

Konu 8

Sperm DNA Hasarları

Dr. Sena E. AYDOS

Erkek infertilitesi kompleks bir hastalık olup, çeşitli patolojileri içermektedir. Sperm kromatin anormalliklerinin sperm fonksiyonları üzerine etkisinin incelenmesi infertilite çalışmalarının alanlarından birini oluşturmaktadır. Sperm nuklear DNA hasarları ile infertilite, gebelik oluşumu arasında birliktelik olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (1-5). Zini; denatüre ve fragmente DNA taşıyan spermatozoa oranlarının sperm parametrelerindeki bozulma ile anlamlı bir ilişki gösterdiğini, infertil erkeklerde (sırasıyla %25 ve %27) fertillere göre (sırasıyla %10 ve %13) daha yüksek bulunduğunu ($p=0.028$ ve $p=0.016$) bildirmektedir (6). Elde edilen sonuçlar, fertillite potansiyelinin belirlenmesinde sperm DNA'sının sağlamlılığının değerlendirilmesinin standart sperm analizi sonuçlarından daha anlamlı olduğunu düşündürmektedir. İdiopatik infertilite olguları ile karşılaştırıldığında normospermik fertil erkeklerin spermalarında DNA hasarı bulunma oranları anlamlı ölçüde azalmaktadır (7). Ayrıca, veriler, tubal obstrüksiyon gibi kadın faktörü bulunan infertilite olgularında erkeklerin de önemli bir kısmında DNA hasarlı sperm oranının yüksek olduğunu ortaya koymuştur (8). Bu sonuçlar, şiddetli kadın faktörü olgularında aslında erkeğe ait faktörlerin de eşlik edebileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

Sperm DNA hasarlarının oluşumunda başlıca üç önemli mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan ilki matur spermde anormal kromatin, paketlenmesi olup yapılan çalışmalarda, sperm DNA hasarlarının çoğunun spermde anormal kromatin paketlenmesine bağlı olduğu gösterilmiştir (9-11). Sperm DNA hasarının görülmesine neden olan diğer mekanizma, spermatogenezis sırasında hasarlı germ hücresinin genetik havuzdan fonksiyonel olarak elimine olabildiği programlı hücre ölümü olan apoptozisten, hasarlı DNA'ya sahip spermatozoaların kaçmasıdır (abortive apoptozis) (12-14). Üçüncü mekanizma ise kötü semen kalitesine eşlik eden, özellikle azalmış protaminasyon ve disülfid bağ yapımı varlığında reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesinin neden olduğu sperm DNA hasarıdır (15).

Ayrıca ilerleyen baba yaşı, lökosperminin eşlik ettiği genital sistem infeksiyonları, xenobiyotik maruziyeti sperm DNA hasarlanmasına yol açabilen önemli nedenler arasında ele alınmaktadır (16).

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) döneminde bu verilerin önemi, hasarlı DNA'nın fertilizasyonu önlemeyeceği ve neticede bu genetik materyali taşıyan embriyoların oluşabileceğinin vurgulanmış olmasıdır (15,17).

Doğal yolla gerçekleştiği zaman, fallop tüplerine tutunan spermatozoalar tutunmayanlara göre daha fazla oranda sağlam DNA'ya sahip bulunmaktadır (18). Buda in vivo fertilizasyon sırasında doğal olarak DNA'sı sağlam sperm seçildiğini göstermektedir. Oysa IVF/ICSI sırasında sperm seçimi randomize yapıldığı için ve özellikle semen değerleri bozuk olan erkeklerde hasarlı genetik materyal taşıyan hücre sıklığı da artmış olacağından, bunlarda DNA hasarlı hücre kullanma riski de ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, ejakulatta DNA hasarlı spermatozoa oranının bilinmesi gerek fertilizasyon şansının tahmin edilmesinde gerekse embriyonun maruz kalabileceği risklerin belirlenmesinde önem kazanmaktadır.

Memeli sperm kromatini yapı ve kompozisyon bakımından somatik hücrelerden farklıdır. Sperm kromatin yapısı erkek ve dişi üreme kollarından geçerken, paternal genomun genetik

başarılı embriyo gelişimini engelleyebileceğini önermiştir (63). Seli ve ark yaptıkları çalışmanın sonuçları da bu düşünceyi destekler nitelikte olup, sperm DNA hasarının embriyo gelişiminin blastosist safhasına ilerlemesini etkilediğini ortaya koymuştur (61). Sonuçlar, bugün için yaygın olarak kabul edilen embriyo gelişiminin ilk basamaklarının maternal kontrolde olduğu, paternal genlerin ekspresyonunun 4-8 hücreli evrede başladığı dolayısıyla paternal DNA'da meydana gelen değişikliklerin bu evrede etkili olup, başarılı embriyo gelişimini engelleyebileceği görüşünü desteklemektedir (62).

Bütün bu veriler infertilite olgularında sperm DNA hasarlarının önemli bir faktör olabileceğini vurgulamaktadır. Defektif genetik materyalin yeni doğana aktarılması olasılığı ise ayrıca önemlidir. Ancak günümüzde DNA üzerinde yapılan testlerden elde edilen sonuçlar fertilizasyon ve sonrası olaylar hakkında sadece tahmini fikir vermektedir. Çünkü, her ne kadar laboratuvar çalışmalarında güvenilirliği yüksek testler kullanılarak bu hasarlar gösterilebilse de, fiksasyon, denatürasyon ve boyama işlemleri sırasında hücrede kalıcı dejenerasyon oluşturduklarından, IVF/ICSI'de kullanılmak üzere seçilen spermde bunu göstermek mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla, ÜYT'de kullanılacak semen örneğinin sadece bir kısmında araştırma yapılmakta ve burada saptanan DNA hasar oranı tüm semene yorumlanmaktadır.

Günümüzde erkek faktörü infertilite olgularında sıklıkla önerilen üremeye yardımcı teknikler (ÜYT) kullanılarak seçici birçok bariyer atlanılarak fertilizasyon başarıyor olmakla birlikte, DNA hasarlarının embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin gözlenmiş olması, böyle hastaların tedavisinde daha başka önlemlerin alınması ve tedavi alternatiflerinin geliştirilmesinin gerekli olduğunu düşündürmektedir.

ÖZET

İnfertilite olgularında sperm DNA hasarlarının önemli bir faktör olabileceği bilinmektedir. Dolayısıyla ejakulatta DNA hasarlı spermatozoa oranının bilinmesi gerek fertilizasyon şansının tahmin edilmesinde gerekse embriyonun maruz

kalabileceği risklerin belirlenmesinde önem kazanmaktadır.

Erkek faktörü infertilite olgularında sıklıkla önerilen üremeye yardımcı teknikler (ÜYT) kullanılarak seçici birçok bariyer atlanılarak fertilizasyon sağlansa bile hasarlı DNA'ya sahip spermelerin embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin gözlenmiş olması, böyle hastaların teşhis ve tedavisinde daha başka önlemlerin alınması ve teşhis-tedavi alternatiflerinin geliştirilmesinin gerekli olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod* 1999;14:4-5.
2. 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;14:1039-1049.
3. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:1717-1722.
4. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73:43-50.
5. Edwards RG, Beard HK. Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts? *Hum Reprod* 1999;14:1-4.
6. Zini A, Bielcki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation, DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-677.
7. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;21:33-44.
8. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;79:559-63.
9. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207:202-205.
10. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P,

- Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas, D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995;52:864–867.
11. Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996;2:139–144.
 12. Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod* 1999;14:4–5.
 13. 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;28:529–536.
 14. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003;7:428–432.
 15. 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;69:528–532.
 16. Aitken RJ and De Luliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells 2007, *Reprod BioMed online* 14;6:727–733
 17. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999;284:696–704.
 18. Ellington JE, Evenson DP, Wright RW Jr, Jones AE, Schneider CS, Hiss GA, Brisbois RS. Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro. *Fertil Steril* 1999;71(5):924–9.
 19. 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;23:25–43
 20. Fuentes-Mascorro G, Serano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000;45:215–25
 21. Akama K, Sato H, Furihata-Yamauchi M, Komatsu Y, Tobita T, Nakano M. Interaction of nucleosome core DNA with transition proteins 1 and 3 from boar late spermatid nuclei. *J Biochem* 1996;119:448–5
 22. Chevaillier P, Chirat F, Sautiere P. The amino acid sequence of the ram spermatid protein 3- α transition protein TP3 or TP4? *Eur J Biochem* 1998;258:460–4
 23. Steger K, Klönisch T, Gavenis K, Drabent B, Doe-neckel D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1998;4:939–45.
 24. Oliva R and Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991;40:25–94
 25. Rooney AP and Zhang J. Rapid evolution of a primate sperm protein: relaxation of functional constraint or positive Darwinian selection? *Mol Biol Evol* 1999;16:706–710
 26. Krawetz SA, Herfort MH, Hamerton JL, Pon RT and Dixon GH. Chromosomal localization and structure of the human P1 protamine gene. *Genomics* 1989;5:639–645.
 27. Reeves RH, Gearhart JD, Hecht NB, Yelick P, Johnson P and O'Brien SJ. Mapping of PRM1 to human chromosome 16 and tight linkage of Prm-1 and Prm-2 on mouse chromosome 16. *J Hered* 1989;80:442–446.
 28. McKay DJ, Renaux BS and Dixon GH. Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur J Biochem* 1986;156:5–8
 29. Yelick PC, Balhorn R, Johnson PA, Corzett M, Mazrimas JA, Kleene KC, Hecht NB. Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol* 1987;7:2173–2179
 30. Balhorn R, Reed S and Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988;44:52–55.
 31. Yebra L and Oliva R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* 1993;209:201–203
 32. Bianchi F, Rousseaux-Prevost R, Sautiere P and Rousseaux J. P2 protamines from human sperm are zinc-finger proteins with one CYS2/HIS2 motif. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:540–547
 33. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 2005 20:1298–1306
 34. Ingles CJ and Dixon GH. Phosphorylation of protamine during spermatogenesis in trout testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58:1011–1018
 35. Balhorn R, Corzett M, Mazrimas JA. Formation of intraprotamine disulfides in vitro *Arch Biochem Biophys* 1992;296:384–393.
 36. Nayernia K, Bohm D, Topaloglu O, Schluter G, Engel W. Rat transition nuclear protein 2 regulatory region directs haploid expression of reporter gene in male germ cells of transgenic mice. *Mol Reprod Dev* 2001;58(4):368–75.
 37. Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatid TP1 protein. *Mol Reprod Dev* 2001;58(4):437–43.
 38. Hecht NB. Gene expression during male germ cell development. In Desjardins C and Ewing LL (eds), *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Oxford University Press, New York, 1993;400–432.
 39. Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during ga-

- metogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986;105:1–65
40. Candido EP and Dixon GH. Trout testis cells. 3. Acetylation of histones in different cell types from developing trout testis. *J Biol Chem* 1972;247:5506–5510
 41. Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S and Khochbin S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 2003;23:5354–5365
 42. Lescoat D, Colleu D, Boujard D and Le Lannou D. Electrophoretic characteristics of nuclear proteins from human spermatozoa. *Arch Androl* 1988;20:5–40
 43. Bach O, Glander HJ, Scholz G, Schwarz J. Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells. *Andrologia* 1990;22:217–224
 44. Blanchard Y, Lescoat D, Le Lannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia* 1990;22:549–555
 45. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002; 17:1266-1273
 46. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ, Sika SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril* 2005;83:95-103
 47. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Peccchioli P, Moetti E et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl.* 2000, 21;903-12
 48. Daris B, Goropevsek A, Hojnik N, Vlaisavljevic V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Arch Gynecol Obstet*, Published online; June 2009
 49. Vicari E, De Palma A, Burrello N, Longo G, Grazioso C, Barone N et al. Absolute polymorphic teratozoospermia in patients with oligo-asthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. *J Androl* 2003;24:598–603
 50. Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R, Vicari E. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online* 2003;6:310–317
 51. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023–1028
 52. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876–2881.
 53. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004 ;81:965–972.
 54. Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005;322:33–41
 55. Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod* 2005;20:3476–3480.
 56. Sun JG, Jurisiceva A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:602–607.
 57. 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;69:528–532.
 58. Cebesoy FB, Aydos K, Unlu C. Effects of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch Androl* 2006;52:397–402.
 59. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023–1028.
 60. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876–2881.
 61. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, MoVatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82:378–383.
 62. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007;14:746–757
 63. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999;284:696–704.