

İnsan spermatozoasında geniş nükleer vakuol anormal kromatin paketlenmesini gösterir

Franco JG, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LFI, Felipe V, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RLR, Oliveira JBA, Vagnini LD.
Int J Androl 2012; 35: 461-451

Sperm DNA hasarı yardımcı üreme teknikleri (YÜT) sonuçlarını olumsuz ve bulgular infertil erkeklerde fertil erkeklere oranla daha fazla sperm DNA hasarı olduğunu göstermektedir. Bartoov ve ark. yüksek görüntüleme hareketli spermilerin değerlendirmesinde kullanılan motil sperm organel morfolojik inceleme (MSOME) isimli yöntemi tanımlamışlardır. Bu yöntemle sperm anomalisi ile DNA hasarı arasındaki ilişkiden yola çıkılarak yüksek görüntüleme morfolojik anomalili sperm değerlendirilmesi yapılarak, ICSI sonuçlarının daha iyileştirilmesi amacıyla seçilmiş sperm ile mikroenjeksiyon tekniğinin uygulandığı IMSI yöntemi geliştirilmiştir. DNA hasarının gelişim nedenleri arasında apoptozis, oksidatif stres ve anormal kromatin yapılanması bulunmaktadır. MSOME sınıflaması sırasında anormal DNA yapısı ile ilişkili nükleer anormaliler arasında özellikle de nükleer alanın %50'sinden fazlasını içeren geniş nükleer vakuol (GNV) varlığı önemlidir.

Bir polimeraz inhibitörü olan chromomycin A3 (CMA3) normal protaminlerin indirekt değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Yapılan çalışmalarda protamin ve CMA3 arasında spermatozoanın protaminasyon derecesi bakımından ters bir ilişki olduğunu belirtilmektedir. CMA3 varlığında polimeraz 1'in DNA'ya bağlanması önlenmektedir. Yapılan çalışmalarda CMA3 negatif spermatozaların hemen hiçbirisi çıplak DNA sarmalı içermediği belirtilmektedir. Çünkü CMA3 bu spermilerin DNA'sına erişemez. Bu bulgulardan yol çıkarak bu çalışmada GNV olan spermelerde normal veya anormal sperm kromatin yapılanması varlığının CMA3 boyası ile değerlendirilmesi yoluna gidilmiştir.

Toplam 66 hastadan taze sperm örneği alınarak değerlendirme yapıldı. MSOME değerlendirilmesi 0,02 ml ejakülat pelletinde daha önce tanımlanan yöntemlerle hazırlanarak Nomarski kamerasında ve 8400X büyütme altında yapıldı. Düz, simetrik ve oval yapılanma normal nükleer yapı varlığı olarak kabul edildi. Normal sperm başı

4,75±2,8 µm boyunda ve 3,28±0,20 µm genişliğinde ölçüldü. GNV ise modifiye Bartoov sınıflaması olarak sperm nükleer alanının %50'sinden daha büyük bir veya daha fazla vakuol varlığı olarak tanımlandı.

Sperm kromatin yapısı normal ve GNV'lü spermeleri içeren yaymada CMA3 boyası ile değerlendirildi ve soluk CMA3 boyanma normal, parlak CMA3 boyanma ise anormal kromatin yapısı olarak kabul edildi.

MSOME değerlendirmesine göre 66 hastada yapılan semen analizinde değerlendirilen spermilerin %1,04±0,96'si normal, %30,1±17,8'si GNV'lü spermeler olarak ayrıldı. CMA3 boyanması sonuçları incelendiğinde normal spermatozoaların (n=835) 337'si (%40,3), GNV'lü spermatozoaların (n=1351) ise 719'u (%53,2) pozitif boyanma gösteriyordu. CMA3 boyanan spermatozoa oranı GNV'lü spermelerde normal spermelere göre istatistiksel olarak anlamlı farklı idi (p<0,0001). Negatif boyanan spermatozoaların ise 498'i normal, 632'si GNV'lü idi.

YÜT uygulamalarındaki önemli sorunlar çoklu embriyo transferleri, tekrarlayan başarısız uygulamalar, negatif gebelik sonuçları ve genetik anomali veya konjenital malformasyon oranlarındaki artışlardır. Ancak, bu sorunların YÜT'nin neden olduğu genetik sorunlardan mı kaynaklandığı yoksa infertil bireylerin sahip temel sorunlardan mı kaynaklandığı halen daha net değildir. MSOME yönteminin kullanılarak seçilmiş sperm ile işlem yapılması daha iyi YÜT sonuçlarını sağlaması ve bu konuların açıklanması açısından faydalı olabilir gibi görünmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda GNV varlığının kötü YÜT sonuçları ve artmış DNA fragmentasyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, Perdrix ve ark. GNV'lü spermatozoalarda DNA fragmentasyonunun artmadığını belirtmiştir. Araştırmacılar bu verilerini iki noktaya dayandırmaktadırlar. Bunlardan ilki doğal süreçte DNA fragmentasyonu öncesinde hiçbir değerlendirme yönteminin olmamasıdır. Ölü spermatozoalar normal analizde incele-

nirken GNV'li spermatozoaların değerlendirilmesi özel teknikler ile yapılmaktadır. İkincisi ise GNV tanımındaki farklılıklardır. Bazı araştırmacılar GNV'li %50'den fazla bir veya iki vakuol olarak tanımlarken bazı araştırmacılar sperm nükleer alanının %13'ünden daha büyük vakuol alanı olarak tanımlamaktadırlar. Son yapılan bir çalışmada ise GNV varlığının akrozom reaksiyonu yokluğu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Sperm DNA'sında histonların protaminlerle yer değiştirmesi DNA hasarından korunmada esas mekanizmadır. Sperm kromatin yapılanması spermatozoayı kimyasal ve fiziksel hasarlardan koruyucudur. CMA3 boyanması protamin değerlendirmesi için kullanılan bir yöntemdir ve normal protamin varlığında boyanma izlenmezken protamin yokluğunda parlak boyanma izlenir.

Bu çalışmada normal ve vakuollü spermatozoaların CMA3 ile boyanmasının GNV'lerin anormal protamin yapılanması ile ortaya çıkan sperm DNA hasarı ile ilişkili olup olmadığı değerlendirilmiştir. CMA3 pozitif boyanma olan spermatozoa oranı GNV'li spermatozalarda normal spermatozalara oranla daha fazladır izlenmiş ve bu durumun DNA hasarı ile kolaylaştığı saptanmıştır. Sonuç olarak, geniş vakuoller yüksek büyütme altında MSOME ile değerlendirilebildiği için bu spermlerden kaçınılmalıdır. Diğer taraftan, yüksek görüntüleme tekniğinin ICSI aşamasında motil sperm seçiminde kullanılmalıdır.

Çeviri:

Prof. Dr. M. Murad Basar

Memorial Şişli Hastanesi, Üroloji-Androloji Bölümü