sperm kromatin hasarının tespit edilmesinde kullanılan yöntemler. Androloji Bülteni 2007; 19: 305- 8.
28. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. CMAJ 2006; 175: 495- 9.
29. Leventerler H. Fertil ve infertil Semen Örneklerinde Enerji Üretiminde Görev Alan Bazı Sitozolik ve Mitokondriyal Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması. Doktora Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi, 2005.
30. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal Nuclear Determinants of Reproductive Outcome: Applications For ART Hum Reprod Update 2005; 11(4):337–349.
31. Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. Asian J Androl 2004; 6:139-48.
32. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl 2010; 21: 33-44.
33. Vinatier D, Dufour P, Subtil D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1996; 67: 85- 102.
34. Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, Singh N. P. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. J Androl 2006.
35. Agarwal A, Said TM, Gardner DK. Textbook of assisted reproductive techniques (online). 2004 [cited 2015 May 2]. Available from: URL:

http://www.clevelandclinic.org/reproductiveresearchcenter/docs/agrac_h016.pdf).

36. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa E, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl* 2001; 22: 45- 53.
37. Fernandez JL, Vazquez-Gundin F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, de la Torre J, Gosalvez J. DNA breakage detection- FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res-Fund Mol M* 2000; 453: 77- 82.
38. Agarwal A, Erenpreiss J, Sharma R. Sperm chromatin assessment. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Eds. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*. 3rd edition, India: Replika Pres Pvt Ltd 2009: 67- 84
39. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996; 66: 634- 9.
40. Hammadeh ME, Zeginiadev T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* 2001; 46: 99- 104.
41. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52: 864- 7.
42. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes CV ve ark. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm dna fragmentation. *J. Androl* 2003; 24:1.
43. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of Chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006;(1):27.

44. Ankem MK, Mayer E, Ward WS, Cummings KB, Barone JG. Novel assay for determining DNA organization in human spermatozoa: implications for male factor infertility. *Urology* 2002; 59: 575- 8.
45. Bilgici, B: Behçet Hastalığında Genotoksisite. Uzmanlık Tezi. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2005.
46. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi, H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206-221.
47. Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Awadhesh NJ. Comet assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology* 2007; 25: 53-64.
48. Hartmann A, Agurell A, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins AR, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay *Mutagenesis* 2003; 18(1): 45-51.
49. Fejes I, Závaczki Z, Szöllosi J, Koloszar S, Daru J, Kovács L, Pál A. Is there a relationship between cell phone use and semen quality? *Arch Androl* 2005; 51:385–393.
50. Larsen WJ. *Human Embryology*. Second Edition. New York: Churchill Livingstone; 1997, s.373-388.
51. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; 53: 1945- 51.
52. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003; 49: 49- 55.
53. Ahlbom A, Day N, Feychting M, Roman E, Skinner J, Dockerty J. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer* 2000; 83(5):692-8.

54. İlhan HA. Overyan rezervi değerlendirmede bazal over hacmi ve antral folikül sayısının önemi. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2003.
55. Arıcı A, Attar E, Balaban E, Buyru F, Çolgar U.ve ark. Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006.
56. Kuş C. İnfertilite durumunda kadınların yaşam kalitesi ve algıladıkları sosyal desteğin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2008.
57. Akturk F. Türk toplumunun yardımcı üreme tekniklerine bakışı. Yüksek Lisans Tezi. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2006.
58. Bell K. An overview of Assisted Reproduction in Australia and directions for social research. iJET 2006; 4(1):15-27.
59. Tomlinson MJ, Arthur A, Thompson KA, Kasraie JL, Bentick B. Prognostic indicators for intrauterine insemination: statistical model for IUI success. Human Reproduction 1996;11(9):1892-1896.
60. Bakacak ZB. Antimüllarian hormonun IVF sikluslarında over rezervini belirlemedeki rolü. Uzmanlık Tezi. İstanbul: SB. Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2005.
61. Branigan EF, Estes MA, Muller CH. Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. Fertil Steril. 1999, 71(3):547-551
62. Gezginc K, Cicek NM, Colakoğlu M, Celik C, Capar M, Akyurek C. İntrauterin inseminasyon uygulama zamanı ve sayısının gebeliğin oluşumuna etkisi. Perinatoloji ve Endokrinoloji Derneği, Kadın Doğum Dergisi 2004; 2:4.
63. Carr BR, Blackwell RE. Textbook of Reproductive Medicine. 2nd Ed. Connecticut USA: Appleton & Lange Stamford, 1998.
64. Trounson A. Current perspectives of in vitro fertilization and embryo transfer. Clin Reprod Fertil 1982, 1(1):55-65.
65. Bahar L, Kahraman S, Akkuş M, Baykal T. Fertil kadınlar ve implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlarda endometriumun ince

- yapı ve immunohistokimyasal değerlendirilmesi. Dicle Tıp Dergisi 2010; 39(2): 269-275.
66. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril 1988, 49(1):112-117.
 67. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993, 8(7):1061-106.
 68. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. Hum Reprod 2007; 22: 174- 179.
 69. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2003; 56:103-12
 70. Ölmez E, Şahna E, Ağkadir M, Acet A. Melatonin: Turgut Özal Tıp Dergisi 2000;7:177-87.
 71. Sack RL, Lewy AJ, Hughes RJ. Use of melatonin for sleep and circadian rhythm disorders. Ann Med 1998; 30:115-21.
 72. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. Braz J Med Biol Res 1993; 26:1141-55.
 73. Wurtman RJ, Zhdanova I. Improvement of sleep quality by melatonin. Lancet 1995; 346:1491.
 74. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin--an emerging mystery. Biochem Pharmacol 1998; 56:1265-72.
 75. Emre Y, Kürüm V. Havuz ve kafeslerde alabalık yetiştiriciliği teknikleri. Ankara: Minpa Matbaacılık, 1998;232.
 76. Bubenik GA, Blask DE, Brown GM, Maestroni GJ, Pang SF, Reiter RJ, et al. Prospects of the clinical utilization of melatonin. Biol Signals Recept 1998; 7:195-219.

77. Uyar A, Alan M. Koyunlarda erken anöstrüs döneminde melatonin uygulamalarının ovulasyon ve gebelik üzerine etkisi. *YYU Vet Fak Dergisi* 2008; 19:47-54.
78. Kamal RA. Non-Obstrüktif Azospermide Sperm Bulmayı Predikte Eden Faktörler. Uzmanlık Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2014.
79. Schwarzer JU, Fiedler K, v Hertwig I, Krüsmann G, Würfel W, Schleyer M, Mühlen B, Pickl U, Löchner-Ernst D. Sperm retrieval procedures and intracytoplasmatic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. *Urol Int* 2003; 70(2):119-23.
80. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38:1–9.
81. du Plessis SS, Hagenaar K, Lampiao F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS *Andrologia* 2010;42(2):112-6.
82. Ortiz A, Espino J, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility *J Pineal Res* 2011; 50(2):132-139.
83. Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J Pineal Res* 2011;50(3):310-8.
84. Karimfar MH, Niazvand F, Haghani K, Ghafourian S, Shirazi R, Bakhtiyari S. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2015; 28(1):69-76.
85. Karaca Ö, Pekmez H, Kuş MA, Akpolat N, Öğütürk M, Kuş İ. Deneysel karbon tetraklorür toksisitesi sonucu karaciğerdeki IŞP70 immunoreaksiyon artışı üzerine melatonin hormonunun etkisi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi 2011; 25: 73-76.

86. Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez EI, Nuñez R, Fernández JL, Caballero P, López-Fernández C, Holt WV. A dynamic assesment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril* 2009; 6:1915-1919.
87. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol reprod* 1997.56, 602-07.
88. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 1998; 30: 29- 35
89. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 1864- 71.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Esra
Soyadı : Aydın
Doğum Yeri ve Tarihi : Elazığ, 28.03.1989

Eğitimi :

Yüksek Lisans (2013- devam etmekte)
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Klinik Embriyoloji Programı

Lisans (2009- 2013)
Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yabancı Dili : İngilizce