

## SEMEN ANALİZİ VE YORUMLANMASI | INTERPRETATION OF SEMEN ANALYSIS

## Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

### Methods for The Determination of Sperm DNA Damage

Hakan Koyuncu

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

#### Özet | Abstract

Sperm DNA bütünlüğünü farklı yönlerden değerlendiren birçok test olmakla birlikte optimal teknik veya uygun klinik eşik değer seviyesi konusunda henüz bir fikir birliği yoktur. İnfertil erkeklerde sperm DNA hasarı yüksek olarak saptanmaktadır ve yardımcı üreme tekniklerinin başarı oranları ile ters ilişkilidir. Buna rağmen, sperm DNA hasarının IVF ve ICSI sonuçlarına olan etkisi halen tartışmalıdır. ICSI için kullanılan hasarlı sperm DNA'sının doğacak çocukta oluşturabileceği potansiyel etkiler konusunda bilgilerimiz henüz başlangıç aşamasındadır ve ileri araştırmalar gerektirmektedir. Sperm DNA bütünlüğünün erkek infertilitesi üzerindeki potansiyel etkisi bilinmekle birlikte, sperm DNA hasarının oluşum mekanizmalarını ve üreme sonuçlarında klinik anlamlılığını ortaya koyacak geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** DNA hasarı, sperm, infertilite

A large number of tests are available to assess different aspects of sperm DNA integrity, but there remains no consensus on the optimal technique or appropriate clinical cut-off levels. High levels of sperm DNA damage are found in infertile men and have a negative correlation with assisted reproductive technology outcomes. However, the impact of sperm DNA damage on IVF and ICSI reproductive outcomes remain more controversial. Understanding of the potential consequences on the offspring of using sperm with DNA damage in ICSI remains very basic and warrants further investigation. While the testing of sperm DNA integrity has a potential impact on male infertility, additional studies and large scale trials are needed to further elucidate and define the mechanisms of sperm DNA damage and their clinical significance in reproductive outcomes.

**Key words:** DNA damage, sperm, infertility

#### Giriş

İnfertil çiftlerin yaklaşık %20'sinde sadece erkek faktörü temel nedendir. Kadın ve erkek faktörü birlikteliği de dahil edilirse bu oran %30-%40'lara ulaşmaktadır.(1, 2) Günümüzde, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde rutin semen analizi kullanılmaktadır ancak infertil erkeklerin yaklaşık %15'inde normal semen analiz sonuçlarına rağmen infertilitenin kesin tanısı rutin semen analizi ile konulamamaktadır.(3, 4) Dolayısıyla fertil ve infertil erkeği kesin olarak birbirinden ayıracak, gebelik sonuçlarını öngöreceği yeni belirteçlere ihtiyaç artmıştır ve dikkatler sperm DNA bütünlüğü üzerine yoğunlaşmıştır.

Son on yıllık süreçte, erkek infertilitesinde sperm nükleer DNA bütünlüğünün rolünü araştıran çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalarda erkek infertilitesini öngörmede sperm DNA bütünlüğünün rutin semen analizine göre daha iyi bir belirteç olabileceği hipotezi savunulmuştur. Sperm DNA hasarının infertil erkeklerde fertil erkeklere oranla daha fazla görüldüğü ve sperm DNA hasarının bu hastalarda fertilitate potansiyelini negatif etkilediği kanıtlanmıştır.(5-10) Düşük sayı, motilite ve anormal morfoloji gibi bozuk semen parametreleri sıklıkla

yüksek sperm DNA hasarı ile birliktelik göstermektedir ancak normal semen paramaterelerine sahip hastaların %8'inde sperm DNA hasarı olduğu da bilinmektedir.(9, 10) İlaveten, hasarlı DNA'ya sahip spermelerin intrastoplazmik sperm enjeksiyonunda (ICSI) kullanımına bağlı potansiyel sonuçları konusunda kaygılar mevcuttur.(11)

Son on yıllık süreçte, insan sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla birçok test çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır ancak bu testlerin kesin olarak neyi ölçtüğü, normal ve anormal eşik değerlerinin ne olduğu, anormal sonuçların klinikte hastalara yansımalarının neler olduğu ve etkinlikleri gibi birçok soru halen tam anlamıyla cevap bulamamıştır. Bu derlemede, sperm DNA hasarını saptama yöntemleri ve bunların klinik sonuçları değerlendirilecektir.

#### Sperm DNA Bütünlüğünü Değerlendiren Testler

##### Sperm Kromatin Yapısı Tayini (Sperm Chromatin Structure Assay) (SCSA)

SCSA testi ilk defa 25 yıl önce tarif edilmiştir.(12) Bu test anormal kromatin yapısına sahip DNA'nın asit veya ısı dena-

türasyonuna daha yatkın olması prensibine dayanmaktadır. (13, 14) SCSA testi, akrinin turuncusunun renk değiştiren özelliğini kullanarak, asitle indüklenmiş denatürasyona sperm DNA'sının duyarlılığını ölçmektedir. Akrinin turuncusunun asit eklendikten sonra yeşilden kırmızıya dönüşümü akım sitometri yöntemiyle tayin edilmekte ve DNA denatürasyon genişliği saptanmaktadır.(13, 15) SCSA testi ile ölçülen parametre DNA denatürasyonunu gösteren DNA fragmentasyon indeksi (DFI) dir.

#### **Akrinin Turuncu Testi (Acridine Orange Test) (AOT)**

AOT testi de SCSA ile benzer prensiplere dayanmaktadır. Akrinin turuncusunun asitli ortamda yeşilden kırmızıya dönüşmesi ile DNA denatürasyon genişliğini floresan mikroskopta değerlendirmesi esasına dayanır. SCSA testine göre daha basit, ucuz ve SCSA'da olduğu gibi eğitimli bir teknisyen gerektirmemektedir.(16) Ancak, bulanık renkler, hızlı renk kaybolması ve heterojen boyanmaların çıplak gözle yorumlanmasındaki zorluklar bu testin negatif yönlerini oluşturmaktadır.(17)

#### **Toludin Mavisi (Toluidine Blue) (TB)**

TB sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan temel boyadır. Zayıf paketlenmiş kromatine ve/veya hasarlı DNA'ya sahip nükleustaki sperm DNA'sının fosfat rezidüleri TB gibi baz boyalara bağlanmaya daha eğilimlidir.(18) Bu nedenle ışık mikroskopta hasarlı sperm mavi ile boyanırken normal sperm renksiz kalacaktır. Test bu prensibe dayanmaktadır.

#### **Anilin Mavisi (Aniline Blue)**

Anilin mavisi sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan asidik bir boyadır. Hasarlı DNA'ya sahip sperm sıklıkla rezidüel histonları açığa çıkarmaktadır. Bu rezidüel histonlar zayıf kromatin paketlenmesine, ana nükleoproteinlere kolay ulaşılmasına ve de anilin mavisi gibi asidik boyalara bağlanmaya yatkınlığa yol açmaktadırlar.(19, 20)

#### **TUNEL [The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine (TdT) Triphosphate (dUTP) Nick End Labeling Assay]**

Bu test direkt olarak DNA kırıklarını ölçmektedir.(21) TdT enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla tek veya çift zincir DNA kırıklarına dUTP birleştirilir ve bu DNA kırıkları işaretlenir. İşaretlenen bu kırıklar ışık mikroskopisi, floresan mikroskopisi ya da akım sitometrisi ile ölçülür.(21) Sonrasında sperm TUNEL pozitif ya da negatif olarak sınıflandırılır ve total sperm popülasyonuna oranlanır (Resim 1A).

#### **Asıl Çentik Okuma Tayini (In Situ Nick Translation Assay) (NT)**

NT, TUNEL testine benzer bir mekanizma olan dUTP'in DNA kırıkları ile birleşmesi esasına dayanarak sperm DNA hasarını tespit eden bir yöntemdir. Ancak, TUNEL testi hem

tek hem de çift zincir DNA kırıklarını tespit ederken NT sadece tek zincir DNA kırıklarını tespit etmektedir. NT testinde bu kırıkların tespitinde DNA polimeraz I'in katalize ettiği bir enzimatik reaksiyon kullanılmaktadır. Rölatif olarak basit uygulanabilir test olsa da diğer testlere göre sensitivitesi düşüktür.(22)

#### **Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)**

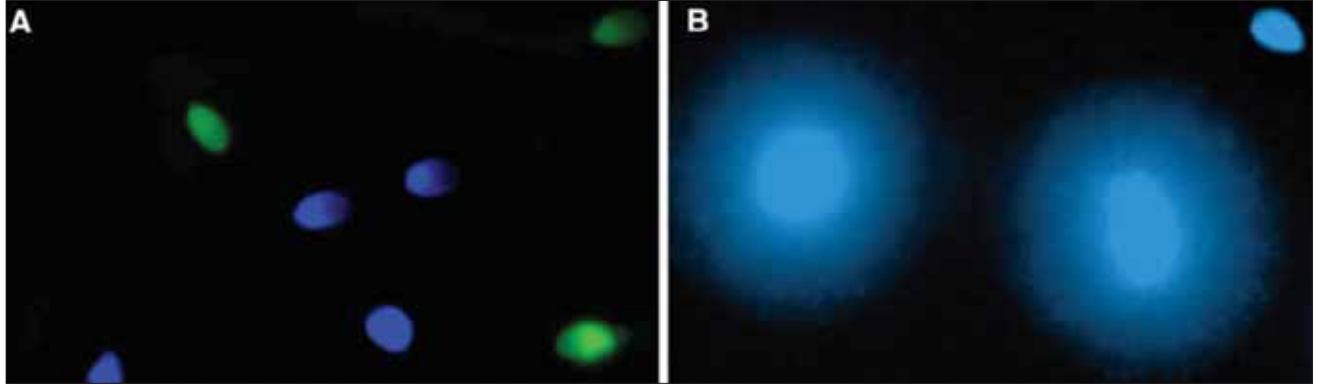
Tek hücre jel elektroforezi sperm DNA hasarını direkt değerlendiren bir diğer testtir.(23) Yoğunluğu azaltılmış sperm agaroz jele yerleştirilir ve floresan DNA bağlayan boya eklenmiş elektroforetik bir gradiente maruz bırakılırlar. Sonrasında da görüntülenirler. Düşük moleküler ağırlıklı olan, tek ve çift zincirli DNA parçaları elektroferez esnasında hareket eder ve tipik kuyruklu yıldız görüntüsünü oluştururlar.(24) Yüksek molekül ağırlıklı, bozulmamış DNA segmentleri hareket etmez. Fazla DNA kırığı içeren spermelerde artmış kuyruk uzunluğu ve floresan bütünlüğü görüntülemeye değerlendirilir.(25, 26)

#### **Sperm Kromatin Ayrılma Testi (Halosperm Test) (Sperm Chromatin Dispersion Test) (SCD)**

Sperm kromatin ayrılma testi sperm DNA fragmentasyonu ile direkt ilişkili uyarılmış kondensasyon (yoğunlaştırma) prensibine dayanmaktadır.(27) İntakt sperm agaroz matrisi jele yerleştirilir ve denature olması için asit solüsyon eklenir. Sonrasında sperm membranı ve proteinlerinin uzaklaştırılması için litik bir tampon solüsyon daha eklenir. Bu solüsyonun eklenmesi ile nükleoidin oluşturduğu santral bir kor etrafında ayrılmış DNA halkalarına bağlı periferel bir halo görüntüsü oluşur. Normal DNA'ya sahip sperm geniş halo oluşturacak şekilde DNA'larını salarlar (Resim 1B). Çok küçük halo veren ya da hiç halo oluşturmayan sperm fragmente DNA içeren spermeldir (28). Sperm direkt ışık mikroskobunda görüntülenmesi için Wright's boyası veya floresan mikroskopta görüntülenmesi için floresan boya ile boyanabilir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi DNA bütünlüğünü ölçen birçok test mevcuttur. Bu testlerde sperm DNA bütünlüğünü ölçmek için kullanılan mekanizmalar farklılık gösterse de genel olarak birbirleri ile korelasyon göstermektedirler. SCSA testinin COMET (29), TUNEL (17,30), TB (31) ve SCD (17) testleri anlamlı pozitif korelasyonu gösterilmiştir. TUNEL testinin de TB (31) ve AOT (9,10) ile güçlü pozitif korelasyonu da gösterilmiştir. SCSA, TUNEL ve SCD testinin benzer DNA fragmentasyon seviyelerini öngördüğü gösterilmiştir.(17) Ancak, yakın zamanda AOT testinin sperm DNA fragmentasyonu tayininde yüksek varyasyon sergilediği ve SCSA testi ile anlamlı korelasyon sergilemediği gösterilmiştir.(17)

Sperm konsantrasyon, motilite ve morfoloji gibi standart semen parametrelerinin COMET, TUNEL veya SCSA testleri ile ölçülen DNA fragmentasyonu seviyeleri ile negatif korelasyonu gösterilmiştir.(5-10, 32-35) Buna ek olarak, korelasyon dereceleri testler arasında değişken olsa da



**Resim 1. A) mavi sperm: TUNEL negatif, yeşil sperm: TUNEL pozitif Resim B) Sağ üst köşede fragmente DNA'ya sahip sperm.**

testlerin hepsi anormal semen parametrelerine sahip hastaların yüksek DNA hasarına sahip olduğunu bildirmektedir.(36)

Bu testlerin aynı hastada tekrarlanabilirliği de testlerin güvenilirliğinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Standart semen parametreleri aynı bireyde zaman içinde değişiklik gösterebilir.(37-39) Buna rağmen, TUNEL ve SCSA testlerinin sperm DNA hasarın ölçmede zamana bağlı stabilitesi gösterilmiştir.(9, 10, 40-42)

### **Sperm DNA Hasarı Tayini ve Üreme Teknikleri Sonuçlarına Etkisi**

#### **In vivo Fertilizasyon**

Sperm DNA hasarının erkek fertilesine negatif etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, fertil hastalarla karşılaştırıldığında infertil hastalarda yüksek sperm DNA hasarı olduğu vurgulanmaktadır.(5, 8, 34, 35, 43-46) Yakın zamanda yapılmış birkaç çalışmada TUNEL testi için %20 sperm DNA fragmentasyonu eşik değerinin infertil hastaları fertil hastalardan ayırmada kullanılabileceği gösterilmiştir.(40, 41) Ayrıca, SCSA testinde  $\geq 30$  veya  $>40$  DFI eşik değerlerinde gebeliğin sıfır olma ihtimali gösterilmiştir.(5, 8) Yakın zamanda yapılan bir meta-analizde DFI oranı  $<30$  olan ve bilinen fertilitate problemi olmayan çiftlerin in vivo fertilizasyon ile 7 kat daha fazla gebelik/doğum sağlayabileceği belirtilmiştir.(47) Genel görüş artan %DFI oranları düşük gebelik oranları ile ilişkili iken yüksek %DFI oranları gebeliği tamamen imkansız hale getirmemektedir şeklinde olsa da önerilen eşik değerlerin validasyonu için geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Intrauterin inseminasyon'un (IUI) kullanıldığı in vivo fertilizasyon için sperm DNA bütünlüğünün yüksek prediktif değeri olduğu kanıtlanmıştır. Birçok çalışmada, IUI sonrası gebeliğin başarısız olduğu çiftlerde sperm DNA hasarının anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir.(34, 35, 48-50) 387 IUI siklusunu içeren bugüne kadarki en geniş seride DFI  $>30$  olan hastalarda biyokimyasal gebelik, klinik gebelik ve doğum oranları anlamlı oranda düşük bulunmuştur.(48) Bununla birlikte, bir meta-analizde DFI  $<30$  olan infertil çiftlerde IUI ile 7.3 kat daha fazla oranda gebelik şansının

olduğu bildirilmiştir.(47) Bütün bu çalışmalar sperm DNA bütünlüğünün IUI sonuçları ile yüksek prediktif değere sahip olduğunu göstermektedir.

#### **In vitro Fertilizasyon**

Son 5 yılda sperm DNA bütünlüğü ile IVF ve ICSI uygulamalarının sonuçları arasındaki ilişki daha çok araştırılmıştır. In vivo fertilizasyon sonuçları ile sperm DNA bütünlüğü arasındaki yüksek pozitif prediktif değerlerin bilinmesine karşın IVF ve ICSI sonuçları ile sperm DNA bütünlüğü arasında bu kadar net bir ilişkinin varlığı henüz gösterilememiştir. Birçok klinik çalışmada sperm DNA hasarı ile fertilizasyon oranları arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır.(51-60) SCSA ve TUNEL testlerinin kullanıldığı yakın zamanda yapılan bir meta-analizde sperm DNA hasarı ve fertilizasyon oranları arasında bir ilişki saptanmamıştır.(61) Buna rağmen başka çalışmalarda sperm DNA hasarı ile fertilizasyon oranları arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır, (62-65) Ayrıca, IVF siklusları ile embriyo kalitesinin ilişkisinin araştırıldığı çalışmaların bir kısmında sperm DNA hasarının embriyo kalitesi üzerinde yan etkisi bulunmazken(52, 54, 58, 63, 64) bir kısım diğer çalışmalarda negatif korelasyon belirtilmiştir.(56, 59, 60, 66)

Sperm DNA hasarının üreme üzerine etkilerini değerlendirmek için en önemli parametrelerden biri gebelik sonuçlarıdır. Ancak bu konuda da zıt görüşler mevcuttur. İlk çalışmalar yüksek sperm DNA hasarı olan hastaların IVF ve ICSI ile düşük gebelik oranlarına sahip olduğunu gösterdiler. Bu çalışmalarda eşik değerler SCSA testi için DFI  $>20$ , TUNEL testi için %20 olarak bildirilmiştir(52-55, 58, 59, 62) TUNEL eşik değerini %15 olarak kullanan başka bir çalışmada, düşük ve yüksek sperm DNA hasarı olan hastaların IVF veya ICSI sonucu gebelik oranları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadığı gösterilmiştir.(67) DFI  $>27$  eşik değerini kullanan başka çalışmalarda, yüksek sperm kromatin hasarı olan hastalarda başarılı gebelik oranları bildirilmiştir (48,49,51,68). Buna rağmen, bir çalışmada DFI  $>30$  olan hastalarda ICSI ile gebelik oranlarının IVF'e göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir.(48) Yapılan bir meta-analizde DFI  $<30$  olan infertil çiftlerde ICSI ve rutin IVF'a bağlı gebe

kalma ihtimalinin 2 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir.(47) Buna karşın, bir başka meta-analizde SCSA testi kullanıldığında IVF veya ICSI sonrası gebelik oranlarına sperm DNA hasarının bir etkisi olmadığı ancak TUNEL testi kullanıldığında yüksek sperm DNA hasarı olan hastalarda gebelik oranlarının düşük olduğu vurgulanmıştır.(61)

Literatürdeki bütün bu çalışmalar gözönüne alındığında görülmektedir ki daha doğal yollarla olan fertilizasyon ile (normal koşullar ya da konvansiyonel IVF) sperm DNA bütünlüğü ilişkilidir. Bununla birlikte, SCSA ve diğer sperm DNA hasarını ölçen testlerin üreme sonuçları üzerindeki prediktif gücünün normal konsepsiyon ve IUI'dan IVF ve ICSI'ye doğru gidildikçe azaldığı görülmektedir. Yüksek sperm DNA hasarının gebelik oluşturma şansının az olduğu bilinmektedir ancak gebeliği için üst sınır halen bilinmemektedir.

### Kaynaklar

- Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 1991;56:192-3.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1, 850, 000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991;6:811-6.
- Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*. 2005;84:850-3.
- Centola G, Ginsburg K. Evaluation and treatment of the infertile male. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1996.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039-49.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-93.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997;68:519-24.
- 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.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-7.
- Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 2001;58:258-61.
- Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005;11:337-49.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980;210:1131-3.
- Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 1975;90:411-28.
- Rigler R, Killander D, Bolund L, Ringertz NR. Cytochemical characterization of deoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei. Techniques for obtaining heat denaturation curves with the aid of acridine orange microfluorimetry and ultraviolet microspectrophotometry. *Exp Cell Res* 1969;55:215-24.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980;210:1131-3.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984;42:87-91.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006;27:53-9.
- Mello ML. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry* 1982;74:387-92.
- 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;13:452-62.
- Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988;20:211-7.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993;53:1945-51.
- Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998;4:439-45.
- Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol* 1998;444:79-91.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996;363:89-96.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996;2:613-9.
- Singh NP, Stephens RE. X-ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis* 1998;13:75-9.
- Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;85:371-83.
- Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84:833-42.
- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly



- correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 1997;236:231-7.
30. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995;16:80-7.
  31. Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod* 2004;19:2277-82.
  32. 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.
  33. Bench GS, Friz AM, Corzett MH, Morse DH, Balhorn R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* 1996;23:263-71.
  34. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A. 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.
  35. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003;80:1431-6.
  36. Schulte RT, Dana A, Sigman MO, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:3-12.
  37. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod* 2003;18:2082-8.
  38. Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 1989;10:89-98.
  39. Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 2003;40:62-4.
  40. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Hum Reprod* 2005;20:1921-7.
  41. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20:3446-51.
  42. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 1991;5:115-25.
  43. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:830-9.
  44. Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F. DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999;78:336-9.
  45. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002;78:313-8.
  46. Zini A, Fischer MA, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K. Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology* 2002;60:1069-72.
  47. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006;12:466-72.
  48. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174-9.
  49. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004;19:1401-8.
  50. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002;17:3122-8.
  51. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004;19:1409-17.
  52. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004;81:965-72.
  53. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* 2003;7:477-84.
  54. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003;80:895-902.
  55. 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;15:1717-22.
  56. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002;17:990-8.
  57. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod* 2002;17:184-9.
  58. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16:2160-5.
  59. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004;81:1289-95.
  60. 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;20:3476-80.
  61. Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:367-76.

62. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023-8.
63. Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005;84:130-40.
64. 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;69:528-32.
65. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2005;84:356-64.
66. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82:378-83.
67. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87:93-100.
68. Check JH, Graziano V, Cohen R, Krotec J, Check ML. Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures. *Arch Androl* 2005;51:121-4.