

Sperm DNA Hasarı Mekanizmaları ve Değerlendirme Yöntemleri

Sperm DNA Damage Mechanisms and Evaluation Assays: Review

Sezgin GÜNEŞ,^a
Emel SEVGİLİ,^a
Ramazan AŞCI^b

^aTıbbi Biyoloji AD,

^bÜroloji AD,

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Samsun

Geliş Tarihi/Received: 01.10.2013

Kabul Tarihi/Accepted: 26.11.2013

Yazışma Adresi/Correspondence:

Sezgin GÜNEŞ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji AD, Samsun,

TÜRKİYE/TURKEY

sgunes@omu.edu.tr

ÖZET İnfertilite, genetik ve epigenetik nedenlerden kaynaklanan karmaşık etiyolojili bir hastalıktır. Karyotip anormallikleri, Y kromozomu mikrodelesyonları ve kistik fibrozis transmembran konduktans regülatör (CFTR) geni mutasyonları azospermi ve şiddetli oligospermimin iyi bilinen genetik nedenleri arasında yer almaktadır. Bu nedenlerin yanı sıra infertil erkeklerin gametlerinde DNA'da ve DNA'yı paketleyen histon proteinlerinin kuyruklarında yer alan epigenetik değişiklikler, histon protamin oranı, mutasyonlar, baz oksidasyonları ve DNA hasarı sıklıkla görülebilmektedir. İnfertiliteyle ilişkilendirilen bazı mutasyonlar tanımlandıysa da, sperm bozukluklarından sorumlu olan diğer mutasyonlar bilinmemektedir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %40'ında infertilitenin altında yatan genetik mekanizmalar açıklanamamıştır. Spermatozoada artmış DNA hasarı, hem doğal konsepsiyonu hem de in vitro fertilizasyon veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF veya ICSI) sonrasında konsepsiyon olasılığını azaltmakta ve erken gebelik kayıplarını artırmaktadır. Sperm DNA hasarı etiyolojisinde intrinsek ve ekstrinsek faktörler rol oynamaktadır. İntrensek faktörler arasında oksidatif stress, kromatinin yeniden şekillenmesi sırasında oluşan kusurlar ve spermatogenezdeki hatalı apoptoz yer almaktadır. Ekstresek faktörler arasında ise radyoterapi, kemoterapi ve çevresel toksisite yaratan ajanlar yer almaktadır. İnsan sperm DNA hasarını ölçmek amacıyla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Son zamanlarda COMET, TUNEL, SCD ve SCSA yöntemleri sperm DNA hasarını ölçmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, insan sperm kromatinin yapısı, sperm DNA hasarının etiyolojisi ve mekanizması tartışılacak ve temel DNA hasarı değerlendirme yöntemleri irdelenecektir.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite; DNA hasarı; komet testi; in situ nick-end labeling

ABSTRACT Infertility is a complex disorder with genetic and environmental causes. Karyotypic abnormalities, microdeletions on Y chromosome and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations are well known genetic causes in azospermic or severely oligozoospermic men. In addition, epigenetic modifications on histone tails and DNA, histone to protamine ratio, mutations, base oxidations and sperm DNA damage are frequent in gametic cells of infertile males. Although some specific mutations have been identified, others responsible for sperm defects remain unknown. It has estimated that the underlying genetic mechanism cannot be explained in approximately 40% of infertile males. Infertile males have higher levels of DNA damage than the fertile males and. The increased DNA damage in spermatozoa has been associated with reduced chance of natural conception and conception after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection (IVF or ICSI), and with an increase in early pregnancy loss. Intrinsic and extrinsic factors play role in the etiology of sperm DNA damage. Intrinsic factors are oxidative stress, defects during chromatin remodeling and defective apoptosis in spermatogenesis. Extrinsic factors are radiotherapy, chemotherapy and environmental toxicants. Numerous assays have been developed to measure the human sperm DNA damage. COMET, TUNEL, SCD and SCSA methods are currently and frequently used to measure sperm DNA damage. This review discusses the structure of human sperm chromatin, the etiology and mechanism of sperm DNA damage and describes the basic screening assays for sperm DNA damage.

Key Words: Infertility; DNA damage; comet assay; in situ nick-end labeling

Infertilite, üretken yaştaki çiftlerin %10-15'ini etkileyen önemli bir sorundur.¹ İnfertilite sorunu yaşayan çiftlerin %50'sinden erkek faktörü sorumludur.² İnfertil erkeğin başlangıç değerlendirilmesinde öykü, fizik bakı ve bir ay ara ile yapılan iki adet semen analizinin yapılması önerilmektedir.^{3,4} Semen analizinde ejakulatın fiziksel özellikleri (volüm, pH, likefaksiyon vb.) ile sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, sperm motilitesi ve morfolojisi, vitalite oranı gibi spermatozoaya ait faktörler incelenmektedir.⁵ Genelde bu testler kalitatif ve kantitatif olarak anlamlı sonuçlar verse de, infertil erkeklerin yaklaşık %15'inde semen analizinin normal olduğu görülmektedir.⁶

Erkek infertilitesinin başlıca genetik nedenleri arasında somatik ve mayotik hücrelerde yer alan kromozomal anomaliler, Y kromozomu mikrodelsiyonları ve kistik fibrozis transmembran konduktans regülatör geni mutasyonları yer almaktadır.⁷⁻¹⁰ İnfertil erkeklerin yaklaşık %40'ında infertiliteye yol açan nedenler aydınlatılamamaktadır.⁹ Bu nedenler arasında erkek gametlerindeki DNA kusurları, histon ve DNA'daki epigenetik değişiklikler, baz değişiklikleri ve DNA fragmantasyonu ya da DNA hasarı yer alabilir.¹¹ İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu [intracytoplasmic sperm injection (ICSI)] gibi yöntemler doğal olarak oositi dölleyemeyen ve uygun olmayan spermleri olan erkeklere gebelik oluşturma şansı tanımaktadır.¹² Nitekim üremeye yardımcı tedavi yöntemleri (ÜYTY) ile doğan çocuklarda cinsiyet kromozomu anöploidisi prevalansı önemsiz de olsa (%0,2'den %0,6'ya) artış göstermiştir. Otozom kromozom anomalileri de %0,07'den %0,4'e yükselmiştir. Dolayısıyla erkek infertilitesinin altında yatan genetik ve epigenetik nedenlerin belirlenmesi çiftte verilecek genetik danışma ve uygun tedavinin seçiminde önemli rol oynamaktadır.¹³

Son çalışmalar, sperm fonksiyonunu düzenleyen moleküler mekanizmaların aydınlatılmasıyla yeni tanısal testlerin geliştirilebileceğini ortaya koymaktadır.¹⁴

ÜYTY'nin sık kullanılması erkek infertilitesinde rol oynayan genetik ve epigenetik faktörlerin daha iyi tanımlanması gereğini ortaya koymak-

tadır. Bu çalışmada, özellikle sperm kromatininin özel yapısı ve bu yapıda meydana gelen hasarlarla bunların tespit yöntemleri üzerinde durulacaktır.

SPERM KROMATİNİN YAPISI

Sperm hücresinin fertilizasyonu gerçekleştirebilmesi için dişi üreme sistemi boyunca hareket etme, zona pellusidaya bağlanma ve oosit içerisine penetrasyon gibi birçok işlemi başarması gerektirmektedir.¹⁵ Bu işlemlerin gerçekleştirilebilmesi için sperm DNA'sı nükleus içerisinde sıkı ve yoğun bir şekilde paketlenmiştir. Mitotik kromozomlarla karşılaştırıldığında sperm kromozomları altı kat daha sıkı paketlenmiştir. Ayrıca, somatik hücrelerin DNA'sı yalnızca nükleusun bir bölümünü doldururken, sperm DNA'sı nükleusun neredeyse tamamını kaplar.¹⁶ Sperm DNA'sının bu şekilde düzenlenmesi, yumurtaya aktarılacak olan genetik bilginin sıkıca paketlenmesine ve embriyonun gelişmesine olanak sağlar.¹⁷ Sperm kromatininin spermatozoa içerisinde paketlenmesi dört aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar, DNA'nın çekirdek zarına bağlanması, DNA'nın çekirdeğe bağlandıktan sonra DNA halkalarının oluşumu, histonların protaminlerle yer değiştirmesi ve kromozomal pozisyonudur.¹⁸ Sperm hücresinde somatik hücrelerde bulunan ve DNA'nın paketlenmesinde görev yapan histon adlı proteinlerin %90-95'i protamin adı verilen ve sperm hücresine özgü olan proteinlerle yer değiştirmektedir.¹⁹ Protaminler arjininden zengin, spermin nükleusu içerisinde yer alan, histonların yarısı büyüklüğünde ve spermatogenezin ileri evrelerinde sentezlenen küçük proteinlerdir.²⁰ Sperm kromatininin protaminasyonu, sperm motilitesi için gereken nükleusun sıkıştırılmasını kolaylaştırırken, sperm genomunu oksitlenmekten, sıcaklık yükselmeleri gibi çevresel strese ve dişi üreme sistemi içerisindeki zararlı moleküllerden de korur.²¹ Protaminasyon, sperm hücrelerine özgü epigenetik düzenlenmedir.¹⁹

Arjininden zengin protaminler arasındaki intermoleküler ve intramoleküler disülfid çapraz bağlantılar sperm nükleusunun yoğunlaşmasında önemli yer tutar. Sperm kromatininin protaminle paketlenmeyen, histonlar tarafından paketlenen kromatinin dizileri daha gevşektir. Bu diziler döl-

lenmede ve erken embriyo gelişiminde rol almaktadır.^{22,23} Histon proteinlerinin artışı sperm kromatininin sıkı paketlenmesini engelleyerek DNA hasarına yatkınlığı artırabilir.^{24,25}

SPERM DNA HASARININ ETİYOLOJİSİ

DNA hasarı metabolik olaylar ve çevresel etmenler sonucu ortaya çıkar. Sperm DNA fragmantasyonu (SDF) sigara kullanan ve toksik etkilere maruz kalan özellikle yaşlı erkeklerde sık görülmektedir.¹¹ Son 10 yılda bu moleküler mekanizmaların aydınlatılması için yoğun olarak çalışılmaktadır. Önemli bulgulardan biri, sperm DNA bütünlüğünün ve paketlenmesinin fertilite ile ilişkili olduğunun kanıtlanmasıdır.²⁶⁻²⁹ Sperm DNA hasarının erkeklerde üreme potansiyelini, intrauterin inseminasyon başarısını ve IVF/ICSI sonrası fertilizasyon oranlarını olumsuz olarak etkilediği gösterilmiştir.³⁰⁻³³

Fertil ve infertil erkeklerde sperm DNA hasar düzeylerindeki farklılıkların fertilite potansiyelinin bir göstergesi olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.^{34,35}

SPERM DNA HASARI MEKANİZMALARI

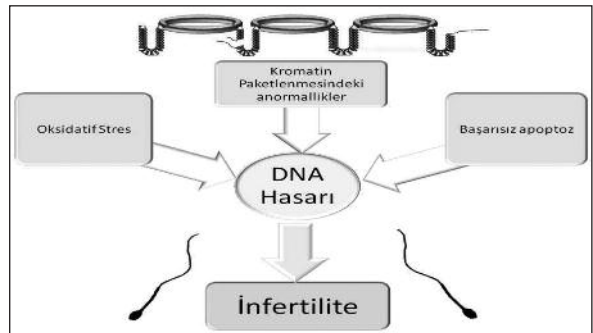
Hasarlı DNA, sonraki kuşaklara aktarılan en önemli paternal anomalilerdendir. SDF, subfertil ve infertil erkeklerin spermatozoalarında olduğu gibi yaşlı, sigara içen, toksik maddelere ve radyo ve/veya kemoterapiye maruz kalan erkelerin spermatozoalarında da sıklıkla bulunmaktadır.¹¹ SDF, testislerde veya sperm ileti kanallarında gerçekleşebileceği gibi ejakülasyon sonrası da gerçekleşebilir. Spermde artmış DNA hasarının azalmış semen kalitesi ile paralellik gösterdiği düşünülmektedir.³⁶⁻³⁸ Diğer yandan bazı çalışmalarda DNA hasarı ve semen kalitesi arasındaki korelasyon yerine, sperm DNA hasarı ve sperm fertilite potansiyeli arasında bir ilişki olabileceği bildirilmektedir.^{11,39} Muratori ve ark., farklı derecelerde SDF gösteren iki sperm popülasyonu tanımlayarak bu konudaki tartışmalara önemli katkı sağlamışlardır. Bu sperm popülasyonlarından biri DNA fragmantasyonu yüzdesinin semen kalitesiyle bağlantılı olduğunu gösterirken, diğeri normal morfoloji ve motiliteye

sahip olması nedeni ile ICSI için tercih sebebidir.³⁹ Bu bulgu, DNA fragmantasyonu olan spermatozoaların da oositi dölleyebileceğini göstermektedir.¹⁵ Bazı çalışmalarda paternal genomdaki DNA hasarının oosit ve embriyo tarafından onarılabildiği gösterilmiş olsa bile, bu onarımın tüm DNA hasar çeşitlerini kapsayıp kapsamadığı henüz açıklığa kavuşmamıştır.⁴⁰ DNA'daki çift zincir kırıklarının tek zincir kırıklarına oranla daha zor onarıldığı ve embriyo üzerinde daha etkili olduğu bildirilmektedir.⁴¹ Diğer yandan DNA hasarının onarımında oosit kalitesi de etkili bir faktördür. Maternal yaş, oosit immatüritesi ve çevresel faktörler de onarımda rol almaktadır.⁴²

Sperm DNA'sındaki hasarın kaynağı olarak oksidatif stres, kromatinin paketlenmesi gibi bazı doğal süreçlerde bozukluk ve hatalı apoptoz olmak üzere üç mekanizma öne sürülmüştür (Şekil 1).⁴³

OKSİDATİF STRES

Sperm işlev bozukluklarının önemli bileşenlerinden biri oksidatif strestir. Oksidatif stresin spermatozoa üzerindeki etkisi, ilk kez Cambridge Üniversitesinde çalışan Thaddeus Mann ve ark. tarafından 30 yıl önce tanımlanmıştır.⁴⁴ Bu grup, yaptıkları çalışmalarda memeli spermatozoasının serbest radikallere karşı savunmasız olduğunu ve lipid peroksidasyonunun uyarılarak sperm plazma membranının bütünlüğünün ve motilitesinin bozulmasına neden olduğunu ortaya koymuşlardır.^{45,46} Sperm plazma zarındaki bu çoklu doymamış yağ asitleri bir yandan fertilizasyonu kolaylaştırırken, diğer yandan serbest oksijen radikalleri için de hedef oluştururlar.⁴⁶ Serbest oksijen radikallerinin verdiği hasar bu-



ŞEKİL 1: Sperm DNA hasarı mekanizmaları.

nunla kalmaz, çekirdek ve/veya mitokondri DNA'sında çapraz bağlar, delesyonlar, baz modifikasyonları gibi kusurlara da neden olmaktadır. Sperm DNA'sının protaminlerle sıkı olarak paketlenmiş olması nedeni ile serbest oksijen radikallerinin etkinliğinden daha fazla korunabilir.⁴⁴ Oksidatif stres aynı zamanda yüksek sıklıktaki apoptoz ile tek ve çift zincir kırıklarıyla da orantılıdır. Genel olarak sperm DNA hasarı intratestiküler gelişim, matürasyon ve taşınma işlemi esnasında gelişebilmektedir.³³ Yüksek düzeydeki serbest oksijen radikalleri sperm kalitesi ve işlevi için toksiktir.⁴⁷ İnfertil erkeklerin %25-40'ında semedeki serbest oksijen radikal düzeyinin yüksek olduğu ve tek ve çift zincir kırıklarının artmasına yol açtığı bildirilmiştir.^{27,48}

Spermde DNA hasarına yol açan oksidatif stresin nedenleri arasında erkek üreme sisteminin antioksidan korumadan yoksun olması, enfeksiyon, ksenobiyotiklerin etkisi, spermatozoanın intrinsek serbest oksijen radikalleri üretimi ve çevresel faktörler yer alabilir.^{44,49}

KROMATİNİN PAKETLENMESİ SÜRECİNDE BOZUKLUK

Spermijenez işlemi sırasında DNA paketlenmesinde rol alan histon proteinlerinin büyük bölümünün varyantlarıyla yer değiştirmesinin sonucu olarak histonların asetilasyonu artar. Histonların hiperasetilasyonu kromatin yapısının gevşemesine yol açmaktadır. Gevşek kromatin yapısı topoizomeras kaynaklı zincir kırıklarını uyararak histonların ayrılmasını, önce geçiş proteinleri [transition proteins (TP)] ve daha sonrasında da protaminlerle yer değiştirmesini kolaylaştırmaktadır.⁵⁰⁻⁵² Bu kırıklar histonların fosforilasyonu ile işaretlenir ve spermatozoa spermijenez sırasında germinal epitelyumu terk etmeden topoizomeraslarca ortadan kaldırılır.⁵³ Normalde bu zincir kırıkları, gama H2AX (gamma-H2AX; H2A histone family, member X) tarafından histon fosforilasyonu ile işaretlenir ve spermatozoa germinal epitelyumdan salınmadan önce topoizomeras tarafından tamamen kararlı hale getirilir. Eğer bu tamir mekanizması herhangi bir nedenle çalışmazsa, spermde yüksek DNA hasarı oluşur.²⁷ Spermatozoada topoizomeras kaynaklı kırıkların bulunması spermijenez sırasındaki anormallikleri ve tamamlanma-

mış matürasyon işlevini göstermektedir.⁵⁴ Çift zincir kırıkları, erkek germ hattında kromozomların yoğun paketlenmesi sürecinde doğal olarak oluşmaktadır ve spermatogenezin bir parçasıdır.³⁰

BAŞARISIZ APOPTOZ

Germ hücreleri, matürasyon kazanmak için testiste yüksek oranda proliferasyon ve özgün hücrel farklılaşma geçirir. Apoptoz, sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda erkek germ hücre üretimini düzenler.^{55,56} Spermatogenez apoptoz ile kontrol edilmektedir.³³ Başarısız apoptoz teorisi Sakkas ve ark. tarafından 1999 yılında ortaya atılmıştır.⁵³ Spermatogenez süresince apoptoz, testiküler germ hücrelerinde endonukleaz aktivitesinin bir sonucu olarak gerçekleşmektedir. Bu durum daha çok, spermatogonya ve bölünen hücrelerde görülür ve çok sayıda DNA zincir kırığı ortaya çıkar. Teori ejakülattaki spermelerde sitoplazmik vakuoller gibi apoptotik belirteçlerin yanı sıra, Fas reseptörlerinin yüksek ifadesinin gösterildiği çalışmalara dayanmaktadır.⁵⁷ Hasarlı DNA'ya sahip, ancak apoptozun tamamlanamadığı bazı hücrelerin olgunlaşarak sperm popülasyonuna katıldığı öne sürülmüştür. Semende çekirdeksiz ve yuvarlak yapılı M450 olarak adlandırılan cisimcikler tanımlanmıştır. Bu cisimciklerin yarım kalan apoptozu dolaylı olarak destekleyen apoptotik cisimcikler olduğu düşünülmüştür. M450 cisimcikleri erkek genital sisteminin fizyolojik fagositik sürecindeki rölatif bozukluğu temsil eder. Yarım kalan apoptozun sperm DNA hasarı ile bağlantılı olduğu gösterilmiş, ancak apoptotik belirteçlerin ifadesiyle SDF arasındaki korelasyon tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.^{11,58}

Sonuç olarak, proliferasyon sırasında doğal olan bu sürecin tam işlememesi sonucu ejakülatta hasarlı DNA'ya sahip sperm bulunmakta.³⁰

SPERM DNA HASARI DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

DNA hasarını ölçmek için farklı yöntemler kullanılmaktadır.^{29,59,60} En sık kullanılan DNA hasarı tespit yöntemleri COMET, "terminal Deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)", sperm kromatin dağılımı [Sperm chro-

matin dispersion (SCD)] ve sperm kromatin yapı analizi [Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)]'dir.

Bu yöntemlerin çalışma prensipleri, hasar ölçümünde kullanılan yöntemler, avantaj ve dezavantajları Tablo 1'de görülmektedir.

COMET

Tek hücre elektroforez yöntemi olan COMET, klinik araştırmalarda DNA hasarını belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılır. Diğer DNA hasar yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha basit bir yöntemdir.⁶¹ Yöntemde sperm hücreleri çözünmüş agaroz ile karıştırılarak lamel üzerine yayılır. Sperm hücreleri daha sonra alkali koşullarda lizise uğrattılır, lizise uğrayan hücrelerin elektroforezi yapılır ve DNA floresan bir boya ile boyanır.⁶² Hasarlı hücreler mikroskop altında kuyruklu yıldız görünümüne sahiptir. Kuyruğun uzunluğu, kırık sayısı orantılı olarak artar. Yöntem aynı anda tek ve çift zincir kırıklarını ölçen hızlı ve hassas bir yöntemdir.¹¹

TUNEL

TUNEL yöntemi, kalıba bağımsız çalışan bir enzim olan terminal nukleotidil transferaz (TdT) katalizöründe, tek ve çift zincir DNA kırıklarında dUTP'nin inkorporasyon miktarını belirler.⁶³ TUNEL, DNA kırıklarını DNA'yı denatüre etme-

den, flow sitometri veya floresans mikroskop aracılığı ile doğrudan ölçme yöntemidir. Genellikle Br- dUTP, eşit olmayan DNA uçlarına katılarak DNA kırıklarını yansıtır. Işımanın yoğunluğu, doğrudan eşleşmemiş dUTP'lere, yani DNA'daki çentik sayısına karşılık gelir. Uygun bir protokolle pozitif hücrelerde yüksek yoğunlukta sinyal alınabilir. Bu protokollerde FITC, DAPI, PI gibi floresan boyalardan da yararlanılmaktadır. Böylelikle pozitif ve negatif hücreleri ayırt etmek kolaylaşır. TUNEL pozitif hücrelerin sayısı, toplam sperm sayısına bölünerek oranı hesaplanır. Bu metot, bir referans örnek gerektirmez, çünkü her bir numune kendisi için kontrol işlevi görebilir. TUNEL'in birçok avantajı vardır: az sayıda sperm yeterlidir, 200'den az sperm bile %5'ten az değişim katsayısı ile sonuç vermek için yeterli olabilmektedir. Analizler antifloresan antikolar kullanılarak ışık mikroskopunda yapılabilir. Birçok androloji laboratuvarı epifloresan mikroskop ve yüksek kalitede ışık mikroskopları donanımına sahiptir. Böylelikle TUNEL, fazla ek maliyet gerektirmeden androloji laboratuvarlarının testlerine dâhil edilebilir.^{58,64}

SPERM KROMATİNİN DAĞILIM TESTİ

SCD testi, ilk kez Fernandez ve ark. tarafından 2003 yılında sperm DNA'sı hasarı ölçümü için kullanılan bir metot olarak tanımlanmıştır. Test, denatürasyona bağlı olarak dağılmış DNA'nın oluşturduğu

TABLO 1: DNA hasarı tespit yöntemleri.

Teknik	Prensip	Ölçüm	Avantaj	Dezavantaj
COMET	DNA bütünlüğü, tek ve çift zincir kırıklarının kuyruklu yıldız görünümü göstermesi	Floresan mikroskop	TUNEL'e göre ucuz, hassas ve her bir hücredeki hasar oranı ölçmesi	Özel ekipman gerektirmesi, tecrübeye dayalı olması, standardize edilmiş yöntemlerin bulunmaması
TUNEL	DNA fragmantasyonu, tek ve çift zincir kırık ölçümü	Floresan mikroskop/ flow sitometri	Klinik açıdan uygun, yüksek hassasiyet ve özgünlük, flow sitometre ile yüksek sayıda inceleme şansı tanınması	Özel ekipman gerektirmesi, pahalı olması
SCD	DNA yapısının oluşturduğu karakteristik hale yapısı	Floresan mikroskop	SCSA'ya göre ucuz ve kolay bir işlem olması	Klinik anlamının yeterince açık olmaması
SCSA	Asit DNA denatürasyonu	Flow sitometri	Klinik olarak anlamlı yüksek hassasiyete ve özgünlüğe sahip olması, hata oranı düşük ölçüm yapabilmesi	Çok pahalı olması ve özel ekipman gerektirmesi

karakteristik hale (halo) yapısının hasarlı DNA'da daha küçük çaplı görüntülenmesi prensibine dayanır.⁵⁹ Tekniğin uygulamasında, mL'de 5-10 milyon sperm olacak şekilde hazırlanan sperm örnekleri kullanılır. Bu örnekler 37°C'de düşük erime sıcaklığına sahip agaroz ilave edilir ve önceden agarozla kaplanmış lam üzerine bu örneklerden pipetle damlatılarak slaytlar hazırlanır. Kısa bir süre düşük ısıda bekledikten sonra kimyasal işlem uygulanır.⁴³ Sperm DNA dağılımını gözlemek için spermere denatüre edici asit çözeltisinden sonra lizis tamponuyla muamele edilir.⁶⁵ DNA'da nüklear proteinler uzaklaştırıldıktan sonra haleler görüntülenir. Floresan mikroskopta görüntüleme için DAPI ile boyanır. Haleler, floresan veya ışık mikroskopunda skorlama yapılarak incelenir. Skorlama "geniş", "orta", "küçük derece" ve "DNA dağılım halesi gözlenmeyen" olmak üzere dört derecede belirlenir. İstatistiksel analizler kullanılarak skorlanan örneklerde DNA hasar oranı hesaplanır.⁴³ SCD, karmaşık ekipmanlara gerek duymayan, basit, hızlı, kesin ve tekrarlanabilir bir yöntemdir.⁶⁵

SCD sonuçları, altın standart olarak tanımlanan sperm kromatin yapı analizi SCSA ile karşılaştırıldığında daha ucuz ve iyi bir alternatif olarak gösterilmektedirler.⁶⁶ Ayrıca, SCSA, TUNEL ve SCD sonuçlarının birbiriyle yüksek uyumluluk gösterdiği bulunmuştur.⁵⁹

SPERM KROMATİNİN YAPI ANALİZİ

SCSA testi, Evenson tarafından 1980 yılında ortaya konan akış sitometrisi temellidir. Ayrıca, SCSA özel ekipman ve deneyimli personel gerektiren pahalı bir yöntemdir.⁶⁷

Çalışmanın temeli, Drazynkiewicz ve ark.nın yöntemi doğrultusunda, ısı ile denatüre edilen timus hücresi DNA'sının akrinin turuncusu ile bo-

yanması ve florometrik analizine dayanmaktadır. Bu çalışmada, akrinin turuncusunun, çift zincirli DNA'ya bağlandığında yeşil (515-575 nm), tek zincirli DNA'ya bağlandığında kırmızı (600-650 nm) floresans ışımaya yaptığı gösterilmiştir. Yöntemin sperme çeşitli hasarlar verilerek sınanmasının ardından, toksikoloji alanında ve androloji laboratuvarlarında infertilite tanısı koymaya yardımcı bir yöntem olabileceği belirtilmiştir.⁶⁷

Metodun uygulanmasında, sperm örneği gliserol içeren TNE tamponu içerisinde 2 milyon sperm/mL olacak şekilde seyreltikten sonra soğutulur. Soğutma işleminin ardından, DNA'nın kısmi olarak *in situ* denatürasyonu sağlanarak boyama işlemi gerçekleştirilir. Flow-sitometride çift ve tek zincirli DNA kırık oranını belirlemek için ölçüm yapılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilir.⁶⁸ Bu değerlendirmeler sonucunda DNA fragmentasyon indeksi [DNA Fragmentation Index (DFI)] (kırmızı/toplam kırmızı+yeşil) hesaplanır. Hücrelerin ne kadarının bu değerin dışında olduğu belirlenir.⁶⁹ Yöntemin tekrarlanabilirlik oranı %98-99'dur. Kullanılan farklı laboratuvar ve bilgisayar programlarının sonuçları arasında %98 örtüşme görülmektedir. Daha önceden fertil ve infertil erkekler için sırasıyla mL'de 90 ve 74 milyon sperm görülme oranı ile SCSA'daki hasarlı hücre oranının %30'un üzerinde olması durumunda infertilite görüldüğünün saptanması yöntemin gücünü göstermektedir.⁶⁹ SCSA flow-sitometri analizleri için SCSASoft adında bir yazılım geliştirilmiştir.⁷⁰ Altın standart olarak tanımlanan SCSA yönteminin, erkek infertilitesini anlamada kesin sınırları olan ve klinik açıdan anlamlı tek yöntem olduğu birçok çalışma ile desteklenmiştir.^{57,71,72} SCSA testinin dezavantajı, pahalı ve uzman personel gerektiren ekipmanlarla uygulanabilen bir yöntem olmasıdır.

KAYNAKLAR

- Devroey P. Updates in infertility treatment. *Reprod Biomed Online* 2009;18(Suppl 2):1-2.
- Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl* 2012;14(1):40-8.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012;62(2):324-32.
- Jarow J, Sigman M, Kolettis PN, Lipshultz LR, Nangia AK, Pins GS, et al. Genetic screening. The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement. *American Urological Association* 2010. p.20-3.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. p.70-107.
- Tavalaee M, Razaavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2009;91(4):1119-26.
- Güneş S, Asci R, Okten G, Atac F, Onat OE, Ogur G, et al. Two males with SRY-positive 46,XX testicular disorder of sex development. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59(1):42-7.
- Güneş S, Aşçı R. [Other chromosomal disorders cause male infertility]. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, et al, editörler. *Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi*. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi; 2013. p.713-31.
- Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(2):271-85.
- De Braekeleer M, Férec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod* 1996;2(9):669-77.
- Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I, Cambi M, et al. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl* 2012;14(1):24-31.
- 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.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int J Androl* 2008;31(6):537-45.
- Ford WCL. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl* 2010;12(1):59-63.
- Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA damage resulting from various sperm treatments persists after fertilization and is similar before and after DNA replication. *J Androl* 2012;33(2):229-38.
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000;45(3):215-25.
- Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986;105:1-65.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991;44(4):569-74.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12(4):417-35.
- Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982;93(2):298-305.
- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992;13(4):342-8.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987;236(4804):962-4.
- Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* 2000;151(7):1591-8.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005;26(6):741-8.
- Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006;27(6):890-8.
- Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998;13(4):11-9.
- Aitken R, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001;122(4):497-506.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004;81(5):1289-95.
- Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2008;127(2):115-23.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004;6(2):139-48.
- Zini A, Boman J, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23(12):2663-8.
- Agarwal A, Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 2004;56(3):235-45.
- Hwang K, Lipshultz LI, Lamb DJ. Use of diagnostic testing to detect infertility. *Curr Urol Rep* 2011;12(1):68-76.
- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009;74(4):789-93.
- Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009;30(3):219-29.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69(3):528-32.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;21(1):33-44.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000;21(6):903-12.
- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, et al. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Hum Reprod* 2008;23(5):1035-43.
- Ménézo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote* 2010;18(4):357-65.
- Derjck A, van der Heijden G, Giele M, Philippen M, de Boer P. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet* 2008;17(13):1922-37.
- Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernández JL, Gosálvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(3):213-23.

43. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9(4):331-45.
44. Aitken RJ, De Lullis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010;16(1):3-13.
45. Jones R, Mann T, Sherins RJ. Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sc* 1978;201(1145):413-7.
46. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979;31(5):531-7.
47. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002;23(6):737-52.
48. Padron OF, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Effects of cancer on spermatozoa quality after cryopreservation: a 12-year experience. *Fertil Steril* 1997;67(2):326-31.
49. Said TM, Agarwal A, Falcone T, Sharma RK, Bedaiwy MA, Li L. Infliximab may reverse the toxic effects induced by tumor necrosis factor alpha in human spermatozoa: an in vitro model. *Fertil Steril* 2005;83(6):1665-73.
50. Rousseaux S, Boussouar F, Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Curtet S, et al. Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Syst Biol Reprod Med* 2011;57(1-2):50-3.
51. Song N, Liu J, An S, Nishino T, Hishikawa Y, Koji T. Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta Histochem Cytochem* 2011;44(4):183-90.
52. Güneş S, Kulaç T. [The role of epigenetics in spermatogenesis]. *Turkish Journal of Urology* 2013;39(3):181-7.
53. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4(1):31-7.
54. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995;52(4):864-7.
55. Kocak I, Dundar M, Hekimgil M, Okyay P. Assessment of germ cell apoptosis in cryptorchid rats. *Asian J Androl* 2002;4(3):183-6.
56. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999;4(1):38-47.
57. Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 2011;13(1):69-75.
58. Schlegel PN, Paduch DA. Yet another test of sperm chromatin structure. *Fertil Steril* 2005;84(4):854-9.
59. 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;27(1):53-9.
60. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006;12(4):466-72.
61. Singh NP, Stephens RE. X-ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis* 1998;13(1):75-9.
62. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000;28(4):529-36.
63. 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(8):1945-51.
64. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* 2008;44(3):250-4.
65. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24(1):59-66.
66. Fernández JL, Muriel L, Goyanes VJ, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;48(4):833-42.
67. Evenson DP, Thompson L, Jost LK. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 1994;41(3):637-51.
68. Spanò M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in the human spermatozoa which underwent swim-up and cryopreservation, which were evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Reprod* 1999;5(1):29-37.
69. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 1991;5(2):115-25.
70. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14(4):1039-49.
71. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23(1):25-43.
72. Alkhayal A, San Gabriel M, Zeidan K, Alrabeeah K, Noel D, McGraw R, et al. Sperm DNA and chromatin integrity in semen samples used for intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet* 2013;30(11):1519-24.