

Reproduktif tedavi alan çiftlerde, sperm DNA hasarı ve sperm nükleer protein içeriği tahlillerinden üçünün karşılaştırmalı analizi

Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, et al.

Hum Reprod 2014 ;29: 904-17

Semen analizleri yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) başarısını öngörmeye yol gösterici olsa da DNA zincir bozuklukları başta olmak üzere bazı sperm defektlerini tanımlamada yetersiz kalabilir. Günümüzde spermatozoayı yok etmeden genetik potansiyelini analiz etmemiz de mümkün gözükmemektedir. Geçtiğimiz son iki dekat içinde geniş sperm-spesifik biyomarkerler erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiş ve sperm fonksiyonu değerlendirmede kullanışlı olabilecek testler tanımlanmıştır. Ancak hiçbirinin klinik olarak karar verme üzerinde gözle görülür veya anlamlı kabul edilebilir etkisi olamamıştır. Günümüzde sadece sperm nükleer proteini ve sperm DNA bütünlüğünün erkek ve kadın infertilitesini ayırt etmede yeri olabileceği gösterilmiştir.

Birkaç çalışma tamamen normal semen profiline sahip erkeklerin buna rağmen infertil olabileceğini ve altta yatan olası nedenin anormal sperm DNA'sı sebebi olabileceğini ifade etmiştir. Sperm genomu tüm genetik materyalin bir yarısını taşımaktadır. Bundan dolayı YÜT denenirken başarılı bir gebelik elde etmede normal genetik materyal taşıyan sperm varlığı temeldir. DNA bütünlüğü erkek infertilitesi için gösterge olarak değerlendirilirken çok sayıda çalışma yüksek düzeyde DNA hasarının düşük fertilizasyon oranı, bozulmuş embriyonel klivaj, artmış düşük oranı, YÜT sonrası artmış gebelik kaybı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Somatik hücrelerin aksine, spermde histonların %85'i protamin proteinleri ile yer değiştirmiştir. Düşük seviyede protamin içeren sperm, yüksek oranda histon proteini içereceğinden DNA hasarına daha duyarlı hale gelecektir.

Protamin eksikliği ve protamin paketlenme yetersizliği infertil erkeklerde gözlenmiştir, defektif spermatogenezis bu erkeklerdeki histon-protamin oranının değişmesi sebebiyle olabilir. Ek olarak bazı çalışmalar anormal sperm protaminizasyonu ile DNA hasarı arasında yakın ilişki olduğunu da göstermiştir. Sıklıkla kullanılan üç tahlilden ikisi

- alkalın comet testi, terminal deoksinükleotidtransferaz aracılıklı dUTP nick-end labelling testi (TUNEL) — direkt olarak spermdeki DNA hasarının seviyesini ölçerken, flow sitometrik kromatin değerlendirme (FCCE), akrinin orange staining metodu (SCCE protokolu) kullanarak indirekt olarak tahmini hasarı ölçer. Bu çalışmada protamin seviyesi ile DNA bütünlüğü arasındaki korelasyon ve üç sperm DNA hasarı tahlilinin YÜT kullanımı sonrası gebelik sağlama başarısı tahmin etmede başarısı incelenmiştir.

Çalışma Nisan 2011 ile Mart 2013 arasında Utah Üniversitesi IVF laboratuvarında 238 erkek üzerinde yürütülmüş. Semen örnekleri 2-5 günlük cinsel perhiz sonrası toplanmış ve tüm örnekler konvensiyonel ışık mikroskopuyla Dünya Sağlık Örgütü önerileri baz alınarak likefaksiyon, semen volumü, sperm konantrasyonu, toplam sperm sayısı ve motilite ölçümü için incelenmiştir. Sperm DNA hasarı, alkaline single-cell gel elektroforez(Comet) testi ile değerlendirilmiş. Spermin hasar görmüş ya da normal olmasına comet tail varlığına göre karar verilmiştir. Her örnekte 50'den 100'e kadar comet hesaplanmıştır. DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi TUNEL testi ile yapılmış ve test florasan in-stu hücre ölümü detektörü kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir lamda aynı gözlemci tarafından floresan mikroskop kullanılarak 200 sperm incelenmiş ve FCCE testi akrinin orange strain kullanılarak yapılmıştır. Histon retansiyonunu değerlendirmek için aniline blue staining, protamin analizi için nükleer protaminler saflaştırılmış ve protamin 1/Protamin 2 oranı (P1/P2) hesaplanmış, standart insan protamini hazırlanmış ve asetik asit-üre jel elektroforezi kullanılmıştır.

İstatistiksel analizde eşik değerler; alkalın comet testi için %18 hasarsız DNA veya %82 hasarlı DNA, TUNEL testi için %10, FCCE için '27 DNA fragmentasyonu olarak belirlenmiştir. Embriyo kalitesi blastomer sayısı ve fragmentasyon derecesi baz alınarak değerlendirilmiş ve birden fazla embriyo olduğu durumlarda ortalama değer alınmıştır.

Sperm DNA hasarı, fertilizasyon ve sperm parametreleri arasındaki ilişkiler incelenirken Spearman Rank korelasyon testi kullanılmış. Kruskal-Wallis non-parametrik testi hastaları yaşa göre kategorize ederken kullanılmıştır.

YÜT sonrası gebelik elde eden çiftler ile başarısız olan çiftler arasında karşılaştırma yapıldığında semen profilleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Sadece başarısız olan çiftlerde sperm yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmüştür. Semen profilleri, erkek yaşı ve DNA hasarı arasında ilişki araştırıldığında TUNEL ve FCCE'ye göre sperm DNA hasarı ile semen parametreleri arasında ilişki görülürken, Comet testine göre korelasyon gözlenmemiştir. Testlerin kendi aralarındaki DNA hasararı ölçümü karşılaştırıldığında TUNEL'in Comet testi ile korele olduğu ancak Comet testi ve FCCE arasında korelasyon olmadığı saptanmıştır. Sperm DNA hasarı ile YÜT sonrası fertilizasyon sonuçları ilişkisi incelendiğinde, Comet testine göre DNA hasarı olan hastalardan IVF uygulanan grupta gebelik oranları düşük bulunurken, ICSI uygulanan grupta böyle bir ilişki tespit edilmemiştir. Hastalar DNA hasarına göre normal ve hasar görmüş olarak kategorize edildiğinde (Comet testine göre %82 anormal DNA) ise hem ICSI, hem de IVF'te belirgin şekilde düşük gebelik sonucu elde edildiği görülmüştür. FCCE testine göre ise fertilizasyon oranlarıyla ilgili korelasyon tespit edilmemiştir.

Sperm DNA hasarı ile YÜT sonrası embriyo eldesi arasındaki ilişki incelendiğinde, Comet testinde saptanan DNA hasarı ile embriyo kalitesi arasında negatif ilişki bulunmuştur (blastosit sayısı baz alınarak). Yine hastalar Comet testine göre normal-hasarlı olarak sınıflandırıldığına hasarlı DNA'ya sahip olan hastalarda 3. ve 5. gündeki embriyo kalitesinde belirgin düşüklük saptanmış, ancak TUNEL ve FCCE testlerine göre ise herhangi bir ölçülebilir korelasyon görülmemiştir. Comet ve TUNEL testlerine göre sperm DNA hasarı yüksek olan grupta YÜT sonrası implantasyon oranı belirgin düşük saptanmış ancak FCCE ile böyle bir ilişki gösterilememiştir. Aynı şekilde YÜT son-

rası gebelik elde edilemeyen hastaların ortalama DNA hasarı yüzdesi Comet ve TUNEL testlerinde belirgin şekilde yüksekken, FCCE testine göre gebelik elde edilen ve edilemeyen grubun DNA hasar yüzdeleri arasında fark görülmemiştir. Comet ve TUNEL testleri kullanılarak YÜT sonrası başarılı gebelik ihtimaline dair tahmin yürütülebileceği öngörülmüştür.

Sperm parametreleri ve DNA hasarı ile histon proteini retansiyonu arasında ilişki olup olmadığı incelendiğinde, Comet, TUNEL ve FCCE testlerinin üçü de histon retansiyonunun sperm DNA hasarını arttırdığını göstermiştir. Histon retansiyonu ile fertilizasyon oranı ve blastosist kalitesi arasında bir ilişki ölçülememiştir. Protamin içeriğinin azalması DNA Comet testine göre DNA hasarı ile ilişkili bulunmuş. Her üç teste göre protamin oranı (P1/P2) ile DNA hasarı arasında ilişki gösterilememiştir. Yaş ile protamin oranı incelendiğinde P1/P2 oranı ile negatif ilişki gösterilmiş. Toplam protamin miktarı (P1+P2) ile normal histon proteini retansiyonu ile pozitif orantı bulunmuş, ancak protamin miktarları, protamin oranı normal ve anormal olarak kategorilere ayrıldığında, YÜT sonuçlarını etkilemediği görülmüştür.

Bu çalışma spermin DNA'sındaki Comet, Tunel ve FCCE testlerine göre ölçülen hasarın YÜT sonuçlarını etkileyebildiğini göstermektedir. Özellikle histon proteinleri ve protaminler başta olmak üzere nükleer proteinlerindeki anormallikle DNA hasarı arasında ilişki saptanmış yol açtığı ancak direkt olarak bu proteinler ile YÜT sonuçları arasındaki ilişki zayıf olarak değerlendirilmiştir. Fakat DNA hasarı ile YÜT sonuçları arasında (fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi, blastosist kalitesi, implantasyon ve gebelik oranı) kuvvetli bir ilişki görülmüştür. Sonuçları öngörmede Comet testi, TUNEL ve FCCE'ye göre daha başarılı saptanmış.

Çeviri

Dr. Emir Akıncıoğlu, Prof. Dr. Barış Altay

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı