

BÖLÜM 17

SPERM DNA FRAGMENTASYONU VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Kemal ERTAŞ¹

GİRİŞ

Erkek kısırlığı dünya çapında endişe verici boyutta artmaktadır. Genel infertilite vakalarının% 50'sinde potansiyel nedenleri ortaya koymak için özel incelemeler gerekmektedir.(1)

Yardımcı üreme teknolojisinin önemli ölçüde gelişmesi ile (YÜT) ölü doğum oranları azda olsa azalmıştır.(2)YÜT ,Erkek fertilitasını iyileştirmek için uygun yaklaşım olarak kullanılmamalıdır. Vakaların çoğu idiyopatik kalan erkek infertilitesinin yönetiminde , doğru teşhis mümkündür. Bunun için erkek kısırlığının etiyojisi her yönüyle düşünülmeli , olası mekanizmalar araştırılmalı ve kavramsallaştırılmalıdır. Bu bağlamda, sperm fonksiyonları ile ilgili moleküler ve genetik süreçleri anlamak çok önemlidir. Sperm fonksiyon testleri ve Üreme sonuçları üzerinde büyük etkiye sahip olan sperm DNA bütünlüğü araştırma önceliğini tekrar kazanmaktadır

Çeşitli ekzojen ve endojen faktörler nedeniyle oluşan Sperm DNA fragmentasyonu (SDF) doğrudan spermin morfolojik özelliklerini bozarak sperm fonksiyonlarını ve üreme kapasitesini azaltmaktadır.(3,4) SDF incelemeleri, erkek kısırlığı için potansiyel bir tanı aracı olup birkaç adımda klinik androlojinin ilerletilmesine yardımcı olur SDF testi, Amerikan Üroloji Derneği (AUA) ve Avrupa üroloji derneği (EAU) kılavuzlarında henüz yeterli kanıt düzeyinde olmasa da infertil erkeklerin değerlendirilmesinde rutin testler olarak tavsiye edilmektedir.(5,6)

Çevresel, yaşam tarzı ve endojen faktörlerin yol açtığı mekanizmalar ile oluşan SDF etiyojisinin aydınlatılması erkek infertilitesinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

SPERM DNA HASARININ ETİYOLOJİSİ

Haploid genomun başarılı bir şekilde sekonder oosite iletilmesi için sperm yapısı düzgün olarak yapılır. DNA içeriğinin füzyon ve iletiminin başarısı sınırlı

¹ Op. Dr. Memorial Dicle hastanesi Üroloji Kliniği, drertask@hotmail.com

hacimdeki nükleosta sıkıştırılmış genetik materyal ile doğrudan bağlantılıdır. Memeli sperm kromatini, yapı ve içerik olarak somatik hücrelerden farklıdır. Böylece paternal genomun oosite taşınması sırasında genetik bütünlük korunur. (7) Protaminasyon, nükleer kromatin yoğunlaşması sırasında ,pozitif yüklü protaminlerin histonların yerine geçtiği benzersiz bir süreçtir. Transport ve fertilizasyondan oluşan bu sürecin herhangi bir aşamasındaki kusur, SDF ile sonuçlanabilir. Aslında, DNA hasarının / kırılmalarının kapsamı, fertil erkeklerde bile spermden sperme değişiklik gösterebilir.(8) Ortaya çıkan kanıtlar fertilizasyon ve embriyo gelişimi sırasında kromatin organizasyonunun önemini destekliyor. (9-11) Bununla birlikte, normal durumda, mayotik faz, rekombinasyon kontrol noktasından geçerken . bu ilerlemeyi tamamen tamir edilmiş DNA veya yetersiz bozulmuş spermatozoidler çıkarılana dek mayotik bölünmeyle sınırlar.(12)

DNA kırılmaları ligasyonu , hem birincil DNA bütünlüğünü korumak hem de genom ekspresyonu sırasında DNA döngü alanının yeniden birleştirilmesi için çok önemlidir.(13)

Histon hiper asetilasyon yoluyla (endojen nükleaz aktivitesi ve topoizomeraz II ile DNA kırılmalarının ligasyonu) oluşan bu yeniden montaj süreci kromatin gevşetme gibi hassas adımları içerir .(14) Yeni protamin çekirdeklerinin etrafına kromatin paketleme ve DNA bütünlüğünün restorasyonu genellikle epididimal geçiş sırasında gerçekleştirilir(15)

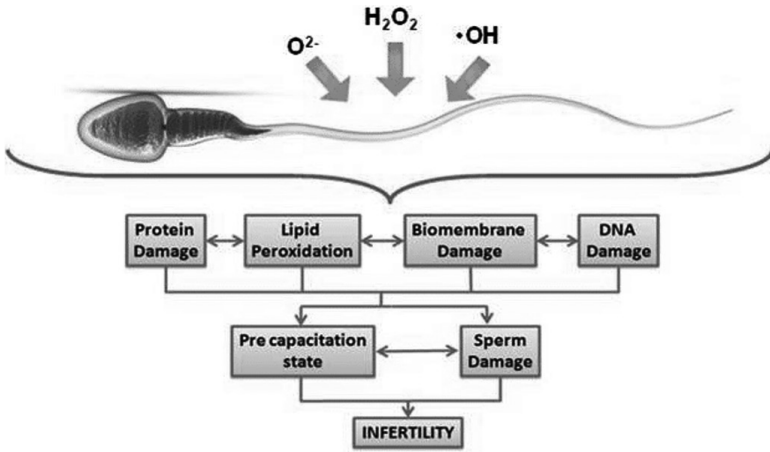
Bununla birlikte, epididimal geçiş sonrası spermatozoada endojen çentiklerin varlığı spermiogenezde uygun olmayan bir kromatin paketlemesini ve eksik bir olgunlaşma sürecini gösterebilir Kromozomların DNA sperm fragmentasyonuna olan farklı duyarlılığı, DNA'nın paketleme molekülleri olan histon ve protaminlerin herhangi biriyle olan ilişkisine göre belirlenir.(16)

SDF etiyopatogenezinde Sperm kromatin sıkıştırmasındaki kusurların yanı sıra, varikozel enfeksiyon, ileri erkek yaşı, sıcak stresi, yaşam tarzı faktörleri, çevresel toksinler iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon gibi birçok diğer inrensek ve ekstrensek faktörler bildirilmiştir.(17-18) Bu etiyolojilerin çoğunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) yükselmesiyle SDF ortaya çıkmaktadır.(19) Abortif apopitoz(20) ve kusurlu maturasyon(21) , Testiküler SDF deki iç faktörlerin rolü ile ilişkilidir. Öte yandan, kanıtlar epididimal ve ejakule spermden testiküler spermden daha fazla ekstrensek kaynaklı DNA fragmentasyonu olduğunu gösteriyor.(22) Plazma membranı İçerisindeki çok miktarda çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) varlığı spermi ROS kaynaklı hasara duyarlı hale getirir.(23)

ROS ve SDF arasındaki ilişki varikozelin etiyopatogenezinde de aşikar bir şekilde karşımıza çıkmaktadır. İnfertil olup varikozeli olan erkeklerde infertil olup varikozeli olmayan erkeklere göre ROS ve lipid peroksidasyon ürünleri seviyeleri

daha yüksek bulunmuş.(24) öte yandan varikoselin tedavi edilmesi ROS seviyelerini ve SDF yi azaltmaktadır.(25-26)

Böylece, sperm fonksiyonlarının ve morfolojisinin intrinsek ve ekstrinsek çok çeşitli nedenlerle bozulduğu açıktır. Anormal spermatozoaya neden olan bu faktörlerle birlikte artan ROS seviyeleri sperm DNA bütünlüğüne zarar verir ve dolayısıyla infertiliteyle sonuçlanabildiği gibi YÜTnin başarısında azalma ve doğumsal kusurlarlada sonuçlanabilir.



SPERM DNA FRAGMENTASYONU İLE İLİŞKİLİ MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER

Sperm DNA hasarı hem nükleer hem de mitokondriyal genomu etkiler. (17,27,28) SDF ayrıca nükleusta vakuolasyon gibi sperm alt yapısındaki değişiklikler ile şiddetli teratozoospermi içeren sperm morfolojik anormalliklerine neden olmaktadır. (29) Bu değişiklikler hiperaktivasyon, kapasitasyon gibi normal sperm fonksiyonlarını ve spermatozoanın döllenme sırasında oosit ile bağlanması için kritik olan akrozom reaksiyonunu olumsuz etkiler.(30,31) Yüksek SDF'li hastalarda Özellikle spermin proteomu ve seminal plazma değişmiştir.(28,32) Bu durum triaçilgliserol metabolizması, enerji üretimi, protein katlanması,katlanmamış proteinler ve hücrel detoksifikasyonu gibi moleküler süreçler ve sperm protein ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir.(28)

Ayrıca, yüksek DNA fragamantasyonlu spermelerde sperm metabolizması, işlevi ve oksidatif enfeksiyonlara karşı koruma ile ilişkili postgenomik yollar etkilenir. (28)

Artmış SDF prolaktin kaynaklı protein ve onun öncü proteininin (pPIP) ekspresyonunu değiştirerek spermatogenezi bozar. (33) Seminal plazma proteomu ayrıca SDF ile ilişkili patolojiyi de yansıtır ve bunlar sperm DNA hasarının derecesine bağlı olarak modüle edilir.(32) Intasqui ve arkadaşları ayrıca, düşük ve yüksek DNA fragmantasyonu olan normozoospermik erkeklerin seminal plazmasında postgenomik yolakların değiştiğini bildirmiştir. Yağ asidi bağlanması ve prostaglandin biyosentezi gibi moleküler yolak fonksiyonlarının DNA hasarlı spermatozalarda değiştiği bildirildi.(34)

Sistein açısından zengin salgı proteini LCCL alanı içeren 1 (CRISPLD1), sistein açısından zengin salgı proteini LCCL alanı içeren 2 (CRISPLD2) ve retinoik asit reseptörü yanıt veren protein 1, düşük SDF için biyobelirteçler olarak önerilirken ,bir proteozom alt birimi olan alfa tip-5 proteininin yüksek SDF için potansiyel bir seminal biyobelirteç olduğu düşünülüyor.(35) Sigara içen yüksek SDFli bireylerin seminal plazmasındaki moleküler değişiklikler esas olarak azalmış akrozomal bütünlük ve mitokondriyal aktivite ile ilişkili bulundu. İnfertil hastalarda görülenSDF ile birlikte yüksek ROS seviyelerinin , Seminal plazmada DNA bağlama mekanizmasına bağlı enzimleri değiştirdiği gösterildi.(36)

Genel olarak, hem spermatozoanın hem de seminal plazmanın moleküler protein yapıları yüksek SDF koşullarında değişir.

SDF İLE İLİŞKİLİ ERKEK İNFERTİLİTE FAKTÖRLERİ/DURUMLARI

Erkek faktör infertilitesi ile SDF arasındaki bağlantıyı bildiren çalışmalar çeşitli gözlemlere sahiptir. Birçok çalışma, SDF ve erkek kısırlığını azalmış sperm fonksiyonlarını destekleyen kanıtlarla ilişkilendirirken(37,39) bazı çalışmalarda yüksek SDF'nin normal motilite ve morfolojiye sahip spermelerde de gözlenebileceği bildirilmiştir.(40,42) yükselmiş SDF seviyeleri anormal semen parametreleri olan erkeklerde ve infertil çiftin normospermik partnerlerinde gözlenebilir.(43) Buna rağmen SDF erkek üreme sağlığı ve sağlıklı embriyo gelişimi üzerinde önemli bir faktördür. Agarwal ve arkadaşlarının yakın tarihli bir makalesinde, ART'de daha iyi bir sonuç için SDF yönetiminde kadın faktörlerinin rolü aydınlatılmış.(44) Yazarlar, SDF ve ARTnin klinik sonuçları üzerine etkisi olan yumurtalık rezervi arasındaki karmaşık etkileşimi tartıştı. Kaliteli oositlerde kusurlu genetik bilginin yavruya geçişini önlemek için bir güvenlik kontrolü görevi gören sağlam bir oosit onarım makinesinin bulunması, SDF dahil olmak üzere üreme sonuçlarında çok önemli bir role sahiptir. (44) Bununla birlikte, birkaç erkek infertilite faktörü, SDF ile ilişkilidir.

ERKEK YAŞI

YÜT tedavisi arayan çiftler arasında babaların, YÜT'ye ihtiyaç duymayanlara göre önemli ölçüde daha yaşlı olduğu bildirilmiştir (36.6'ya karşı 33.5 yıl) (45). 40 yaş ve üzeri erkek kişilerde de sperm DNA hasarı riskinin daha yüksek olduğu bulunmuştur.(46) Ancak bazı araştırmalarda baba yaşı ile SDF arasında bir ilişki olmadığı bildirilmiştir.(47,48) Bununla birlikte, çalışmaların çoğu, artan erkek yaşı ile birlikte, spermde artmış ROS oluşumu(46) ve diploidi/anöploidi insidansında artma bildirmiştir.(48,49)

DİYET, YAŞAM TARZI VE DEĞİŞTİRİLEBİLİR RİSK FAKTÖRLERİ

Oksidatif DNA hasarının antioksidan bileşiklerle desteklenmiş gıda tüketimi ile azaldığı bu durumun genel ve üreme sağlığı açısından daha iyi olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir(50,51)

Raporların çoğu bireysel antioksidanların veya antioksidan açısından zengin gıdaların artan alımının sperm DNA hasarının bazal seviyesini azaltabileceğini gösteriyor.(52,53) Endojen sperm DNA oksidasyon seviyelerinin diyet veya takviye gıda yoluyla modüle edilebildiği, aşıkardır. Ancak bazı antioksidan türleri ve dozu, antioksidan plazmanın bazal düzeyi sigara veya alkol tüketimi gibi değişkenler sonucu etkileyebilir. Sigara (54) ve alkol tüketimi(55) ayrı ayrı ve kombinasyon halinde SDF'yi tetikliyor.(56)

Sigara veya alkol aracılı SDF mekanizması, sperm kalitesini ve sonuçta spermatozoanın doğurganlık potansiyelini etkileyen aşırı ROS oluşumundan kaynaklanmaktadır Kronik sigara içenlerde Sperm DNA Parçalanması ve Erkek infertilitesi kontrol noktası kinaz 1 (Chk1) aktivasyonuna yanıt olarak oluşan S ve G2 kontrol noktası arresti DNA hasarı oluşumdan sorumlu tutulmaktadır .Checkpoint kinaz 1 (Chk1)'in ekspresyonu , SDF ve apoptoz ile ilişkilidir.Chk-1 in azaltılması, sperm onarımının azalmasına ve sperm apoptozunun artmasına dolayısıyla semen kalitesi üzerinde olumsuz bir etkiye neden olabilir. (54) SDF ve alkol tüketimiyle ilgili raporlara göre intrinsek apoptotik cascade sırasında, sperm mitokondrilerinden salınan hidrojen peroksitin çekirdekte SDF'yi indükleyebileceği düşünülmektedir.(57) Apoptotik süreçten çok sonra, sperm DNA'sı parçalanmaya başlar.(58)

OBESİTE

Son yıllarda obesitenin erkek fertilitesi üzerine endişe verici boyutlarda etkileri olduğu tartışılmaktadır. Erkek İnfertilitesi ile aşırı kilo veya obezite ile arasında

güçlü ilişki bulunmuştur. Geleneksel semen parametre değerleri yüksek vücut kitle indeksi (BMI) olan erkeklerde olumsuz şekilde değişir.(59) Erkek obezitesi, artan sperm DNA hasarı riski ve daha düşük sperm motilitesi ve dolayısıyla düşük sperm kalitesi ile ilişkilidir. (59) Bir çok insan ve hayvan çüzerindekisitotoksik etkilerinden kaynaklanmaktadırırışmalarında obezite ile azalmış sperm DNA bütünlüğü arasında ilişki olduğu saptanmıştır.(60) Obesite endokrin dengeyi bozarak sperm DNA bütünlüğü üzerinde olumsuz etkilere yol açar.(61)

ÇEVRESEL TOKSİNLER

Ağır metaller(62) ,pestisitler(63) ve diğer endokrin bozucu maddelere çevresel veya mesleki maruziyet erkek üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturarak erkek infertilitesine neden olabilmektedir. endokrin bozucu kimyasallara maruziyet ile SDF arasında pozitif korelasyon vardır.(64) Bu çeşitli ajanlar Germ hücrelerine gelişimin çeşitli aşamalarında etki ediyorlar ve genellikle bu germ hücreleri epididim veya ejakulata ulaştığında SDF gösteriyorlar. Bu tedavi edilen örneklerin bazıları başarılı İVF yapma yeteneğine sahipken sıklıkla embriyo başarısızlığı yaşıyor. Aşırı DNA fragmantasyonu muhtemelen oosit tarafından tamir edilemez, % 30'dan fazla spermDNA hasarı gösteren erkeklerde ivf sonrası spontan abortus oranı yaklaşık olarak iki katına çıkmaktadır.(65) DNA fragmantasyonu, erkek fertilitesi için potansiyel toksik madde maruziyeti tespiti için bir teşhis aracı olarak mükemmel bir belirteçtir.

KEMORADYOTERAPİ

Son birkaç on yılda, çok sayıda rapor, iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyonların erkek fertilitesi üzerindeki olumsuz etkisini doğrulamıştır (18,66)

Tıbbi ekipman ve kanser tedavisi için uygulanan radyoterapiden kaynaklanan iyonlaştırıcı radyasyonlar ile SDF ve azalan sperm kalitesi arasında pozitif korelasyon vardır(18)

Kanser tedavilerinin erkek fertilitesi üzerindeki olumsuz etkileri iyi bilinmektedir.

Sperm sayısında azalma kemo veya radyoterapinin spermatojenik epitelyum üzerindeki sitotoksik etkilerinden kaynaklanmaktadır.(67)

Çalışmalar ayrıca testiküler germ hücreli tümörlerde radyoterapinin tek başına kemoterapiye kıyasla SDF'de daha fazla bir artış ile birlikte ilişkili olduğunu doğrulamışlardır. (68) Cep telefonlarından, Wi-Fi'den ve diğer radyoaktif kaynaklardan gelen iyonlaştırıcı olmayan radyasyonların da erkek fertilitesi ve sperm DNA bütünlüğü üzerinde önemli olumsuz etkileri vardır.(66)

ENFEKSİYONLAR VE TESTİS TRAVMASI

Yukarıda tartışıldığı gibi, hem intratestiküler hem de Posttestiküler seviyelerde oluşan çeşitli olaylar sperm DNA hasarına neden olabilir. Akut veya kronik inflamasyon olarak kendini gösterebilen patolojik durumlardan biri olan bakteriospermi genital sistemde lökosit infiltrasyonunu artırır ve daha yüksek ROS üretimi ile sonuçlanır.(69) Lökositospermi, Chlamydia ve Mycoplasma enfeksiyonları, testis kanseri ve varikoselinde aşırı ROS üretimi ile birlikte daha fazla SDF'ye neden olduğu bildirilmiştir.(26,70,71) Ayrıca başka bir çalışmada , Chlamydia ve Mycoplasma enfeksiyonu olan hastalarda bir kür antibiyotik tedavisinden sonra SDF nin azaldığı bildirilmiştir.(70)

SDF DEĞERLENDİRMESİNDE KULLANILAN TEKNİKLER

Sperm DNA hasarını değerlendirmek için çeşitli testler kullanılır. Bunlar spermin olgunluğunu ve kromatin bütünlüğünü veya DNA fragmantasyonunu ölçen direk ve indirek testler şeklinde sınıflandırılır.

En yaygın olarak kullanılan SDF testleri sperm kromatin yapısı tahlili (SCSA), terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick-end etiketleme (TUNEL), sperm kromatin dağılımı (SCD) ve Comet (tek hücreli jel elektroforez) testleridir. Majzoub ve arkadaşları tarafından 19 ülkede yapılan kesitsel bir ankette SDF ölçümlerinin %30,6'sının TUNEL ve SCSA kullanılarak, %20,4'ünün ve SCD ve %6.1 inin tek hücreli jel elektroforezi (Comet) kullanılarak yapıldığı gösterildi. (72)

Bu testlerin her birinin test sonuçları farklıdır ve birbirlerinin yerine kullanılamaz

SPERM KROMATİN MATURASYON TESTLERİ

1-Anilin Mavisi Boyama (AB)

Olgun spermatozoa, arginin ve sisteinden bol protaminler içerirken olgunlaşmamış spermatozoa, lizinden zengin histonlar içerir

AB lizin ile reaksiyona giren asidik bir boyadır.

Olgunlaşmamış spermleri maviye boyarken, olgunlaşmış spermler boyanmadan kalır. Mikroskopta basit parlak alan altında boyanmış spermatozoalar değerlendirilir.

Sperm kromatin bütünlüğü, boyanmanın yoğunluğa göre değerlendirilir.(73)

2- Chromomycin A3 (CMA3)

Spermatozoanın protaminasyon durumu, onun kromatin bütünlük durumunu belirler. Protamin içeriği ne kadar azsa, DNA paketlemesi o kadar zayıf ve sperm DNA hasarı o kadar çoktur. CMA3, protamin eksikliği olan sperm DNA'sına bağlanır ve bu spermler açık sarı boyanır.(74)

Prot aminasyonu artmış spermde renk yoğunluğu yüksektir.(75).Semen numunelerinde CMA3 testi ile %30 dan fazla DNA hasarı tespit edilen vakalarda ICSI'de dölleme oranının önemli ölçüde daha düşük olduğu bildirildi.(76)

SPERM DNA FRAGMENTASYON TESTLERİ;

1- Sperm Kromatin strüktür Testi (SCSA)

SCSA, dolaylı bir SDF testidir ve tek sarmallı sperm DNA'daki (ssDNA) kırılmaları tespit etmek için kullanılır. Akridin turuncusu (AO) boyası ssDNA ile bağlanır ve kırmızı floresan yayar, çift sarmallı DNA'ya bağlı AO ise yeşil floresan yayar sinyaller bir akış sitometresi kullanılarak yakalanır.(77) SCSA hem taze hemde dondurulmuş spermler de de yapılabilir DNA fragmentasyon indeksi (DFI)için klinik bir referans değeri SCSA için %30 olarak kabul edilmektedir.(78,79)

2-Sperm Kromatin Dağılım(SCD) Testi

SCD, halo testi olarak da bilinir ve ilk olarak Fernández ve ark.tarafından tanımlanmıştır.(80,81) Sperm hücreleri, Düşük erime noktalı agaroz kaplı slaytlara gömülür asit çözeltisi ile denatüre edildiğinde halos/kromatin dağılımı oluşur.

Slaytlar DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile boyanır ve floresan mikroskop altında incelenir parçalanmış (küçük haleler / dağılmamış) form yüksek oranda yoğunlaştırılmış kromatin (büyük/farklı haleler) formdan ayırt edilir.

Bu test hem temiz hem de yıkanmış sperm üzerinde gerçekleştirilir. Halelerin boyutu, sperm DNA hasarıyla doğru orantılıdır.(82)

3- COMET ASSAY/TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ (SCGE)

Bu teknikte, parçalanmış spermde elde edilen DNA, agaroz jel elektroforezine tabi tutulur. Sağlam DNA, spermin kafasının içinde kalırken, parçalanmış DNA göç eder ve kuyruk olarak görünür (83)

Floresan boya SYBR Green I boyama için kullanılır. Parçalanmış DNA, floresan mikroskop altında incelenir. Parçalanmış DNA yı gösteren kuyruğun uzunluğu DNA hasarının boyutunun bir göstergesidir. SCGE testi, taze semen numuneleri üzerinde gerçekleştirilir ve inceleme için minimum

5000 spermatozoa gereklidir. Böylece Comet testi kullanılarak oligozoospermik numunelerde bile SDF kolaylıkla değerlendirilebilir.(84)

4- TERMİNAL DEOKSİNÜKLEOTİDİL TRANSFERAZ DUTP NİCK-END ETİKETLEME

(TÜNEL) Test

TUNEL testi, taze, yıkanmış ve kriyoprezerve edilmiş semen örneklerinden elde edilen spermatozoadaki hem tek hem de çift zincirli DNA kırılmalarını ortaya çıkarır.

SDF'yi ölçmek için kullanılan testler diğer mevcut teknikler arasında hızlı ve kolay prosedürü nedeniyle popüler bir teknik haline gelmekte ve gittikçe daha çok klinik önem kazanmaktadır.

DNA kırılmaları floresein ile birleştirilmiş 2'-deoksiüridin 5'-trifosfatlar (dUTP'ler) ile etiketlenmiştir izotiyosiyanat (FITC). 3'hidroksil (OH) kırılmasında dUTP'lerin dahil edilmesi ssDNA ve dsDNA'nın uçları, terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) olarak bilinen şablondan bağımsız DNA polimeraz tarafından gerçekleştirilir. Ayrıca, çekirdeği boyamak için bir karşı boya olarak propidium iyodür (PI) kullanılır. floresan sinyalleri yayılan DNA kırılmaları ile doğru orantılı olup floresan mikroskopu veya flow sitometresi ile belirlenebilir. (85,86)

DNA kırılmalarının tespiti için Flow sitometresinin kullanılması ,yüksek doğruluk oranıyla son derece hassas ve en doğru tekniktir.(87)

SDF ölçümü için TUNEL protokolü olarak çoğu klinik laboratuvarları için Accuri C6 masaüstü flow sitometresi kullanılmaktadır.(88) Başlangıçta, sağlıklı donörleri infertil erkeklerden ayırt etmek için %19,25'lik bir referans değeri belirlendi.(89) Son zamanlarda, SDF'yi ölçmek için masaüstü akış sitometresi kullanılarak yapılan Cohort çalışmada infertil erkekler ve kanıtlanmış fertil erkekler karşılaştırıldı. (n=261) Testin %16,8 referans değeri ile yüksek bir pozitif prediktif değeri (%91,4) ve özgüllüğü vardı.(90) Benzer sonuçlar Basel isviçredeki laboratuvarlarda alındı. Laboratuvarlar arası varyasyon önemli ölçüde daha azdı ve her iki merkezde de yüksek bir $r = 0.94$ korelasyonu vardı.(91) Yürütülen birkaç çalışmanın raporlarına göre, klinik laboratuvarlarda TUNEL tekniği kullanılarak SDF testi için standartlaştırılmış, basit ve kolay protokol önerilmiştir.(85,88,89,91)

Erkek infertilitesi için SDF Testi

Baba genomundaki hasar, döllenme başarısızlığının önde gelen nedenlerinden biridir. SDF testi, erkek kısırlığının değerlendirilmesi için gelişmekte olan ve gelişmiş bir araçtır. Bu amaçla Agarwal ve ark. tarafından klinik uygulama kılavuzu önerilmiştir.(CPG). Bu kılavuz erkek kısırlılığında SDF testinin klinik faydası için kanıta dayalı öneriler sunar.(86) SDF testi klinik varikoseli ve borderline semen parametreleri olan hastalarda , varikoselin neden olduğu bozuklukları düzeltmek ve daha iyi doğurganlık sonuçları elde etmek için bu hastaları seçme konusunda hekimlere yardımcı olabilir.(86)

Ek olarak Oligozoospermik olup ejaküle spermiogramda SDF testi yüksek çıkan erkeklerde yardımcı üreme prosedürleri için testiküler sperm kullanımının daha faydalı olacağı ortaya konabilir. (22,92,93) Ayrıca, SDF testi, doğal hamilelik ve YÜT sonuçlarını değerlendirmek için bir tahmin aracı olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Fleming S, Green S, Hall J, Hunter A. Analysis and alleviation of male infertility. *Microsc Anal.* 1995;45:35–7.
2. Neri Q, Tanaka N, Wang A, Katagiri Y, Takeuchi T, Rosenwaks Z, et al. Intracytoplasmic sperm injection. *Minerva Ginecol.* 2004;56:189–96.
3. Al Omrani B, Al Eisa N, Javed M, Al Ghedan M, Al Matrafi H, Al Sufyan H. Associations of sperm DNA fragmentation with lifestyle factors and semen parameters of Saudi men and its impact on ICSI outcome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):49.
4. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14026–52.
5. Jarro J, Sigman M, Kolettis PN, Lipshultz LR, McClure RD, et al. Optimal evaluation of the infertile male. AUA best practice statement reviewed and validity confirmed. 2011.
6. Male infertility. EAU guidelines [Internet]. 2017 [cited September, 2018]. Available from: <https://uroweb.org/guideline/male-infertility/>.
7. Conwell CC, Vilfan ID, Hud NV. Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(16):9296–301.
8. Simon L, Aston K, Emery B, Hotaling J, Carrell D. Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline comet assay and their importance. *Andrologia.* 2017;49(2):e12608.
9. Simon L, Murphy K, Shamsi M, Liu L, Emery B, Aston K, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod.* 2014;29(11):2402–12.
10. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* 2009;16(1):30–6.
11. Ajduk A, Yamauchi Y, Ward MA. Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of in vitro fertilization. *Biol Reprod.* 2006;75(3):442–51.
12. Page AW, Orr-Weaver TL. Stopping and starting the meiotic cell cycle. *Curr Opin Genet Dev.* 1997;7(1):23–31.
13. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl.* 2006;8(1):11–29.
14. Laberge R-M, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod.* 2005;73(2):289–96.
15. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical

- tests for sperm chromatin integrity. *J Androl.* 2001;22(1):45–53
16. González-Rojo S, Fernández-Díez C, Guerra SM, Robles V, Herraes MP. Differential gene susceptibility to sperm DNA damage: analysis of developmental key genes in trout. *PLoS One.* 2014;9(12):e114161.
 17. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2015;31(3):309–19.
 18. Ahmad G, Agarwal A. Ionizing radiation and male fertility. In: *Male infertility*: Springer, New Delhi; 2017. p. 185–96.
 19. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg H-R, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in nonleukocytospermic patients. *Fertil Steril.* 2005;83(3):635–42.
 20. 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.
 21. Sakkas D, Manicardi G, Grace Bianchi P, Bizzaro D, Bianchi U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 1995;52(5):1149–55.
 22. Esteves SC, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P, Schneider DT, Gosálvez J. Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertil Steril.* 2015;104(6):1398–405.
 23. John Aitken R, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;41(1):183–97.
 24. Sakamoto Y, Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, Fujisawa M. The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele. *BJU Int.* 2008;101(12):1547–52.
 25. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2. *Nat Rev Urol.* 2013;10(1):26–37.
 26. Wang Y-J, Zhang R-Q, Lin Y-J, Zhang R-G, Zhang W-L. Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2012;25(3):307–14.
 27. Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. *BJU Int.* 2013;112(6):835–43.
 28. Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(9):1187–202.
 29. Skowronek F, Casanova G, Alciaturi J, Capurro A, Cantu L, Montes JM, et al. DNA sperm damage correlates with nuclear ultrastructural sperm defects in teratozoospermic men. *Andrologia.* 2012;44(1):59–65.
 30. Puga Molina LC, Luque GM, Balestrini PA, Marin-Briggiler CI, Romarowski A, Buffone MG. Molecular basis of human sperm capacitation. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:72.
 31. Guraya SS. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Int Rev Cytol.* 2000;199:1–64.
 32. Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KH, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. *BJU Int.* 2013;112(6):835–43.
 33. Behrouzi B, Kenigsberg S, Alladin N, Swanson S, Zicherman J, Hong S-H, et al. Evaluation of potential protein biomarkers in patients with high sperm DNA damage. *Syst Biol Reprod Med.* 2013;59(3):153–63.
 34. Intasqui P, Camargo M, Antoniassi MP, Cedenho AP, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Association between the seminal plasma proteome and sperm functional traits. *Fertil Steril.* 2016;105(3):617–28.

35. Antoniassi MP, Intasqui P, Camargo M, Zylbersztejn DS, Carvalho VM, Cardozo KH, et al. Analysis of the functional aspects and seminal plasma proteomic profile of sperm from smokers. *BJU Int.* 2016;118(5):814–22
36. Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Du Plessis SS, Gopalan B, Willard B, et al. Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:85.
37. Cho C-L, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: a systematic review. *Arab J Urol.* 2018;16(1):21–34.
38. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003;79:1597–605.
39. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003;79(4):829–43.
40. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi P, Shoukir Y, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 1998;13(suppl_4):11–9.
41. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2009;91(4):1077–84.
42. Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod.* 2009;81(3):517–24.
43. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril.* 2002;78(2):313–8.
44. Agarwal A, Cho C-L, Majzoub A, Esteves SC. The role of female factors in the management of sperm DNA fragmentation. *Transl Androl Urol.* 2017;6(Suppl 4):S488.
45. Engel W, Sancken U, Laccone F. Paternal age from a genetic point of view. *J Reproduktionsmed Endokrinol.* 2004;1:263–7.
46. Alshahrani S, Agarwal A, Assidi M, Abuzenadah AM, Durairajanayagam D, Ayaz A, et al. Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12(1):103.
47. Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(1):41–6.
48. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(5):425–32.
49. Luetjens C, Rolf C, Gassner P, Werny J, Nieschlag E. Sperm aneuploidy rates in younger and older men. *Hum Reprod.* 2002;17(7):1826–32.
50. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med.* 1996;74(6):297–312.
51. Agarwal A, Sengupta P, Durairajanayagam D. Role of L-carnitine in female infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):5.
52. Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, Nadjarzadeh A. Antioxidant supplements and semen parameters: an evidence based review. *Int J Reprod Biomed.* 2016;14(12):729.
53. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.* 2005;26(3):349–53.
54. Cui X, Jing X, Wu X, Wang Z, Li Q. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. *Mol Med Rep.* 2016;14(1):753–61.
55. Akang EN, Oremosu AA, Osinubi AA, James AB, Biose IJ, Dike SI, et al. Alcohol-induced male infertility: is sperm DNA fragmentation a causative? *J Exp Clin Anatomy.* 2017;16(1):53.
56. Anifandis G, Bounartzi T, Messini C, Dafopoulos K, Sotiriou S, Messinis I. The impact of ciga-

- rette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm®. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;290(4):777–82.
57. De Iulii GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling
 58. Mitchell L, De Iulii G, Aitken RJ. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl.* 2011;34(1):2–13.
 59. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl.* 2013;15(5):622.
 60. Bakos H, Mitchell M, Setchell B, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl.* 2011;34(5pt1):402–10.
 61. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis.* 2012;2(4):253–63.
 62. Sengupta P. Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug Chem Toxicol.* 2013;36(3):353–68.
 63. Sengupta P, Banerjee R. Environmental toxins: alarming impacts of pesticides on male fertility. *Hum Exp Toxicol.* 2014;33(10):1017–39.
 64. Jeng HA. Exposure to endocrine disrupting chemicals and male reproductive health. *Front Public Health.* 2014;2:55.
 65. Evenson DP, Wixon R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;207(2):532–7.
 66. Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, Ranga G, Li J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril.* 2008;89(1):124–8.
 67. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment 1. *Int J Androl.* 2002;25(5):255–61.
 68. Smit M, Van Casteren N, Wildhagen M, Romijn J, Dohle G. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod.* 2010;25(8):1877–83.
 69. Ochsendorf F. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* 1999;5(5):399–420.
 70. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by chlamydia trachomatis and mycoplasma. *Fertil Steril.* 2008;90(2):328–34.
 71. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl.* 2002;23(5):717–23.
 72. Majzoub A, Agarwal A, Cho CL, Esteves SC. Sperm DNA fragmentation testing: a cross sectional survey on current practices of fertility specialists. *Transl Androl Urol.* 2017;6(Suppl 4):S710–9.
 73. AUGER J, MESBAH M, HUBER C, DADOUNE JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl.* 1990;13(6):452–62.
 74. Manicardi GC, Bizzaro D, Basic SD. Clinical aspects of sperm chromomycin A3 assay. In: Zini A, Agarwal A, editors. *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction.* New York: Springer New York; 2011. p. 171–9.
 75. 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 accessibility1. *Biol Reprod.* 1995;52(4):864–7.
 76. 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(suppl_4):11–9.
 77. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod*

Sci. 2016;169:56–75.

78. 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):25–43sperm injection outcome. *Fertil Steril.* 2010;94(2):549–57
79. Evenson DP. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®): 30 years of experience with the SCSA®. In: *Sperm chromatin*: Springer, New York, NY; 2011. p. 125–49.
80. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005;84(4):833–42.
81. 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.
82. Pratap H, Hottigoudar SY, Nichanahalli KS, Chand P. Assessment of sperm deoxyribose nucleic acid fragmentation using sperm chromatin dispersion assay. *J Pharmacol Pharmacother.* 2017;8(2):45–9.
83. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123(1):291–8.
84. Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL. Abundant alkalisensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res.* 1989;184(2):461–70.
85. Sharma R, Masaki J, Agarwal A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 2013;927:121–36.
86. Gupta S, Sharma R, Agarwal A. Inter and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation. *Curr Protoc Toxicol.* 2017;74(1):16.1. 1-.1. 22.
87. Mahfouz RZ, Said TM, Agarwal A. The diagnostic and therapeutic applications of flow cytometry in male infertility. *Arch Med Sci Spec Issues.* 2009;2009(1):108.
88. Sharma R, Cakar Z, Agarwal A. TUNEL assay by benchtop flow cytometer in clinical laboratories. In: *A Clinician's guide to sperm DNA and chromatin damage*: Springer, Cham; 2018. p. 103–18.
89. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology.* 2010;76(6):1380–6.
90. Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, Agarwal A. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(2):291–300.
91. Ribeiro S, Sharma R, Gupta S, Cakar Z, De Geyter C, Agarwal A. Inter and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation. *Andrology.* 2017;5(3):477–85.
92. Moskovtsev SI, Jarvi K, Mullen JBM, Cadesky KI, Hannam T, Lo KC. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1142–6.
93. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005;20(1):226–30.