

Erkek infertilitesinde spermatozoon DNA hasarının rolü ve önemi

Burcu YALÇIN¹, Mesut ÇEVİK¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Samsun/TÜRKİYE

Anahtar Kelimeler:

DNA hasarı
infertilite
spermatozoon

Key Words:

DNA damage
infertility
spermatozoon

Geliş Tarihi: 25.09.2018
Kabul Tarihi: 03.12.2018
Yayın Tarihi: 31.12.2018
Makale Kodu:463669

Sorumlu Yazar:
M. ÇEVİK
(cevikm@omu.edu.tr)

ORCID:

B. YALÇIN: 0000-0002-5728-1478
M. ÇEVİK: 0000-0002-0754-6116

ÖZ

Erkeğe bağlı infertilite, genetik ve epigenetik nedenlerden kaynaklanan karmaşık etiyojoloji, döl veriminin normal sınırlar altında bulunmasına sebep olan bir hastalıktır. İnfertilite ile spermatozoonun genetik yapısı arasında kuvvetli bir birliktelik bulunmaktadır. Çeşitli iç ve dış kaynaklı sebeplerden dolayı spermatozoonun Deoksiribo nükleik asit (DNA) yapısında farklı düzeylerde hasarlar meydana gelmektedir. İnfertil erkeklerde spermatozoon DNA hasarı yüksek olarak saptanmaktadır. Çeşitli DNA hasar tamir mekanizmaları DNA'da meydana gelen hasarın tipine uygun olarak devreye girmekte ve hasar tamirinin gerçekleştirilmesi sonucu genomik kararlılık korunmakta ve hücre yaşamını sürdürebilmektedir. Hasar nedenlerinin çoğalması, onarım mekanizmalarındaki aksaklıklar gibi nedenlerle hücre ölümü, fertilizasyon kapasitesinde azalma, spermatozoon genom bütünlüğünde bozulma, infertilite ve mutasyonlar meydana gelebilmektedir. Spermatozoon DNA'sında şekillenen bu hasarların tespiti amacıyla tek hücre jel elektroforezi, tunel, spermatozoon kromatin yapısı analizi gibi birçok metot kullanılmaktadır. Mevcut veriler ışığında, daha iyi kalitede spermatozoonlara sahip olan hayvanların seçiminde, reproduktif biyoteknolojiler ve yardımcı üreme tekniklerinde spermatozoon seçimi önemli olsa da, erkek infertilitesi tanı ve tedavisinde spermatozoon DNA hasarı olup olmadığının değerlendirilmesi ayrı bir önem arz etmektedir.

The role and importance of spermatozoon dna damage in male infertility

ABSTRACT

Infertility is a disease with complex etiology resulting from genetic and epigenetic causes, which causes the fertility to be under normal limits in males. There is a strong association between the infertility and the genetic structure of the spermatozoon. Due to various internal and external causes, different levels of damage can be occur in to the spermatozoon (Deoksiribo nucleic acid) DNA structure. Infertile men have high spermatozoon DNA damage.. Various DNA damage repair mechanisms are join in accordance with the type of damage that occurs in DNA and the completion of damage repair preserves the resulting genomic stability and can lead to cell survival. The causes of cell death, reduction in fertilization capacity, deterioration in the integrity of the spermatozoon genome, infertility and mutations can occur due to the proliferation of damage causes and deficiencies in repair mechanisms. Many methods such as the single cell gel electrophoresis, tunel, spermatozoon chromatin structure assay are used to measure spermatozoon DNA damage. In the light of existing data, although selecting quality of spermatozoa are important in reproductive biotechnology and assisted reproductive techniques, evaluating spermatozoon DNA damage is special importance in diagnosis and treatment of male infertility.

GİRİŞ

Erkeğe birçok in vivo ve in vitro çalışmada gösterilmiştir. Spermatozoon Deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarına bağlı olarak gelişen infertilite, genetik ve epigenetik nedenlerden kaynaklanan karmaşık etiyojoloji bir hastalıktır. Spermatozoonun genetik yapısındaki bozulma ile infertilite arasındaki ilişki, fertilizasyon şansının tahmin edilmesinde ve oluşan embriyonun maruz kalabileceği muhtemel risklerin belirlenmesinde önem kazanmaktadır (1, 2).

Günümüzde insanlar ve birçok hayvan türü için spermanın manipülasyonları, in vitro fertilizasyon, klonlama ve transgenезis gibi reproduktif biyoteknolojilerin etkin şekilde kullanımı büyük önem kazanmıştır. Dolayısıyla, sperma kalitesinin ve

fertilizasyon yeteneğinin tam olarak değerlendirilmesinde spermatozoon DNA bütünlüğünü değerlendiren testler daha çok ön plana çıkarılması yönünde bir eğilim oluşmuştur. Spermatozoon DNA bütünlüğünü değerlendiren testler özellikle daha iyi kalitede spermatozoonlara sahip olan hayvanların seçiminde önemli bir role sahip olup, aynı zamanda yardımcı üreme tekniklerinin uygulandığı durumlarda spermatozoon seçiminde başvurulması gereken testlerdir (1, 2, 3).

Bu derlemenin amacı; spermatozoonun fertilite potansiyelinin temel belirleyicisi olan DNA yapısını güncel verilerin ışığında incelemek, spermatozoon DNA'sında oluşan hasarların fertilite açısından önemini ve bu hasarı oluşturan faktörleri ortaya koymak olmuştur. Ayrıca, bu hasarların erkek damızlık-

ların fertilité potansiyeli üzerindeki etkilerinin değerlendirmesi konusunda tespit ve önerilerde bulunulmuştur.

Spermatozoon ve DNA Yapısı

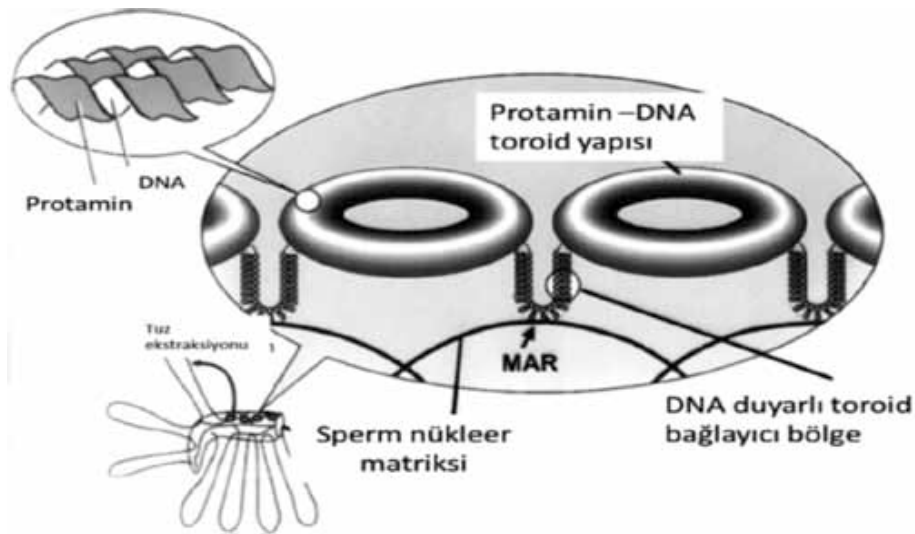
Erkek üreme hücresi ilk kez Johan Hamm ve Leeuwenhook (1677) tarafından gözlenmiş ve mikroskopik görünümü tarif edilmiştir. Ancak, bu araştırmacılar spermatozoonların fertilitasyondaki rolünü yanlış anlamışlardır. Onlara göre spermatozoonlar minyatür insan şekillerini taşımakta ve bunlar dişi üreme kanalında büyüyüp gelişmekteydi. Erkek üreme hücresi başlangıçta bir hayvancığa benzetilmiş ve Karl Ernst V. Baer (1827) tarafından “spermatozoon” adı verilmiştir (4). Spermatozoon DNA’sı, benzersiz bir biçimde kompakt haldedir ve somatik hücrelerinkinden büyük ölçüde farklı olarak organize edilmektedir. Bu DNA organizasyonu, çok sıkı sarılmış genetik bilginin oosite aktarılmasını sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda DNA’nın gelişmekte olan genetik bilgiye erişebilmesi için embriyolara uygun fiziksel ve kimyasal bir biçimde verilmesini sağlamaktadır (5). Ward (1997) yapmış olduğu çalışmaları ve diğer araştırma temellerini baz alarak spermatozoon DNA paketlemesi için Şekil 1’de de gösterilmiş olan bir model sunmuştur. Bu modelde, olgun spermatozoonun DNA paketlenmesinde; (I) Nükleer halka tarafından kromozomal bağlanma, (II) spermatozoon DNA halka alanı organizasyonu, (III) protamin dekondeksasyonu ve (IV) kromozom organizasyonu olmak üzere dört aşama belirtilmektedir. Sunulan bu modelde, spermatozoon çekirdeğinin organizasyonunun karmaşıklığına vurgu yapılmakla birlikte, DNA’daki anormalliklerin genel olarak nükleer organizasyonda bozulmalara sebep olabileceği varsayımı da desteklenmektedir (6). Spermatozoon nükleusunda paternal genom fonksiyonel olarak durağan kalmakta ve DNA’sını protaminlerle paketledikten sonra bu durumunu korumaktadır (7). Bu durum, spermatozoonun nükleer hacminde dikkat çekici bir azalma ile fark edilen morfolojik değişimle belirgin hale gelmektedir. Oluşan bu değişikliklere rağmen, hem insan hem de hayvan spermatozoonu genomu boyunca tesadüfi olmayan bölgelerinde düşük seviyede nükleozomlarla

(histonlar) paketlenmiş olarak kalır (8).

Spermatozoonun Genetik Yapısındaki Hasarlar ve Önemi

1990’lı yıllardan beri DNA hasarlarının kökeni olarak düşünülen kromatin paketlenmesi ile ilişkili 3 yaklaşım öne sürülmüştür. Bunlardan birincisi, DNA hasarı ve zayıf kromatin paketlenmesi arasında nedensel bir ilişki bulunmasıdır. Bu yaklaşımda, spermiyogenezis sırasında ortaya çıkan hatalar sebebiyle, zayıf sıkıştırılmış spermatozoon kromatin paketlenmesine yol açarak, spermiyasyon ve ejakülasyon arasındaki bir noktada DNA parçalanmasına duyarlılık durumu oluşmaktadır. İkincisi, DNA hasarı ve zayıf kromatin paketlenmesi arasındaki bağımsız bir ilişkidir. Bu yaklaşımda, spermatozoon hücrelerine özgü epigenetik düzenlenmenin (protaminasyonun) ve DNA parçalanmasının, spermiyogenezisin altında yatan kalitesini yansıtan bağımsız fenomen olduğunu kabul eder. Buna göre; DNA paketlenmesi ile ilişkili olarak torsiyonel stresi gidermek için spermatidlerde fizyolojik olarak DNA kırıkları oluşur, gama H2AX (gamma- H2AX; H2A histonu ailesi, X üyesi) tarafından histon fosforilasyonu ile işaretlenir ve spermatozoa germinal epitelyumdan salınmadan önce topoizomeraz tarafından tamamen kararlı hale getirilir (9). Üçüncüsü ise DNA hasarı ve kromatin paketlenmesi arasındaki ilişki bir artefaktır. Bu yaklaşımda, ilk çalışmalardaki DNA hasarı tespitlerinde kullanılan yöntemlerde bir DNA sekansının hedef nükleotidlerini etiketlenmiş analoglarıyla değiştirmek için enzimlerin kullanımına bağlı olması gerçeğine dayanmaktadır.

Bu üç yaklaşımdan hangisinin doğru olduğunu aydınlatmak için germ hattında DNA hasarının indüklendiği mekanizmaların incelenmesi gerekmektedir (9). Ejakülattaki spermatozoon DNA hasarından sorumlu faktörler halen tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Spermatozoonda oluşan DNA hasarına insan ve fare, at, domuz, balık gibi pek çok hayvan türünde rastlanmaktadır (10). DNA’da oluşan bu hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış



Şekil 1 Spermatozoon DNA paketlenmesi.
Figure 1 DNA damaging of sperm.

eşleşme ve tubulin polimerizasyonunun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları, DNA da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır. DNA hasarıyla karşılaşan bir hücre için üç seçenek vardır. Birincisi, apoptotik yolu aktive etmektir. Bu aktivasyon hücreleri yok edecek ve canlılığı zayıflatarak hücre ölümüne yol açacak olan bir süreçtir. İkinci seçenek, oluşan hasarı tolere etmeye çalışmak olup, bu seçenek yeni nesillerde mutasyona neden olabilmektedir. Üçüncü ve en iyi seçenek ise hasarı onarmaktır. Bu onarım sistemleri, organizmaları korur ve genomik bütünlüğün korunması için kısa sürede hasarı neredeyse tamamen onarır. Zaten onarılamayacak durumda ise hücrenin direkt olarak apoptozis ile ölüme gitmesi kaçınılmazdır (11, 12).

Spermatozoon DNA Hasar Sebepleri

Spermatozoon kromatin/DNA yapısında meydana gelebilecek hasarların aşağıda belirtilen potansiyel sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İç Kaynaklı Sebepler

Olgun spermatozoonun sıkıştırılmış kromatininde DNA-DNA veya DNA-protein krossing over oluşması somatik hücrelere göre daha fazla şekillenmektedir. DNA hasarlı spermatozoa popülasyonlarında çapraz bağlanmış kromatine sıklıkla rastlanılmaktadır ve moleküler ölçüde temeli halen daha tam olarak bilinmemektedir (13). Kromatin paketlenmesi, histonların hiperasetilasyonu ile kromatini gevşetmek ve topoizomeraz tarafından kırılmalarını başlatmak için endojen nükleaz aktivitesine ihtiyaç duyan bir adımı içermektedir. Epididimal taşınma sırasında yeni protamin çekirdeği etrafındaki kromatin paketlenmesi tamamlanarak DNA bütünlüğü eski haline getirilmektedir. Bununla birlikte, geçici kırılmalar onarılamazsa, ejakülattaki spermatozoonlarda DNA kırılma hasarları oluşabilmektedir (13, 14). Spermatozoon protamin ekspresyonundaki değişiklikler erkek infertilitesiyle doğrudan ilişkilidir. Geç spermiyogenezis sırasında çok aşamalı bir süreçle % 85-95 oranında histonların yerini protaminler almaktadır. Histonlar hiperasetilasyon altında olup, öncelikle testislere özgü histonlarla ve ardından da geçiş proteinleriyle yer değiştirmektedir. Daha sonrasında geçiş proteinleri Protamin 1 (P1) ve 2 (P2) ile değiştirilir. P1 ve P2 normal olarak spermatozoonlarda 1: 1 oranında ifade edilmektedir ve spermatozoon DNA'sının sıkı bir şekilde paketlenmesini sağlarlar (15). Anormal derecede yüksek veya düşük P1/P2 oranları ile spermatozoon DNA hasarlarında artış, fertilizasyon oranlarında, embriyo kalitesinde bozulmalar ve düşük gebelik oranları arasında kesin olarak ilişki bulunduğu bildirilmektedir (16). Erkek germ hücreleri transkripsiyonel ve translasyonel olarak sessiz olduklarından dolayı, bu hücreler yüksek oranda farklılaşmış spermatidlere dönüşürlerken, apoptozis ile programlanmış hücre ölümüne maruz kalmaları giderek azalmaktadır. Hücre ölümüne sebep olarak apoptotik cevap oluşturarak farklılaşan haploid germ hücreleri çekirdek içinde DNA hasarına neden olan süreci kısıtladıklarında, fertilizasyon yeteneğini kaybetmemiş olgun spermatozoonlar oluşabilmektedir (17).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) fizyolojik düzeyleri somatik hücrelerde olduğu gibi spermatozoon fonksiyonlarının düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadır. ROS türleri oldukça

reaktifdir ve DNA molekülü de dahil olmak üzere herhangi bir hücre yapısına direkt olarak zarar verebilir. Spermatozoonların karışık biyokimyasal yapısında ROS'lar sinyal dönüştürücüler olarak önemli görevler üstlenmektedir. Olgunlaşma, hiperaktivasyon, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi olaylarda ROS'un katkı sağladığı bilinmektedir (18). Spermatozoon fonksiyonları üzerinde önemli görevlere sahip olan ROS, organizmada antioksidan savunma sistemlerini aşan düzeylere ulaştığında patolojik etki göstermektedir. Spermatozoon DNA'nın sıkıca paketlenmesi ve seminal plazmada antioksidanların bulunması, spermatozoon DNA'sının ROS saldırılarına karşı korunduğu teorisine rağmen yine de oksidatif stresin DNA hasarlarına neden olduğu ve bu hasarların da erkek infertilitesinde önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir (18, 19). Ayrıca son yıllarda yapılan araştırmalarda, yüksek ROS seviyeleri üreten olgunlaşmamış spermatozoonların, olgun spermatozoonlarda DNA hasarında artışa neden olduğunu önemle vurgulanmaktadır. Bu hasar, semifer tübüllerden epididimise spermasyon sonrasında ve ejakülasyon sonrasında ortaya çıkmaktadır. ROS spermatozoon DNA'sına doğrudan veya dolaylı olarak kaspaz veya endonükleaz aktivasyonları yoluyla zarar verebilir. Olgunlaşmamış spermatozoonların, olgun spermatozoonlar ile birlikte santrifüj edilmesi olgun spermatozoonlarda DNA hasarına neden olabilir, çünkü bu koşullar altında olgun ve olgunlaşmamış spermatozoonlar yakın temas halindedir (19).

Dış Kaynaklı Sebepler

Sperma alma yöntemleri (suni vajen, elektrojakülasyon vb.), sperma alma mevsimi (mevsimsel kızgınlık gösteren hayvanlarda sezon içi ya da dışı durumu), sulandırıcılar ve ön işlem prosedürleri (yıkama protokolleri) spermatozoon DNA kalitesi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Yetiştirme mevsiminde alınan ve uygun sulandırıcılarla sulandırılan sperma örneklerinde ve sperma alma yöntemi olarak suni vajen ile toplanan ejakülatlarda daha iyi spermatozoon kalitesi gözlemlendiği bildirilmektedir (20). Ancak, türler arasında ve hatta aynı türün bireyleri arasında da çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Tüm türlerde, ejakülasyon sonrası spermada bakteri üremesi nedeniyle spermatozoon DNA hasarında belirgin bir artış oluşmakta ve bu nedenle uygulanan antibiyotik ilavesi ile enfeksiyona bağlı olarak oluşan DNA hasar düzeyleri de azaltılabilmektedir (21). İn vitro fertilizasyon uygulamalarının spermatozoon DNA'sına zarar vermediği gibi histon içeriğini de etkilemediği bildirilmiştir. Ayrıca in vitro embriyo üretimi amaçlı spermada daha yüksek motilite oranı sağladığı ve DNA hasarını azalttığı için Percoll ve Swim-up separasyon tekniklerinin kombinasyonu önerilmektedir (2, 22). Yapılan çalışmalar, geyik ve domuz gibi türlerde cinsiyet tayini yapılmasının spermatozoonların DNA kalitesini etkilemediğini göstermiştir. Ancak, boğa sperması üzerine çalışmalar halen devam etmektedir (23). Spermatozoon DNA'sına kriyoprezervasyon ve depolama sıcaklığının etkisi birçok türde incelenmiş ve soğutma aşamasında uygulanan 5-15°C arasındaki sıcaklıkların, 20-37°C aralığındaki gibi daha yüksek sıcaklıklara oranla spermatozoon DNA'sını uzun süre koruduğu bildirilmektedir. Ortam sıcaklığı arttıkça aygır, tavşan, köpek ve boğa spermatozoonlarında DNA hasarının arttığı bildirilmektedir (24). Spermanın kriyoprezervasyon aşamasından önce ve sonra spermatozoon DNA hasarı üzerine

yapılan farklı çalışmalarda, kriyoprezervasyonun DNA hasarına sebep olduğu belirlendiği için dikkatle ele alınması gereken bir konudur. Şimdiye kadar analiz edilen tüm memeli türlerinde gözlemlenen, spermatozoon DNA kalitesinin diferansiyel ve türe özgü dinamik kaybının, reproduktif sonuçlar üzerine negatif etkiye sebep olabileceği unutulmamalıdır (25). Bazı aşilar negatif olarak spermanın DNA kalitesini etkileyebilmektedir. Subkutan olarak uygulanan Miloxan'ın (*Clostridium perfringens* tip C, D ve *C. oedematiens* tip B) koç spermasında DNA hasarlı spermatozoon yüzdesini 10 kat artırdığı kanıtlanmıştır. Bu nedenle aşılama en az bir ay sonrasına kadar sperma örneklerinin toplanmasından kaçınılmalıdır. Ancak, bu negatif etki geri dönüşümlü olabilmektedir (26).

DNA Hasarının Tamir Mekanizmaları

Memeli germ hücrelerinde bilinen ana tamir mekanizmaları; (a) nükleotid eksizyon tamiri, (b) baz eksizyon tamiri, (c) uyuşmazlık onarımı, (d) replikasyon sonrası tamir ve DNA çift zincir kopma onarımı'dır. Son yıllarda DNA sarmal kırıklarının tamir mekanizması ve biyolojik önemi ile ilgili önemli yeni bilgiler elde edilmiş ve DNA sarmal kırıklarının oldukça toksik bir DNA lezyonu olduğu tanımlanmıştır. Çünkü kromozom parçalanmasına, kromozom etki kaybına, translokasyonlara veya farklı genom düzenlenmelerine neden olabilirler (11). DNA hasar tamiri için çeşitli yollar gelişmiştir. Memeli hücrelerindeki en önemli DNA hasar tamir mekanizmaları, homolog olmayan uçların birleştirilmesi ve homolog rekombinasyonu'dur. Homolog rekombinasyonu hasarsız bir tamir şablonu kullanılarak doğru DNA hasarı onarımı sağlarken, homolog olmayan uçların birleştirilmesi ile doğru bir onarım sağlanamaz. Her iki yol da memelilerde aktif olsa da, iki onarım yolunun genom stabilizasyonuna göreceli olan katkısı farklı hücre tiplerinde değişiklik göstermektedir.

Tamir mekanizmalarının biyolojik önemi üzerinde durulduğunda tamir mekanizması spermatogenezis sırasında ve döllenmiş oosit ile erken embriyonik gelişim sırasında olmak üzere 2'ye ayırıp incelenebilir (21).

Spermatogenezis Sırasındaki Tamir Mekanizması

Bilindiği üzere spermatogenezis üç farklı aşamadan oluşur. Birincisi, spermatogoniaların mitotik bir seri bölünmeler sonucu primer spermatositlerin olduğu spermatositogenezis evresidir. İkinci aşama, primer spermatositlerin mayotik bölünmeler ile haploid spermatidlere dönüştüğü aşamadır. Spermiyogenezis olarak adlandırılan üçüncü aşama ise spermatidlerin olgun spermatozoonlara dönüşüm evresidir. Bu nedenle, germ hücrelerinin olgunlaşması haploid gamet üretmek için kromatinin yeniden modellenmesi gerektiren olağanüstü genomik bir yapılanmayı gerektirir (27). Bu işlem sırasında histonlar DNA'dan çıkarılır ve önce TP1 ve TP2 geçiş proteinleri ve ardından P1 ve P2 protaminleri ile yer değiştirirler. Olgun bir spermatozoonda, spermatozoon genomunun sadece küçük fakat iyi tanımlanmış fraksiyonu histon ile ilişkide kalır. Spermatozoonda anormal şekilde yüksek histon miktarı varlığı, o hücrelerin fertilizasyon potansiyelinin azalması ve fertilizasyon sonrası embriyonik ölüm riskinin artması ile ilişkilendirilebilir (28). Dolayısıyla, spermatozoonlarda histon tutulumu ve protamin eksikliği idiyopatik infertilitenin sebeplerinden kaynaklı olabilir, ancak bu sebeplerin altında yatan genetik ve mekanik

nedenler halen belirsizdir. Spermiyogenezis sırasında histondan protamin bazlı kromatin'e geçiş aşamasında DNA zincirinde kırılmalar geçici fizyolojik bir durumla ilişkilendirilir. Bu DNA zincirindeki geçici kırılmalar spermiyogenezis boyunca tüm spermatidlerde devam eder ki bu kırılmalar spermiyogeneziste nükleoproteinlerin değişimi sırasında DNA'nın gevşemesiyle ilişkilidir (29).

Oosit ve Embriyonik Gelişim Aşamasındaki Tamir Mekanizması

DNA hasarlı spermatozoon, içinde bulunduğu hasarlı duruma rağmen fertilizasyon ve gelişim potansiyeline sahip olabilir. Spermatozoon DNA parçalanma seviyesine bağlı olarak üç durum beklenebilir: bazı durumlarda oosit tamir mekanizmaları, DNA hasarını onarmak için yeterli olmayabilir ve embriyonun uterus içerisinde gelişmesi ve implantasyonu başarısızlıkla sonuçlanabilir ve sonraki aşamada abort oluşturabilir. Oluşan hasarın gametogenez DNA onarımından kurtulması veya spermatozoon hücrelerinde ekzojen faktörlerden zarar gelmesi durumunda hasar fertilizasyon boyunca başarıyla onarılabilir (30). Henüz fertilize olmuş bir embriyoda DNA hasarının tamiri, yumurtlamadan önce oositte biriktirilen ve depolanan maternal mRNA'lar ve proteinler sayesinde DNA tamir genleri, memeli gelişiminin ilk evrelerinde etki etmektedir. Oosit yeterince donanımlı değilse veya zigot tamir geninin etkisi doğru zamanda başlamazsa, embriyoların ölüme gideceği kesin bir durumdur. Genomun bütünlüğü, embriyonik gelişim sırasında daha büyük bir risk altındadır ve DNA safhalarının bu erken evrelerdeki etkinliği bir organizma için büyük önem taşımaktadır (31).

Spermatozoon DNA Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

DNA bütünlüğünü ölçen birçok test mevcuttur. Bu testlerde, spermatozoon DNA bütünlüğünü ölçmek için kullanılan mekanizmalar farklılık gösterse de genel olarak birbirleri ile korelasyon göstermektedir. Çeşitli testler kullanılarak DNA bütünlüğünün tespiti ve karakterizasyonu ile sperması iyi dondurulabilir özellikte olan boğaların seçimi ve aynı zamanda DNA hasarıyla ilişkili olma olasılığı yüksek çeşitli protokollerin tanımlanması kolaylaşır. Böylece, sperma depolama prosedürlerinin geliştirilmesine olanak sağlar (32).

Tablo1 DNA hasarı tespit yöntemleri.

Table 1 Methods for the determination of sperm DNA damage.

Teknik	Prinsip	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 oranını ölçmesi	Özel donanım 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 donanım gerektirmesi, pahalı olması
SCD	Asit solüsyon, DNA denatürasyon, DNA yapısının oluşturduğu karakteristik halo yapısı	Floresan mikroskop	SCSA'ya göre ucuz ve kolay bir işlem olması	Klinik anlamının yeterince açık olmaması
SCSA	Asit solüsyon, akrinin turuncu, DNA denatürasyonu	Flow sitometri	Klinik olarak anlamlı yüksek hassasiyete ve özgünlüğe sahip olması, hata oranı düşük ölçüm yapabilmesi	Çok pahalı olması ve özel donanım gerektirmesi

COMET: Tek Hücre Jel Elektroforezi, TUNEL: Sperm DNA Hasar Testi, SCD: Spermatozoon Kromatin Dağılımı, SCSA: Spermatozoon Kromatin Yapı Analizi

Spermatozoon DNA Hasarının Fertilite Üzerine Etkileri

Erkek infertilitesinin başlıca genetik nedenleri arasında somatik ve mayotik hücrelerde yer alan kromozomal anomaliler ve gen mütasyonları yer almaktadır. Bu nedenler arasında erkek gametlerindeki DNA kusurları, histon ve DNA'daki epigenetik değişiklikler, baz değişiklikleri ve DNA fragmentasyonu ya da DNA hasarı yer alabilir (1). Spermatozoon DNA hasarı etiolojisinde iç ve dış kaynaklı çeşitli sebepler rol oynamaktadır (33). Seminal plazmadaki antioksidanların mevcudiyeti ve DNA'nın sıkı yapıda olması, spermatozoonun çekirdek DNA'sının ROS saldırılarına karşı korunduğu teorisine rağmen yine de ROS'un ve apoptosisin DNA hasarlarına neden olduğu ve bu hasarların da erkek infertilitesinde önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir (18). Erkek fertilitesini korumak ve aynı zamanda hayvan türlerinde genetik iyileştirmeyi sağlayabilmek için kriyoprezervasyon işleminin spermatozoon DNA yapısının olumsuz şekilde etkileneceği unutulmamalıdır (25).

Spermatozoon DNA hasarı, hem doğal gebelik hem de in vitro fertilizasyon veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda gebelik olasılığını azaltmakta ve erken gebelik kayıplarını artırmaktadır (33). Spermatozoon DNA bütünlüğünün korunmuş olması, başarılı bir gebelik ve genetik materyalin sonraki kuşaklara taşınması açısından büyük önem taşır. Üremeye yardımcı

tekniklerin kullanımının ardından tekrarlayan başarısızlıklar erkek faktörünün önemini ortaya koymuştur. DNA bütünlüğü korunmamış bir spermatozoon ile oositin fertilize edilebilmekle birlikte, gebelik oluşması ve gebeliğin devamının gerçekleşmesi olasılığının çok düşük olduğu unutulmamalıdır. Tüm bu nedenlerle; erkek infertilitesinin tanı ve tedavisinde spermatozoon DNA hasarı olup olmadığının değerlendirilmesi ayrı bir önem taşımaktadır (2, 33).

SONUÇ

Sonuç olarak, spermatozoon DNA kalitesi, genetik materyali gelecek kuşaklara aktarmak için hayati önem taşır. Sperm DNA bütünlüğündeki değişiklikler, embriyonun ve dolayısıyla yavru anormalliklerinin gelişmesinden sorumlu olabilmektedir. Spermatozoon DNA hasarını ölçmek amacıyla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Mevcut testleri kullanarak DNA hasar değerlendirmelerinin yapılmasına karşılık, evrensel olarak kabul edilen klinik eşiklere yol açabilecek standart testlerin ve protokollerin geliştirilmesi için yeterli kaynak mevcut değildir. Bu kaynakların elde edilmesiyle spermatozoon DNA hasarlarının üreme sonuçlarındaki rolü etkin bir şekilde kavranacaktır. Son çalışmalar, spermatozoon fonksiyonunu düzenleyen moleküler mekanizmaların aydınlatılmasıyla yeni tanısal testlerin geliştirilebileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Jarow J, Sigman M, Kolettis PN, Lipshultz LR, Nangia AK, Pines GS, et al. Genetic screening: The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement. American Urological Association 2010; 20-3.
- Lewis SE, Agbaje IM. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis* 2008; 23(3): 163-70.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reproductive Biomedicine Online* 2007; 14(6): 734-45.
- Hassa H. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. 1. Baskı. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları. Eskişehir 2003; s: 127-165.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction* 1991; 44: 569-574.
- Ward WS. Chromosome organization in mammalian sperm nuclei. *Genetics of Human Male Infertility* 1997; 205-221.
- Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *Journal of Biology Chemistry* 2003; 278: 29471-7.
- Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics* 2001; 28: 102.
- Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G. DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biology Reproduction* 2008; 78: 324-332.
- Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2006; 20(1): 85-95.

11. Brugmans L, Kanaar R, Essers J. Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. *Mutation Research* 2007; 614: 95–108.
12. Menezo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos. *Zygote* 2010; 18: 357–365.
13. Bennetts LE, de Iuliis GN, Nixon B, Kime M, Zelski K, McVicar CM, Lewis SE, Aitken RJ. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: Evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutation Research* 2008; 641: 1–11.
14. Mengual L, Ballecá JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls. *Journal of Andrology* 2003; 24: 438–447.
15. 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. *Journal of Andrology* 2001; 22: 604–610.
16. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive Biomedicine* 2011; 23: 724–734.
17. Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W, Bizzaro D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: Did apoptosis fail? *Human Fertility* 2004; 7: 99–103.
18. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology* 2010; 48(5): 425–35.
19. Oehninger SC, Kruger TF. Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi. Çeviri Editörü: Doç. Dr. Mete Kilciler, Habitat Matbaası, İstanbul 2009; s: 1-240.
20. Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Bisbal A, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproductive Science* 2012; 132: 88–95.
21. González-Marín C, Roy R, López-Fernández C, Diez B, Carabaño MJ, Fernández JL, Kjelland ME, Moreno JF, Gosálvez J. Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Animal Reproduction Science* 2011; 123: 139–148.
22. Jayaraman V, Upadhyaya D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *Journal of Assisted Reproduction Genetics* 2012; 29: 557–563.
23. De Ambrogi M, Spinaci M, Galeati G, Tamanini C. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 2006; 66: 1994–2000.
24. Lo CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology* 2002; 57: 1135–1142.
25. Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EL, Serafini PC, Smith GD. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* 2010; 94: 2626–2630.
26. Gosálvez J, Vázquez JM, Enciso M, Fernández JL, Gosálbez A, Bridle JR, López-Fernández C. Sperm DNA fragmentation in rams vaccinated with miloxan. *Open Veterinary Science Journal* 2008; 2: 7-10.
27. Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, 2005;434: 583–589.
28. Carrell DT, Hammoud SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Molecular Human Reproduction* 2010; 16: 37–47.
29. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human Spermiogenesis: New Insights in Stage Specificity and Link to Chromatin Remodeling. *Biology of Reproduction* 2004; 70-4,910-918.
30. Tomar DME, Chamberlin J, Allen L, Olson S, Donlon T, Barton S, Sheehy R, Waggoner D. Preferential paternal origin of de novo structural chromosome rearrangements. *American Journal of Human Genetics* 1984; 36: 115.
31. Jurisicova A, Latham KE, Casper RF, Casper RF, Varmuza SL. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Molecular Reproduction and Development* 1998; 51: 243–253.
32. Lone SA, Shah N, Yadav P, Aurif Wagay M, Singh A, Sinha R. Sperm DNA Damage Causes, Assessment and Relationship with Fertility. *Theriogenology* 2017; 7(1): 13-20.
33. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism* 2011; 25(2): 271-85.