



İNFERTİL ÇİFTLERDE SPERM GENOMİK STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİNDE DNA FRAGMENTASYONU ANALİZ YÖNTEMLERİ

Sperm DNA Fragmentation Analysis Methods in Infertile Couples for Assessing Genomic Instability

Şengül YÜKSEL

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 14.02.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 15.03.2019

Yayın Tarihi / Published: 30.05.2019

ÖZ

Çevresel stres, gen mutasyonları ve kromozomal anormalliklerin tamamı, spermatogenez sırasındaki tüm aşamaları etkileyebilir, bu da sonuçta, infertiliteye sebep olan anormal kromatin yapısına yol açabilir. DNA hasarlı sperm taşıyan kişilerde tüp bebek başarısızlığı da tekrarlayan gebelik kaybı da sık görülmektedir. Ayrıca, DNA fragmentasyon bozukluğu olan spermle döllenmiş olan yumurtalardan oluşan embriyolar gebelik dönemini sorunsuz atlattıysa bile, teorik olarak konjenital malformasyonlar ve çocukluk çağı kanserleri gelişimi açısından risk altındadır. Bu nedenle yardımcı üreme teknikleri uygulanırken tedavi öncesi sperm DNA fragmentasyon testi uygulanması ve en iyi hücrelerin seçilmesi hayati önem taşımaktadır. Günümüzde kullanılan çok farklı sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri mevcuttur. Bu derlemenin amacı sperm DNA'sında oluşan hasar ve fragmentasyonları test etmek için geliştirilen yöntemlerin klinik kullanımındaki yerleri ile birlikte değerlendirmektir.

Anahtar kelimeler: İnfertilite, Sperm, DNA fragmentasyonu

ABSTRACT

Environmental stress, gene mutations, and chromosomal abnormalities can all affect the steps of spermatogenesis, which in turn may lead to abnormal chromatin structure causing infertility. In couples with DNA-damaged sperm, in vitro fertilization failure may also frequently be seen as recurrent pregnancy loss. In addition, embryos which are fertilized with sperm which have DNA fragmentation disorder are under the risk of developing congenital malformations or childhood cancers, even if the embryos have survived the pregnancy period without any problems. Therefore, sperm DNA fragmentation test before the and selection of the best cells is vital when assisted reproductive techniques are applied. There are many different methods of detecting sperm DNA damage used today. The aim of this review is to evaluate the methods developed to test the damage and fragmentation of sperm DNA in clinical practice

Keywords: Infertility, Sperm, DNA fragmentation

GİRİŞ

İnfertilite dünya genelinde doğurganlık çağındaki çiftlerin %8-12'sini etkileyen önemli bir üreme sağlığı sorunudur (Inhorn ve Patrizio, 2015). Gametlerdeki genetik kararsızlıklar ve anomaliler, konjenital anomalilerin oluşumunun yanı sıra infertilitenin de en önemli nedenleri arasındadır. Gametlerde gözlemlenen bu olguların önemli bir kısmı ise şaşırtıcı şekilde babadan gelen sperm kaynaklıdır (Inhorn ve Patrizio, 2015). İnfertil çiftlerde yapılan araştırmalarda, semen parametreleri normal (son yıllarda klasik semen analizi testlerinde yapılan yeniliklere ve referans değerlerde yapılan düzenlemelere rağmen) gözükten erkeklerin %30'unun yine de infertil olduğu gözlemlenmiştir (Gelbaya vd, 2014). Dolayısıyla, semen analizi, erkek kaynaklı infertilitenin anlaşılmasında atlanmaması gereken temel bir yaklaşımdır. Semen analiz edilirken spermin sayısı, morfolojisi, hareketliliği ve genomik bütünlüğü değerlendirilen başlıca parametrelerdir (Belva vd, 2006). Spermin genomik bütünlüğünün değerlendirilmesi, son yıllarda yukarıda sayılan diğer klasik semen analiz yöntemleri arasından daha da öne çıkan bir yaklaşım haline gelmiştir. Bunun sebebi, spermdeki DNA fragmantasyon oranının tedavi protokolünü doğrudan etkilediğinin ortaya konmuş olmasıdır (Cho vd, 2017). Yapılan bir çalışmada sperm DNA fragmantasyon indeksi %27-30 arasında olan kişilerin çocuk sahibi olabilmesi için gereken süre, ortalamanın çok üzerinde bulunmuştur (Donald ve Everson, 2006). Sperm DNA fragmantasyon indeksi (DFI) yüksek çıkan hastalarda tüp bebek tedavisinin başarı oranını artırmak adına DNA fragmantasyon indeksini düşürmek yaklaşımı benimsenmekte; bunun için de cinsel perhiz süresini kısaltma, tekrarlayan ejakülasyon, farklı sperm hazırlama tekniklerinin kullanımı veya testiküler sperm biyopsisi yöntemleri uygulanmaktadır (Alvarez, 2003; Bradley vd, 2016). Sperm DFI>%30 olduğu vakalarda ise mikroenjeksiyon yönteminin gebelik elde edilmesinde daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Zini vd, 2011). DFI, tedaviyi bu denli kritik seviyelerde etkilemektedir. Halen, DFI dolayısıyla sperm DNA fragmantasyon analizi, en çok açıklanamayan infertilite, tekrarlayan IVF başarısızlığı olan veya tedavi sonrası düşük yapan çiftler ile eşi doğal yollarla gebe kalıp da ilk 3 ay içinde tekrarlayan düşüklere olan hastalarda endikedir (Majzoub vd, 2017).

A. Sperm DNA'sı:

Memeli sperm kromatin yapısının kendine has bir özelliği vardır. Oldukça organize, yoğun paketlenmiş kompakt yapıdadır. Bu özelliği ile somatik hücrelerden oldukça farklıdır ve sperm DNA'sının özel paketlenmesi nedeniyle nükleer hacmindeki ciddi azalma hücre morfolojisi ile uyumludur. Somatik hücrelerde nükleer DNA histonlardan oluşan bir

oktamerin etrafına sarılarak nukleozom şeklinde paketlenirler ve sonrasında kangal şeklinde solenoidleri oluştururlar. Bu paketleme şeklinde histonlar kromatin hacmini artırır. Sperm çekirdeğinde bu tip paketlenme için yeterli hacim yoktur. Bu nedenle sperm nükleusunda farklı bir kromatin paketleme organizasyonu bulunmaktadır. Epididimdeki sperm olgunlaşması son kromatin organizasyonu aşamasını içerir (Ward ve Coffey, 1991).

Spermiyogenez sırasında, sperm kromatini, histonların kaybolduğu ve bunun yerine geçiş proteinleri ve sonunda protaminlerin olduğu bir dizi modifikasyondan geçer (Kierszenbaum, 2001). Protaminler arjinince zengin, küçük proteinler olup histonların yaklaşık yarısı kadardır. DNA iplikçikleri, bu protaminler tarafından yoğunlaştırılır ve sperm kromatinin temel paketleme birimi olan toroid oluşturulur. Her bir toroid somatik kromatinlerdeki bir DNA ilmeğine eşdeğerdir. Toroidler ayrıca, proteindeki sistein kalıntıları arasındaki inter ve intra moleküller arası disülfid çapraz bağları ile daha da sıkılaştırılır (Kosower vd 1992). Tüm bu sıkıştırma ve organizasyon işlemleri, erkek ve dişi üreme sistemi yoluyla taşınma sırasında sperm kromatininin korunmasına yardımcı olur ve aynı zamanda baba genomunun taşıdığı genetik bilgiyi doğru bir şekilde ifade etmesini sağlar (Gatewood, vd, 1987).

İnsan sperm kromatini bu kadar yüksek oranda organize ve kompakt yapıyı içermesine rağmen, histonların yaklaşık% 15'i insan sperm kromatininde tutulduğundan diğer memelilere göre daha az kompakttır (Gatewood vd, 1987). Spermatogenez boyunca transkripsiyonel olarak inaktif olan histon tutulum bölgelerinin, erken embriyonik dönemde epigenetik mekanizmalarla düzenleyici rol üstlendiği düşünülmektedir (Ordueri vd, 2013). İnfertil erkeklerin sperm kromatinlerinde histone/protamin oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. İnsan spermi iki tür protamin içerir, P1 ve P2. P2 protaminler daha az sistein grubu içerdiğinden daha az disülfid çapraz bağlantısı içerir (Kierszenbaum, 2001). Bu durum teorik olarak DNA'yı hasarlara karşı daha duyarlı hale getirir. İnfertil erkeklerde P2 ekspresyonundaki değişikliklerin yaygın olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla, insan spermatozoon kromatinleri daha az düzenli sıkıştırılır ve sıklıkla DNA iplikçik kırıkları içerir (Carrell ve Liu, 2001).

Sperm DNA hasarı:

Spermin görevi babaya ait genetik materyali yumurtaya taşımaktır. Spermatozoadaki 23 adet kromozoma ait DNA'larda olası genetik hasarların nedenleri ve mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Sperm hücrelerinde DNA hasarı, morfolojik görünüm ve sperm motilitesi ideal olmasına rağmen mümkündür. DNA fragmentasyonu, sperm DNA'sındaki hasarlar ve

genomik kararsızlıklar sonucu oluşur. DNA fragmentasyonu, infertil erkeklerin ejakülatlarında sıklıkla bulunan tek ve çift sarmal DNA kopmaları ile karakterizedir. Sperm kromatin anomalileri arasında tek zincir veya çift zincir kırıklıkları, histonların protamine dönüşümünü etkileyerek DNA paketlenmesini bozacak olan nükleer protein defektleri ve tersiyer kromatin konfigürasyonunda değişikliğe neden olan kromatin yapısal anormallikleri en sık gözlenen anomalilerdir (Irvine, 1998). Sperm DNA fragmentasyonu ve/veya bozulmuş kromatin bütünlüğü ile ilişkili çeşitli etiyolojik faktörler vardır. Bu nedenler çok geniştir. Sigara içiciliği (Potts vd, 1999), radyasyon (Arnon vd, 2001) ve kemoterapi (Morris, 2002) gibi çevresel koşullardan, lökospemi (Erenpreiss vd, 2002) varikosel (Saleh vd, 2003) ve kanser gibi patofizyolojik koşullara kadar çeşitlilik gösterir (Kobayashi vd, 2001). Spermin dondurulması (Labbe vd, 2001) gibi iyatrojenik sebepler bile sperm DNA hasarı ile ilişkilendirilmiştir. Bu koşulların sperm DNA hasarına ve/veya kromatin anormalliklerine yol açtığı moleküler mekanizmalar kesin olarak anlaşılmış olmasa bile 4 ana başlık altında toplanabilir. 1) Kromatin paketleme anormallikleri, 2) Oksidatif stres veya radyasyona bağlı olarak DNA zincirinde kırıklar 3) Apoptozis ve 4) Kromozomal hasarlar (Muratoro vd, 2006)

Kromatin Paketleme Anormallikleri: Spermatogenez esnasında kromatin şekillendirilirken histonların protaminlerle yer değiştirdiği önemli bir aşama vardır. Kromatin histon hiperasetilasyonu ile gevşetilir ve süper sargılanmadan kaynaklanan burkulma stresini gidermek için sperm DNA'sında geçici çentikler üreten DNA topoizomeraz II (Topo II) işlev görür. Bu geçici çentikler spermiogenesis ve ejakülasyondan önce aynı enzim Topo II tarafından onarılır. Eğer bu çentikler tamir edilmezse, ejakülatta DNA'sı parçalanmış spermler bulunabilir (Laberge ve Boissonneault, 2005).

Reaktif Oksijen Türleri: Sperm DNA hasarı, yüksek seviyelerde reaktif oksijen türevleriyle (ROS)'de ilişkilendirilmiştir (Agarwal vd, 2014). Seminal plazma sperm DNA'sının korunmasına yardımcı olan antioksidanlar içerir (Twigg vd, 1998). Düşük seviyelerde ROS, sperm olgunlaşması, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi fonksiyonlarda önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, aşırı miktarda ROS üretimi, hücrel hasar ve DNA hasarına neden olabilmektedir. Semendeki başlıca ROS kaynakları lökositler ve spermin kendisidir, özellikle olgunlaşmamış, bozuk morfolojik yapısı olan spermler aşırı ROS üretmektedir. Ayrıca sperm hareketinin enerji ihtiyacını karşılayan bol miktardaki mitokondriler aynı zamanda ortamdaki ROS miktarını da artırmaktadır (Agarwal vd, 2014). Dışsal nedenler çok çeşitlidir ancak semendeki lökositler, kimyasal/toksinler, beslenme eksikliği, laboratuvar işlemleri, ileri yaş, fizyolojik ve fiziksel stres, sigara ve alkol kullanımı, kanser ve anti kanser ilaç kullanımı ve

enflamasyon en sık nedenlerdir. İçsel sebepler dışsal sebeplere göre sperm DNA'sına daha çok zarar verir. Sperm DNA fragmantasyonunun lökositlerin oluşturduğu ROS'dan ziyade içsel ROS ile korelasyonu vardır (Agarwal vd, 2014). İnfertil erkeklerin yaklaşık% 25'inin sperminde yüksek ROS seviyeleri bildirilmiştir (Zini vd, 1993).

Apoptozis: Sperm DNA hasarı oluşumunun bir başka nedeni ise başarısız, tamamlanamamış apoptozdur. Testislerde germ hücrelerinin aşırı çoğalmasını önlemek ve hasarlı hücreleri yok etmek için apoptoz gerçekleşir (Sinha vd, 1999). Apoptotik yol, sertoli hücreleri tarafından salgılanan Fas ligantının (FasL) germ hücre yüzeyinde bulunan Fas reseptörü ile etkileşimi sonucu tetiklenir. Seminal parametreleri zayıf olan erkeklerde, sıklıkla Fas ekspresyonunda artış söz konusudur. Bu durum, spermlerin bazılarının DNA hasarının, Fas ekspresyonu ile başladığı ancak daha sonra apoptotik yoldan kaçtıkları “abortif apoptozis” (tamamlanamamış apoptozis) önerisine yol açmıştır (Sakkas vd, 2003). Son yapılan fonksiyon kaybı çalışmalarında spermatogenez sırasında DNA hasarı kontrol noktalarında, eksizyon onarım genlerinin, uyumsuzluk onarım genlerinin ve p53'ün rol aldığı gösterilmiştir (Raimondo vd, 2014).

Kromozomal aberasyonlar: Sayısal ve yapısal anomaliler veya markır kromozom gibi her ikisinin de birlikte olduğu durumları kapsamaktadır. Erkek infertilitesi etiyojisinde %30 oranında genetik nedenlerin söz konusu olduğu bildirilmiştir (Kupker 1999). Y kromozomunda sperm yapımı ile ilişkili AZF (AZFa, AZFb, AZFc) gen bölgelerindeki mikrodelsyonların oligospermi veya azospermiye neden olduğu ve dolayısıyla fertilité problemlerine yol açtığı bilinmektedir (Kupker 1999).

B. Sperm DNA hasarını ve fragmantasyonunu değerlendiren test sistemleri:

Günümüzde kullanılan çok farklı sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemler basit boyama yöntemleri olabileceği gibi daha komplike yöntemler olabilmektedir. Bu testler DNA hasarını değerlendirenler, kromatin organizasyon anomalilerini değerlendirenler ve kromozomal anomalileri değerlendirenler olarak 3 grupta incelenebilir (Türk vd, 2006; Koyuncu, 2011; Güneş vd, 2013; Yiğit, 2015 ve Küçük, 2018). Sperm DNA fragmantasyonu testlerinde sınır değerleri yapılan çalışmalara göre %27-35 arasındadır (Majzoub vd, 2017). Bu testi yapmak için kullanılan yöntemler ve tercih edilme oranları sırasıyla TUNEL (%30.6), SCSA(%30.6), SCD (%20.4), KOMET (%6.1) ve Toluidine Blue boyama yönteminin de içerisinde olduğu diğer yöntemler (%12.2) şeklindedir (Majzoub vd, 2017).

I. DNA hasarını değerlendiren test sistemleri

8-hidroksi 2-deoksiguanozin'in ölçümü:

8- hidroksi 2-deoksiguanozin (8-OHdG) oksidatif hasara bağlı oluşan DNA hasarının en önemli biyo-belirteçlerindedir. Elektrokimyasal belirlemeli yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC-EC) kullanılarak genomik DNA'da 8-OHdG miktar tayini yapılmaktadır (Shen 2000).

Komet (Tek Hücre Elektroforez) Yöntemi:

Komet işlemi, diğer adıyla tek hücre elektroforezi, sperm DNA kırılmalarının doğrudan değerlendirildiği, erkek kısırlığının incelenmesinde kullanılan hassas bir yöntemdir (Haines vd, 1998). Komet assay işlemi nötral ya da alkali ortamda yapılabilir. Nötral tamponlarda sadece çift zincir kırıklar tespit edilirken, alkali tampon kullanıldığında tek veya çift zincir kırıkları tespit edilebilir (Tarozzi vd, 2007). Yöntem kısaca, alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. İşlem sırasında yoğunlaştırılmış sperm hücreleri agaroz solüsyonunun içinde ince bir tabaka olarak yayılıp deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonlarında eritilirler. Böylelikle DNA'nın süper katlanmış halkaları, protaminler ve histonlar uzaklaştırılır. Alkali pH ortamı çift zincir DNA'nın katlanmasını engeller. Sonrasında bir elektroforetik işleme tabi tutulur. DNA'ların elektroforez de yürütülmeleri esnasında hasarsız DNA'lar kuyruk yani komet oluşturmazken hasarlı DNA'ların fragmentleri farklı moleküler ağırlık ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruklu yıldız şeklinde bir görüntü oluştururlar. Hücreler floresan DNA bağlayıcı boya ile boyanır ve daha sonra görüntüleme yazılımıyla görüntülenir. Görüntüleme yazılımı kuyruğun uzunluğunu ve yüksek miktarda DNA iplik kopmasıyla spermde artan kuyruk floresan yoğunluğunu ölçmek için kullanılır. Baş ve kuyruktaki DNA miktarına göre DNA hasarının seviyesi tespit edilir. Floresan boyama sonucunda elde edilen DNA göç görüntüleri değerlendirilip DNA hasarı skorlanır (Pastuszek vd, 2017).

Terminal Uridine Nick- End Labeling (TUNEL) Yöntemi:

TUNEL yönteminde kalıba ihtiyaç duymayan Terminal Deoxynucleotidyl Transferaz (TdT) adı verilen DNA polimeraz enziminden faydalanılır. Bu enzim tek veya çift zincir DNA'nın 3'-hidroksil grubuna rastgele deoksiribonükleotitler (dUTP) ekler (Robbins ve Coleman, 1988). Kopan yerlere bağlanan dUTP daha sonra etiketlenir ve flow sitometri ile

veya floresan mikroskop kullanılarak ölçülür. Bununla birlikte çift zincir kırıklarında 3'OH grubu her zaman olmayabilir. Bu durumda bunları tespit edemez. Sonuçta sperm TUNEL pozitif veya negatif olarak sınıflandırılır ve popülasyondaki toplam spermin yüzdesi olarak ifade edilir (Shamsi vd, 2011).

İn situ nick translasyon (NT Testi):

Asıl Çentik Okuma Tayini olarak bilinen bu test, TUNEL yöntemine benzer prensip ile çalışır ancak sadece tek zincir DNA kırıklarını tespit etmektedir. Bu test DNA polimeraz I aracılı enzimatik reaksiyonla elde edilen tek zincir DNA'nın 3'-OH ucundaki biotin veya floresans ile işaretlenmiş dUTP miktarını ölçer. NT ile işaretleme DNA'daki endojen çentiklerin saptanmasını sağlar (Gosalves 2011). Diğer testlerle karşılaştırıldığında sensitivitesi düşüktür.

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

Bu yöntem anormal kromatin yapılı spermdeki DNA'nın asit veya ısı denatürasyonuna daha yatkın olduğu fikrine dayanır. Akridin Orange boyasının (AO) metakromatik özelliklerini kullanan SCSA, sperm DNA'sının in situ asit ya da ısı kaynaklı denatürasyona duyarlılığını ölçer. Bu yöntem ile tek sarmallı DNA'ların (tek sarmallı DNA'lar ≥ 630 nm'de kırmızı floresan renk verir) çift sarmallı (çift sarmallı DNA'lar 515- 530 nm'de yeşil floresan renk verir) olanlara oranı flow sitometrisi kullanılarak ölçülür (Evenson & Wixon, 2006). Spermelerde DNA kırıkları yanında histonların protaminlere oranlarında bir anormallik varsa onu da gösterir (Panner ve Agarwal, 2017).

Halo Sperm Yöntemi-Sperm Chromatin Dispersion (SCD):

Sperm kromatin dispersiyon (SCD) testi, sperm DNA kırıklıklarını direk tespit eden bir testtir (Muriel vd, 2006). Sperm örneği, lam üzerinde bir agaroz matrikse daldırılır, denatüre etmek için bir asit çözeltisi ile muamele edilir ve daha sonra bir lizis tamponu ile membran ve proteinler uzaklaştırılır. Sonunda preparat boyanarak boyama tipine göre ışık mikroskobu yada floresan mikroskopda incelenir. DNA bütünlüğü olan spermelerde merkezde çekirdek olacak şekilde büyük bir hale görüntüsü vardır. DNA kırıklıkları olanlarda halo formu oluşmaz ya da çok az oluşur (Yiğit vd, 2015).

Akridin Orange:

Akridin Orange testi (AOT), DNA denatürasyonunun derecesini belirlemek için AO'nun yeşilden kırmızıya metachromatik kaymasının kullanıldığı SCSA ile benzer prensiplere dayanmaktadır. Asit uygulaması sonrası oluşan DNA denatürasyonunu ölçer. Akridin orange

uygulanması ile yeşil renkte floresans veren normal yapıdaki DNA, asitle denatürasyon sonrası kırmızı floresans verir (Küçük 2018).

II. Sperm kromatin organizasyon anomalilerini değerlendiren test sistemleri

Anilin Mavi Boyaması:

Anilin mavisi, sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan asidik bir boyadır. Fragmente DNA içeren spermler sıklıkla kalıntı histonların varlığını gösterir. Bu kalıntı histonlar, daha düşük kromatin paketlemesine yol açar, bu da nükleoprotein bazik gruplarının erişilebilirliğini artırır ve daha sonra anilin mavisi gibi asidik boyaların bağlanmasına afinite gösterir (Türk vd, 2006; Koyuncu, 2011). Bu teknik lizinden zengin histonlar ile arginin sistein zengin protaminler arasında ayırım yapma prensibine dayanır ve ejakülattaki spermatozoanın temel nükleer protein bileşiminin farklılıklarını belirler. Histondan zengin immatür spermatozoa lizinden zengin olup mavi boyanırken, protaminden zengin matür spermatozoa ise arginin ve sisteinden zengindir ve boyanma göstermez. Yüksek oranda lizin içeren proteinlerin oranı kromatin kondensasyonunda defektlere neden olabilir (Güneş vd, 2013; Yiğit, 2015 ve Küçük, 2018).

Toluidine Mavi Boyama:

Toluidine Mavi Boyama yöntemi (TB) sperm kromatin bütünlüğündeki ve paketlenmesindeki bozuklukları tespit etmede kullanılan temel bir boyadır (Rahiminia vd, 2017). Gevşek bir şekilde paketlenmiş kromatin ve/veya parçalanmış DNA içeren sperm çekirdeğindeki fosfat kalıntıları, TB gibi bazik boyalarla bağlanmaya karşı yüksek afinite gösterir. TB negatif yüklü fosfat kalıntılarına bağlanan, katyonik bir boyadır. Bu sebeple hafifçe veya ortokromatik boyanan hücrelerde çok az TB bağlanma bölgesi olduğunu, dolayısı ile DNA'nın bütün bir yapıda olduğunu göstermektedir. Bu durumun tam tersi koyu, diğer bir deyişle metakromatik boyanan hücrelerde çok fazla miktarda TB'nin bağlandığı fosfat bölgelerinin olduğu yani zayıf bir DNA bütünlüğünün olduğu, DNA kırıklıklarının mevcut olduğu gösterilir (Rahiminia vd, 2017).

Kromomisin A3 (CMA3) Yöntemi:

Bu yöntem, protamin bakımından fakir olan ve zayıf paketlenmiş DNA'nın indirek gözlenmesi esasına dayanır. CMA3 guanin-sitozinden zengin bölgelere spesifiktir ve CMA3 ve protaminler DNA'da aynı yere bağlanır. Bu yüzden yüksek kromomisin A3 floresansı gösteren bölgelerin düşük protaminasyona sahip olduğu kabul edilir. CMA3 yöntemi,

spermatozoon kromatin değerlendirilmesinde diğer yöntemlerle güçlü korelasyon gösterir (Manicardi vd, 1995).

III. Kromozomal anomalileri değerlendiren test sistemleri

Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi:

Bu yöntemde agar matrikse gömülü veya lam üzerine fiske edilmiş hücreler, DNA denatürasyonu amacıyla alkali solüsyona maruz bırakılarak, DNA çift iplikçiklerinin tek sarmal DNA'ya dönüşmesi sağlanır. DNA kırıklarının artması tek sarmal DNA oluşum oranını artırır. Nötralize edilip proteinleri uzaklaştırılan DNA, floresan işaretli probalar ile in situ hibridizasyona tabi tutulur. Komplementerlik gösteren bölgeler floresan ışığa verir. Bu yöntem in situ olarak DNA kırıklarının ve miktarının belirlenmesine olanak sağlar (Singh, vd 2003).

En sık kullanılan sperm DNA fragmentasyon testlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 1 de özetlenmiştir. Yapılan meta analizlerde bu testlerin sperm DNA fragmentasyonunu tespit etmede farklılık göstermedikleri ortaya konmuştur (Cissen vd, 2016; Rui vd, 2018). Özellikle SCSA, FISH, TUNEL ve alkali komet işlemleri zahmetli ve maliyetli yöntemlerdir. TB diğer DNA fragmentasyon testleriyle yüksek korelasyon göstermiştir ayrıca bu testte örnekler mikroskopta kolayca analiz edilebilmekte ve preparatlar kalıcı olarak saklanabilmektedir (Erenpreiss vd, 2004). Hatta fertil kişilerde DNA fragmentasyon oranının bu yöntem ile %35'i geçmediği belirtilerek bir cut-off değeri verilmiştir. Bu yüzden hızlı ve efektif bir yöntem olan TB yöntemi çeşitli türlerin spermlerinde başarılı bir şekilde standardize edilmiştir (Rui vd, 2018). Yapılan araştırmalar anilin asidik boyama sonuçlarının anormal sperm kromatin yapısı ve erkek infertilitesini belirlemede başarılı olduğu göstermiştir. Bu yöntemle saptanan nükleer maturasyon sonuçlarının sperm FISH sonuçlarında gözlenen dizomi oranları sonuçları ile korelasyon içinde bulunduğunu gösterilmiştir (Singh, vd 2003). Erkek infertilitesinde kromomisin A3 pozitifliği sperm konsantrasyonu, motilitesi ve özellikle normal morfoloji ile negatif korelasyon göstermektedir. Sakkas ve arkadaşları ICSI olgularında, kromomisin A3 pozitifliğinin tümüyle fertilizasyon başarısızlığını göstermediğini, zayıf kromatin paketlenmesine işaret ederek dekonkansasyonu ve olası düşük fertilizasyon kapasitesini gösterdiğini bildirmişlerdir (Sakkas vd, 2003). FISH yöntemi in situ olarak DNA kırıklarının belirlenmesine olanak sağlar (Singh, 2003). Teknik kromatinin yapısal özelliklerini ortaya koyar ancak pahalıdır, zaman alıcı ve karmaşıktır. Bununla birlikte diğer yöntemlere üstünlüğünün olmaması kullanımını sınırlayıcı bir faktördür. In situ nick translasyon (NT) yöntemi dUTP'nin DNA kopmalarına dahil edilmesini ölçmesi bakımından

TUNEL yöntemine benzer. Bununla birlikte, hem tek iplikli hem de çift iplikli DNA kopmalarını tanımlayan TUNEL'in aksine, in situ NT testi sadece şablona bağlı enzim DNA polimeraz I tarafından katalize edilen bir reaksiyonda, tek iplikli DNA kopmalarını tanımlar. Her ne kadar yapması basit bir test olsa da, diğer testlere kıyasla hassasiyetten yoksundur (Gosalves 2011). AOT, flow sitometri gerektirmeyen, floresan mikroskop altında görsel yorumlama yapılabilen ve SCSA'dan çok daha basit ve daha ucuz bir yöntemdir. Bununla birlikte, belirsiz renkler, hızlı solma ve heterojen lekelenme sorunları görsel yorumlamada zorluklara neden olabilir. Komet testinin, genotoksik maruziyeti değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan diğer yöntemlere göre pek çok avantajı vardır. Bunlar arasında, tek hücreli çoğu ökaryotik hücre tipinde genotoksik hasarı tespit edilebilme, çok az sayıda hücre gerekliliği, hızlı ve hassas bir teknik olması ve DNA iplikçik-kırılmasının oluşumu nedeniyle genotoksik maruziyet için erken uyarı vermesi sayılabilir (Haines vd, 1998). SCSA testinin sonuçları oldukça kesin ve tekrarlanabilir. Bu yöntemde DNA fragmantasyon indeksi (DFI) sınırı %30 olarak belirlenmiştir (Evenson & Wixon, 2006).

SONUÇ

Çevresel stres, gen mutasyonları ve kromozomal anormalliklerin tamamı, spermatogenez sırasındaki biyokimyasal olayları etkileyebilir, bu da sonuçta infertiliteye sebep olan anormal kromatin yapısına yol açabilir. DNA hasarlı sperm taşıyan kişilerde tüp bebek başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kaybı da sık görülmektedir. Bununla birlikte DNA fragmantasyon bozukluğu olan spermle döllenmiş olan yumurtalardan oluşan embriyolar gebelik dönemini sorunsuz atlattmış olsa bile, teorik olarak konjenital malformasyonlar ve çocukluk çağı kanserleri gelişimi açısından risk altındadır. Bu bilgiler ışığında fertilizasyon ve gebelik başarısının yanı sıra embriyonun ve doğacak çocuğun sağlığı açısından babaya ait sperm hücrelerinin genomik bütünlüğü ve kararlılığı çok önemlidir. Bu nedenle yardımcı üreme teknikleri uygulanırken tedavi öncesi sperm DNA fragmantasyon testi uygulanması ve en iyi hücrelerin seçilmesi hayati önem taşımaktadır.

Tablo 1. Sperm DNA hasarı ve fragmantasyonlarının saptanmasında kullanılan en önemli testlerin avantaj ve dezavantajları

Test	Tanımlama yöntemi	Avantaj	Dezavantaj
Sperm kromatin analizi (SCSA)	Akım sitometre	Standardize, çok sayıda hücre analizi	Spesifik ekipman gerekli, pahalı
Akridin orange test (AOT)	Floresan mikroskop	Basit, ucuz	Renk hassasiyeti zayıf, diğer testlerle korelasyonu zayıf
Terminal Uridine Nick- End Labeling (TUNEL)	Floresan mikroskop Akım sitometre	Standardize, diğer testlerle korelasyonu fazla	Spesifik ekipman gerekli, pahalı, laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları
In Situ Nick Translasyon (ISNT)	Floresan mikroskop	Endojen kırıklara spesifik	Klinik korelasyonu belirsiz
Komet assay	Tek hücre elektroforezi, Floresan mikroskop	Hassas, klinik korelasyon yüksek, Tek hücrede ölçüm	Zaman alıcı, spesifik ekipman gerekli, laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları
8-Hidroksiguanozin (8-OHdG) ölçümü	HPLC, Flow sitometre	Çok hassas, klinik korelasyon yüksek, kantitatif	Spesifik ekipman gerekli, fazla örnek gerekli
Halo sperm yöntemi (SCD)	Floresan mikroskop	Basit	Klinik korelasyonu belirsiz
Aniline Blue boyama	Işık mikroskobu	Basit, ucuz	Heterogen boyanma, hassasiyeti düşük, laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları
Toluidine blue boyama	Işık mikroskobu	Basit, ucuz, diğer testlerle korelasyonu fazla	Heterogen boyanma, laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları
Chromomycin A3 boyama	Floresan mikroskop	Hassas	Pahalı, uğraştırıcı, laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları
FISH	Floresan mikroskop	Hassas, Klinik korelasyonu yüksek	Spesifik ekipman gerekli, pahalı, laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları

KAYNAKLAR

- Agarwal A, Virk G, Ong C, Plessis S. *Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. World J Mens Health, 2014; 32: 1-17.*
- Alvarez JG. *DNA fragmentation in humanspermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. Minerva Ginecol, 2003; 55: 233-9.*
- Arnon J, Meirou D, Lewis-Roness H, Ornoy A. *Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. Hum Reprod Update. 2001; 7: 394-403.*
- Belva F, Bonduelle M, Roelants M, Michielsen D, et al. *Semen quality of young adult ICSI offspring: the first results. Hum Reprod, 2016; 31: 2811-20.*
- Bradley CK, McArthur SJ, Gee A, et al. *Intervention improve assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm dna fragmentation: a retrospective analysis. Andrology, 2016; 4: 903-10.*
- Carrell DT, Liu L. *Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. J Androl, 2001; 22: 604-10.*



- Cho CL, Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC. A single cut-off value of sperm DNA fragmentation testing does not fit all. *Transl Androl Urol* 2017; 6: 501-3.
- Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, et al. Measuring sperm dna fragmentation and clinical outcomes of medically assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2016; 11(11): e0165125.
- Donald P, Everson DP. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility, *Theriogenology*, 2006; 65(5): 979-991.
- Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl*. 2002; 23: 717-23.
- Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, et al. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the fowcytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod*, 2004; 19: 2277-82.
- Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 2006; 65(5): 979-91.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of dna in human sperm chromatin. *Science*, 1987; 236: 962-4.
- Gelbaya TA, Potdar N, Jeve YB, Nardo LG. Definition and epidemiology of unexplained infertility. *ObstetGynecolSurv*, 2014; 69:109-15.
- Gosalvez J, Gonzalez-Martinez M, Lopez-Fernandez C, et al. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate, *Fertil Steril*, 2011; 96: 1083-6.
- Güneş S, Sevgili E, Aşçı R. Sperm DNA Hasarı Mekanizmaları ve Değerlendirme Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Urology*, 2013; 4(3): 107-14.
- Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol*, 1998; 444: 79-91.
- Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*, 2015;21(4): 411-26.
- Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human Reproduction*, 1998; 13: 33-44.
- Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev*, 2001; 58: 357-8.
- Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson DR, et al. Evenson DP Toma H Thomas AJ Agarwal A DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*, 2001; 75: 469-75.
- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl*, 1992; 13: 342-8
- Koyuncu H. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri. *Türk Urol Sem*, 2011; 2: 18-23
- Kucuk N. Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm. *Türk J Urol*, 2018; 44: 1-5.
- Kupker W, Schwinger E, Hiort O, Ludwing M, et al. Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up. *Hum Reprod*, 1999; 14: 124-37.
- Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Dev*, 2001; 60: 397-404.



- Laberge RM, Boissonneault G. *On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. Biol Reprod*, 2005; 73: 289-96.
- Majzoub A, Agarwal A, Cho CL, Esteves S. *Sperm dna fragmentation testing: a crosssectional survey on current practices of fertility specialists. Trans Androl Urol*, 2017; 6: 710–9.
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, et al. *Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship of chromomycine A3 acessibility. Biol Reprod*, 1995; 52: 864-7.
- Morris ID. *Sperm DNA damage and cancer treatment. Int J Androl*, 2002; 25: 255-61.
- Muratori M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, et al. *Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. Front Biosci*, 2006; 11: 1491-9.
- Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, et al. *Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level as measured by the sperm chromatin dispersion test in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril*, 2006; 85: 371–8.
- Ordueri E, Özenci ÇÇ. *Sperm nukleusu ve nüklear matriks: Parental genomu taşıyan kargodan fazlası. Androloji Bülteni*, 2013; 129-132.
- Panner Selvam MK, Agarwal A. *A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. Arab J Urol*, 2018; 17;16(1):65-76
- Pastuszek E, Kiewisz J, Skowronska P, et al. *An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human spermatozoa on DNA fragmentation using a neutral and alkaline. Comet assay Andrology*, 2017; 5(2): 392-398.
- Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, et al. *Sperm chromatin damage associated with male smoking. Mutat Res*, 1999; 423: 103-11.
- Rahiminia T, Hosseini A, Anvari M, Ghasemi-Esmailabad S, et al. *Modern human sperm freezing: Effect on DNA chromatin and acrosome integrity. Taiwan J Obstet Gynecol*, 2017; 56: 472-76.
- Raimondo S, Gentile T, Cuomo F, Filippo S, Aprea GE, Guida J. *Quantitative evaluation of p53 as a new indicator of DNA damage in human spermatozoa. Hum Reprod Sci*, 2014; 7(3): 212–217.
- Robbins DJ, Coleman MS. *Initiatorrole of double stranded DNA in terminal transferase catalyzed polymerization reactions. Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 2943–57.
- Rui BR, Angrimani D, Bicudo LC, Losano J, et al. *A fast low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species. Reprod Domest Anim*, 2018; 53: 171-175.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, et al. *Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. Reprod Biomed Online*, 2003; 7: 428-32.
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy, et al. *Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. Fertil Steril*, 2003; 79: 1597-605.
- Shamsi MB, Imam SN, Dada R. *Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. J Assist Reprod Genet*, 2011; 28: 1073–85.
- Shen HM, Ong CN. *Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. Free Rad Biol Med*, 2000; 28: 529-536.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. *Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertil Steril*, 2003; 80: 1420-1430.



Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Rev Reprod, 1999; 4: 38-47.

Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. Reprod Biomed Online, 2007; 14: 746-757.

Turk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. FÜ Sağlık Bil Dergisi, 2006; 20(1): 85-95.

Twig J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, et al. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. Mol Hum Reprod, 1998; 4: 439-45.

Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod, 1991; 44: 569-74.

Yiğit A. IUI olgularında sperm fonksiyon testlerinin gebeliği öngörmedeki değeri Yüksek Lisans Tezi Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015.

Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. Int J Androl, 1993; 16: 183-8.

Zini A, Jamal W, Cowan L & Al-Hathal N. (2011) Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review J Assist Reprod Genet 28(5) 391-7.