

Açıklanamayan İnfertil Çiftlerde Erkek Faktörü: Sperm DNA Fragmentasyonu Değerlendirmesi

Hale BAYRAM¹, Mehmet CINCIK²

Öz

Açıklanamayan infertilite günümüzde tüm infertil çiftlerin %30-40'ını oluşturmaktadır. İnfertilite pratiğindeki tüm testlerin normal olmasına karşın çiftin gebelik elde edememesi durumu olarak tanımlanır. Bu durumda farklı ileri tetkikler yapmak gerekmektedir. Bu konuda en çok yapılan çalışma açıklanamayan infertil çiftlerde erkek partnerin değerlendirilmesidir. Bunun için sperm deoksiribonükleik asit (DNA) fragmentasyonu (SDF) en çok araştırılan patolojiler arasında yer alır. Sperm kalitesi gebelik oluşumu ve devamlılığı için büyük önem taşımaktadır.

Sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmek için çalışmalarda birçok yöntem kullanılmaktadır. TdT-dUTP nick-end-labelling (TUNEL) yöntemi, tek hücre jel elektroforezi (COMET analizi), sperm kromatin yapı analizi (SCSA), flowsitometrik analiz, akridin oranj testi ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır. Birçok çalışmada da testlerden ikisi ya da daha fazlası bir arada kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar açıklanamayan infertilite tanısı almış çiftlerde erkek partnerden alınan spermaların DNA fragmentasyon oranının yüksek olduğunu göstermiştir. Bu çiftlerde ya gebelik oluşmamakta ya da erken dönem gebelik kayıpları yaşanmaktadır. Kadın infertilitesi yönünden değerlendirilip herhangi bir patoloji saptanmayan, sperm DNA fragmentasyon oranı normal kabul edilebilir çiftlerde gebelik oluşmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, Erkek, Spermatozoa, DNA fragmentasyonu

Male Factor in Uncompleted Infertile Pairs: Evaluation of Sperm DNA Fragmentation

Abstract

Unexplained infertility now accounts for 30-40% of all infertile couples. Despite normal testing of all tests in infertility practice, it is defined as the situation that the couple cannot achieve pregnancy. In this case, it is necessary to conduct different advanced examinations. The most common study on this subject is the evaluation of the male partner in infertile couples. For this, sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation (SDF) is among the most researched pathologies. Sperm quality is of great importance for pregnancy formation and continuity.

Many methods are used in studies to evaluate sperm DNA integrity. TdT-dUTP nick-end-labelling (TUNEL) method, single cell gel electrophoresis (COMET analysis), sperm chromatin structure analysis (SCSA), flow cytometric analysis, acridine orange test, and fluorescent in situ

¹Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

²Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Yazışma Adresi: Öğr. Gör. Hale Bayram, Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Marmara Eğitim Köyü 34857 Maltepe/İstanbul, e-posta: halebayram@maltepe.edu.tr, ORCID ID: 0000-0002-6104-8820

Geliş Tarihi: 15 Temmuz 2020 - Kabul Tarihi: 19 Ağustos 2020

DOI: 10.17932/IAU.TFK.2018.008/tfk_v03i3001

hybridization (FISH) method are among the frequently used methods. In many studies, two or more of the tests are used together. Studies have shown that in couples diagnosed with unexplained infertility, the DNA fragmentation rate of sperm from a male partner was found to be high. Pregnancy does not occur or early pregnancy losses occur in these couples. Pregnancy occurs in couples whose sperm DNA fragmentation is considered normal and no pathology is detected after being evaluated for female infertility.

Keywords: Infertility, Man, Spermatozoa, DNA fragmentation

Giriş

İnfertilite bir yıl korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi durumu olarak tanımlanmakta ve üreme çağındaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir (1). İnfertil tanısı konmuş çiftlerin %30-40'ında erkeğe bağlı, %40-50'sinde ise kadına bağlı nedenlerin olduğu görülmektedir (2). Açıklanamayan infertilite, infertilite tanısında kullanılan tüm standart testlerden normal sonuç elde edilip fekondabiliteyi bozan faktörlerin açığa çıkartılmadığı durumdur (3). Açıklanamayan infertilite görülme sıklığı %22-28 arasında değişmekte olup, erkek infertilitesine neden olan faktörler değerlendirildiğinde açıklanamayan infertilite oranının %40 civarında olduğu ve testiküler hastalıklarla birlikte erkek infertilitesinin başlıca sebepleri arasında olduğu görülmektedir (4). Bununla birlikte Y kromozomundaki mikrodelesyonlar oligospermi ve azosperminin nedenleri arasında yer almaktadır (5).

Bu derlemede açıklanamayan infertilite tanısı alan çiftlerde erkeğin sperm DNA hasarı yönünden değerlendirmesi amaçlanmaktadır.

Erkek İnfertilitesi Nedenleri ve Sperm DNA Fragmantasyonu

Sperm DNA'sı

Memeli spermi oldukça organize ve yoğun olarak paketlenmiş yapıdadır. Sperm bu özelliğiyle somatik hücrelerden oldukça farklıdır. Sperm morfolojisine uyumlu olarak DNA özel olarak paketlenir. Epididimiste

olgunlaşma sırasında bu paketlenme gerçekleşir. İnsan spermleri memeli spermlerine göre %15 histon proteini içerdiğinden daha az kompakt yapıdadır. İnfertil erkeklerde histon/protamin oranı bazı çalışmalarda yüksek bulunmuştur. İnsan sperminde P1 ve P2 olmak üzere iki tür protamin bulunurken; infertil erkeklerde P2 ekspresyonunda değişimler olduğu gösterilmiştir. Bu da insan sperm kromatininin daha az sıkıştırıldığını ve DNA fragmantasyonunun fazla olduğunu göstermiştir (6).

Sperm DNA Fragmantasyonu (SDF)

Sperm paternal genetik materyalin oosite aktarılmasını sağlar. Sperm motilitesi ya da morfolojisinde sorun olmamasına rağmen DNA fragmantasyonu görülebilir. DNA fragmantasyonu infertil erkeklerin çoğunda görülmekte ve tek ya da çift zincir DNA kopmalarıyla karakterizedir. Kromatin bütünlüğünü bozan sebepler radyasyon, varikozel, sigara kullanımı, kemoterapi gibi birçok faktör olabilmektedir (7).

Sperm DNA hasarı ve fragmantasyonunu belirlemede kullanılan testler

Sperm DNA hasarları ve fragmantasyonunun belirlenmesinde günümüzde aşağıda kısaca açıklanan birçok test kullanılmaktadır. TUNEL yöntemi, COMET yöntemi, SCSA, halo sperm yöntemi (SCD), akrinin oranj testi, anilin mavi boyaması, toluidine mavi boyaması, floresan in situhibridizasyon (FISH) yöntemi sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır.

Terminal Uridine Nick-End Labeling (TUNEL) Yöntemi

TUNEL yönteminde terminal deoksiniükleotidiltransferaz (TdT) DNA polimeraz enziminden yararlanır. Bu enzim tek ya da çift zincirde DNA'nın 3'hidroksil ucuna rastgele deoksiribonükleotidler (dUTP) ekler ve eklenen dUTP'lerin ölçümü flowsitometri tekniği ile ölçülür veya floresan mikroskop ile değerlendirilir (8).

Tek Hücre Elektrofrez (COMET analizi) Yöntemi

Tek hücre elektrofrez yöntemi sperm DNA kırıklarının doğrudan değerlendirildiği, erkek infertilitesini belirlemede kullanılan hassas bir yöntemdir. Bu yöntem nötral ya da alkali ortamda yapılabilir. Nötral tamponda sadece çift zincir kırıkları tespit edilebilirken, alkali tamponlarda hem çift zincir hem de tek zincir kırıkları tespit edilebilmektedir. Yöntemin çalışma prensibi farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektriksel yüklere bağlı olarak DNA moleküllerinin göç etmesine dayanır. Agaroz jel içinde DNA ince bir tabaka halinde yayılıp deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonunda eritilir. DNA'nın katlanmasını sağlayan protamin ve histonlar ortamdan uzaklaştırılmış olur. Alkali tampon DNA'nın çift zincirinin katlanmasını engeller. Elektroforetik yürümede hasarsız DNA'larda kuyruk oluşmazken hasarlı DNA'da farklı molekül ağırlığı ve farklı elektriksel yükte olduğundan kuyruklu yıldız görüntüsü oluşmaktadır. Hücreler floresan DNA bağlayıcı boya ile boyanıp daha sonra görüntülemesi yapılır. Bu görüntüleme skorlanarak hasar miktarı tespit edilir (9).

Sperm Kromatin Yapı Analizi (SCSA)

Bu yöntem yapısal anomali bulunan spermilerin asit ve ısıya duyarlılığının daha fazla olduğu ve daha kolay denatüre olduğu fikrine dayanır. Akridin oranj boyasının metakromatik özelliklerinden yararlanır ve sperm DNA'sının in situ ısı ve asit kaynaklı denatürasyona karşı duyarlılığını ölçer. Bu yöntemle kırmızı renk ışına yapan tek sarmal DNA'ların oranı

(630 nm), yeşil renk ışına yapan çift sarmal DNA'lara oranı (515-530 nm) flowsitometride ölçülür (10).

Flow Sitometrik Analiz

Bu yöntemde akridin oranj (AO) boyası eklendikten sonra numune fluorescence-activated cell sorting (FACS) akışkan sitometri cihazına yerleştirilir. FlowJo yazılımı kullanılarak sperm hücreleri geçirildikten sonra X (kırmızı floresan) ortalaması ve Y (yeşil floresan) ortalaması kaydedilir. Propidyum iyodür eklenir ve DNA'nın fragmente bölgelerine boyanın bağlanması sağlanır (11).

Akridin Oranj Testi

DNA denatürasyon oranının belirlenmesinde yeşilden kırmızıya metakromatik kaymanın gözlemlendiği SCSA benzeri değerlendirme yapılır. Asit uygulaması sonrası denatürasyon oranı belirlenir. Normal yapıdaki DNA yeşil floresan verirken denatüre DNA kırmızı renkte floresan verir (12).

Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)

Yöntemi

Bu yöntemde agaroz matrikse gömülmüş ya da lam üzerine fikse edilmiş hücreler denatürasyon amacıyla alkali solüsyona maruz bırakılır. Çift sarmal yapı açılır ve tek sarmal DNA oranı artar. DNA fragmentasyonunun artması tek sarmal DNA miktarını artırır. Histon ve protamin proteinleri uzaklaştırılan DNA'ya floresan işaretli problemlerle in situ hibridizasyon yapılır. Böylece in situ olarak DNA kırıklarının oranı belirlenmiş olur (13).

O'Neill ve arkadaşlarının çalışmasında intrauterin inseminasyon uygulanarak gebelik elde edilememiş, açıklanmayan infertil çiftler dahil edilerek sperm kromatin yapısal genomik bütünlük bakımından TUNEL yöntemiyle incelenmiştir. SDF saptanmayan çiftlerde klasik in vitro fertilizasyon (IVF) yapılırken, SDF saptananlarda intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yöntemine başvurulmuş. SDF saptanmayan klasik IVF yöntemi ile

gebelik elde edememiş hastalara bir sonraki tedavi için ICSI yöntemi önerilmiştir. Ejekülat sperm ile ICSI uygulanan ve gebelik elde edilemeyen hastalara ise bir sonraki tedavi için testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) yöntemiyle sperm elde edilerek ICSI uygulanması önerilmiştir. Kromatin bütünlüğü için ayrıca SCSA yapılmıştır. Ejekülat spermier TESE spermi karşılaştırıldığında TESE sperminde SDF oranının normal sınırlarda olduğu saptanmış, TESE ile alınan spermle gebelik oranlarının arttığı tespit edilmiştir (14).

Cinthia ve arkadaşları ise SCD testinin DNA fragmentasyonunun belirlenmesinde TUNEL yöntemine göre daha başarılı olduğunu göstermişler (15). Postmayotik apoptoz yetersizliği, spermiyogenez sırasında iplik kopmaları ve oksidatif stres DNA hasarlarına sebep olabilmektedir (16). DNA hasarı olmasına rağmen bazı hücreler fertilizasyon yeteneğini kaybetmez ancak kusurlu yavrular oluşmasına neden olabilir. Ayrıca sperm DNA hasarı infertilite ve IVF başarısızlığıyla ilişkilendirilir. Sperm DNA hasarı ile IVF ve ICSI sonrası gebelik kayıpları arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (17).

Bareh ve arkadaşları gebelik kaybı yaşayan açıklanamayan infertil çiftlerde normospermik erkeklerin sperm DNA fragmentasyonu yönünden değerlendirilmesi için yaptığı prospektif çalışmada her bireyden iki kez sperm örneği almış ve DNA fragmentasyonu yönünden hem TUNEL yöntemiyle hem de flowsitometrik incelemeyle deney ve kontrol grubunu incelemiştir. TUNEL testi sonuçları arasında açıklanamayan infertilitesi olan örneklerde SDF oranının fazla olduğunu göstermiştir (11). Paternal genomun bütünlüğü gebeliğin oluşumu ve sürdürülmesi için büyük önem taşır (18). DNA kalitesi düşük olan anormal spermatozoalar embriyo klivajını engelleyebilir ve blastosist oluşumunu etkileyebilir (19).

KAYNAKLAR

1. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Infertility. In: Taylor HS, Pal L, Sell E, editors. Speroff's Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility içinde. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Press; 2019. p.26-9.
2. Satar DA, Gençdal S. Sperm Değerlendirmesi. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2013; 22(4):532-42. doi: 10.17827/aktd.29343.
3. Collins JA, Crosignani PG. Unexplained infertility: a review of diagnosis, prognosis, treatment efficacy and management. Int J Gynecol Obstet. 1992;39(4):267-75. [https://doi.org/10.1016/0020-7292\(92\)90257-J](https://doi.org/10.1016/0020-7292(92)90257-J).
4. Kan Ö, Alkılıç A, Yüce T, Berker B. Açıklanamayan İnfertilitede Yönetim. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2014; 23(3): 506-18. <https://doi.org/10.17827/aktd.93154>.
5. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. Reprod Biomed Online. 2007;14(6):734-45. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60677-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60677-3).
6. 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(4):604-10.
7. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, vd. 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.
8. 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(11):1073-85.
9. Pastuszek E, Kiewisz J, Skowronska P, Liss J, Lukaszuk M, Bruszczyńska A, vd. 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):392-8.
 10. Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 2006;65(5):979-91. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.011.
 11. Barih GM, Jacoby E, Binkley P, Chang T “Arthur”, Schenken RS, Robinson RD. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation assessment in normozoospermic male partners of couples with unexplained recurrent pregnancy loss: a prospective study. *Fertil Steril*. 2016;105(2):329-36.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.10.033.
 12. Küçük N. Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm. *Türk J Urol*. 2018;44(1):1-5.
 13. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*. 2003;80(6):1420-30. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.04.002.
 14. O’Neill CL, Parrella A, Keating D, Cheung S, Rosenwaks Z, Palermo GD. A treatment algorithm for couples with unexplained infertility based on sperm chromatin assessment. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(10):1911-7. doi:10.1007/s10815-018-1270-x.
 15. Feijó CM, Esteves SC. Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2014;101(1):58-63. e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.09.002.
 16. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained Male infertility: diagnosis and Management. *Int Braz J Urol*. 2012;38(5):576-94. doi: 10.1590/s1677-55382012000500002.
 17. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, vd. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2012;27(10):2908-17.4
 18. Agarwal A, Zini A, Sigman M. Is Sperm DNA Integrity Assessment Useful? *Journal of Urology*. 2013;190(5):1645-7. https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.08.004
 19. Pons-Rejraji H, Artonne C, Sion B, Brugnon F, Canis M, Janny L, vd. Prostatosomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. *Int J Androl*. 2011;34(6pt1):568-80. doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01116.x.