

Sperm DNA anormalliklerinin tespiti ve klinik önemi

Mehmet Ali TÜFEKÇİ, PhD

**Memorial Hastanesi Üremeye Yarımday Teknikler Merkezi
Genetik Laboratuvarı**

14.11.2015

**3.KARTAL ÜROLOJİ GÜNLERİ
TÜAK ANDROLOJİK TETKİKLERDE GÜNCELLEME KURSU**

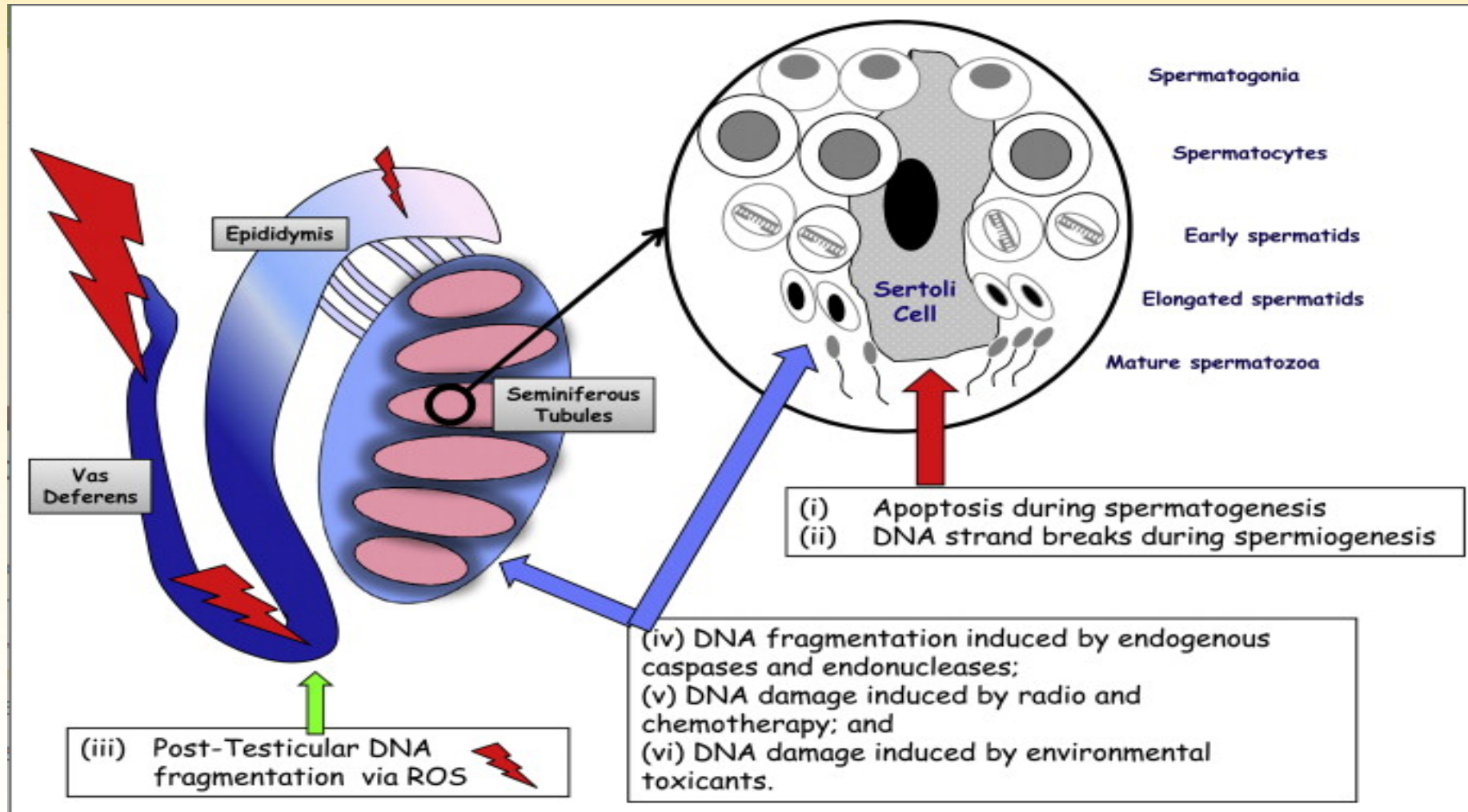
- İnfertilite korunmasız ilişkiye rağmen 1 yıl içerisinde hiç gebeliğin oluşmaması
- Üreme çağındaki popülasyonun ~%12 infertil
- İnfertil popülasyonun ~%50 Erkek faktörü
- Erkek faktörlerinin çoğunluğu (spermde sayı ve motilite azlığı) Üremeye Yardımcı Teknikler (ART: IVF ve ICSI) ile aşılmaktadır



- Erkek infertilitesi temel olarak *Semen analizi* ile tespit edilmektedir
- Rutin semen analizi erkek infertilitesinin tanımlanmasında sınırlı diagnostik değere sahiptir ve ART başarısı için prediktif değildir.
- Örneğin ART başarısızlığı görülen birçok hastada semen parametreleri normal sınırlardadır.
- İnfertil çiftlerin ~%26'sı Açıklanamayan infertilite

Sperm DNA Hasarı

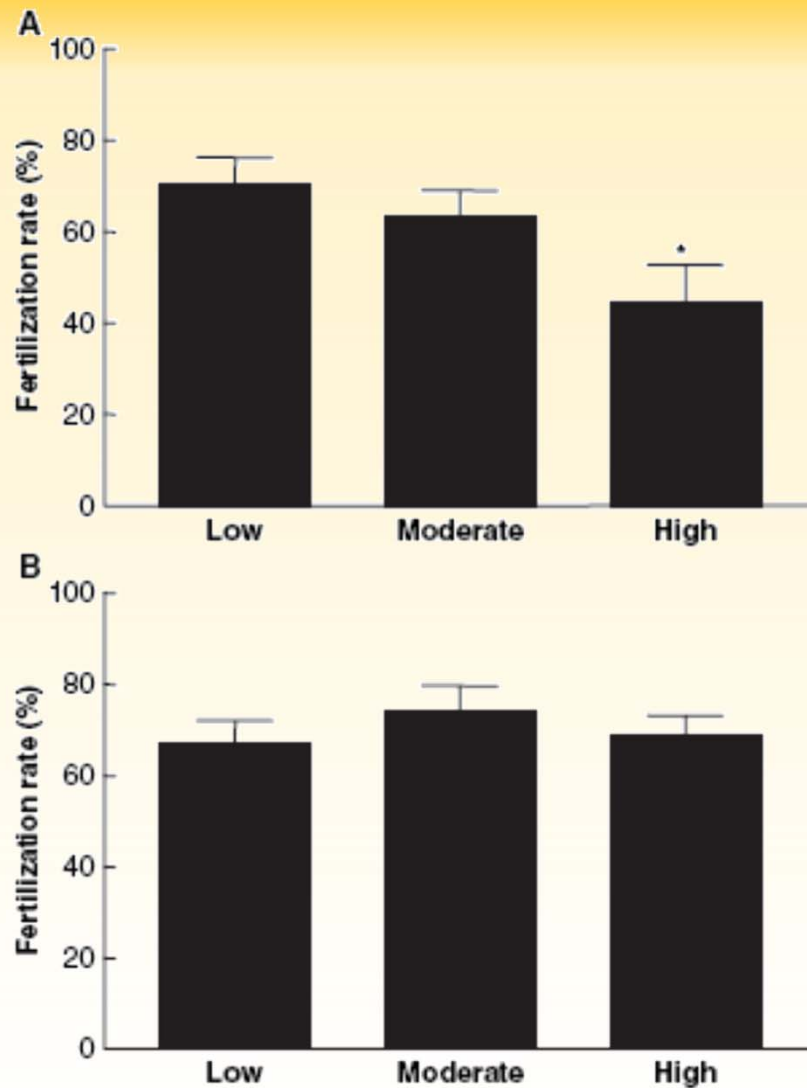
- Sperm DNA hasarı geleneksel Semen analizi yöntemleri ile tespit edilememektedir.
- Sperm DNA hasarı fertilizasyon ve gebelik oranı için belirleyici olabilir??
- Eğer erkek gamet hücreesindeki genetik hasar şiddetli ise embriyonik gelişim durabilir.
- Ayrıca, Spontan Gebelik Kayıpları ve Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlıkları ile ilişkilendirilebilir



Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis

Denny Sakkas, Juan G. Alvarez

Fertility and Sterility Vol. 93, Issue 4, 1 March 2010, Pages 1027–1036



Konvansiyonel IVF de artan DNA hasarı ile döllenme oranı düşmektedir.

ICSI de ise bu ilişki gözlenmemektedir.

Figure 3 Effect of sperm DNA damage on fertilization rate. Data were divided into three groups based on the percentage of DNA damage: Low: <35%; Moderate: 35–55%; and High >55%. (A): in vitro fertilization insemination, (B): intra-cytoplasmic sperm injection insemination. Data expressed as mean \pm SEM.* significantly different from the low damage group ($p < 0.05$).

IVF ve ICSI de artan DNA hasarı ile embriyo kalitesi arasında bir ilişki kurulamamıştır.

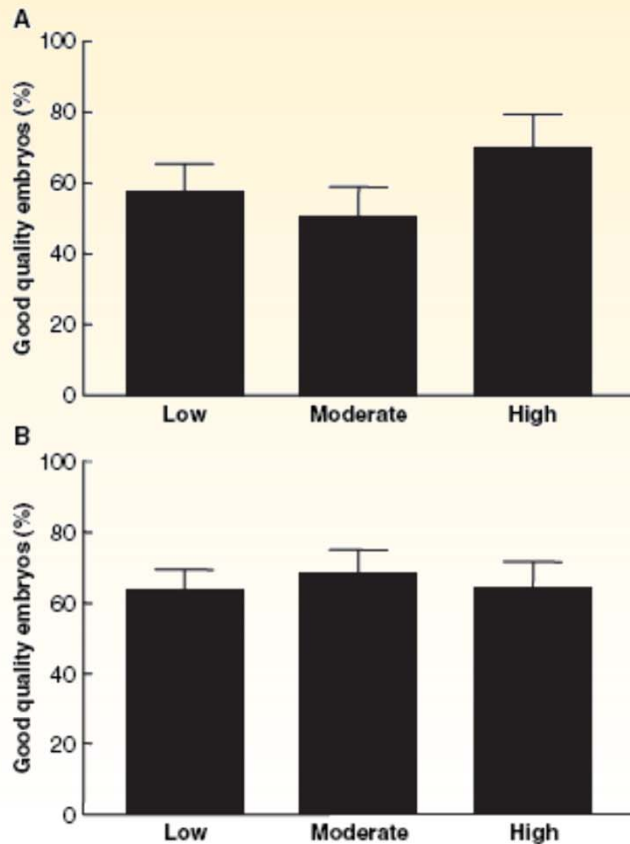


Figure 5 Effect of DNA damage in sperm sample on embryo quality. Data were divided into three groups based the percentage of DNA damage: Low: <35%; Moderate: 35–55% and High >55%. (A): in vitro fertilization insemination, (B): intra-cytoplasmic sperm injection insemination. Data expressed as mean \pm SEM. There was no effect of sperm DNA damage on embryo quality.

ICSI’de gebe kalamayan hastaların oranı, artan DNA hasarı ile anlamlı olarak yükselmektedir. IVF sonuçlarında bu ilişki kurulamamıştır. ICSI sonucunda atlanan doğal dölleme sürecindeki olayların gebelikte ne kadar önemli olduğuna işaret etmektedir.

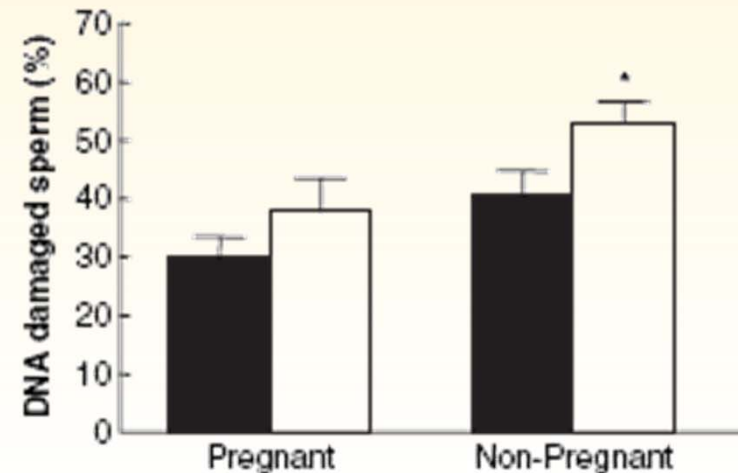


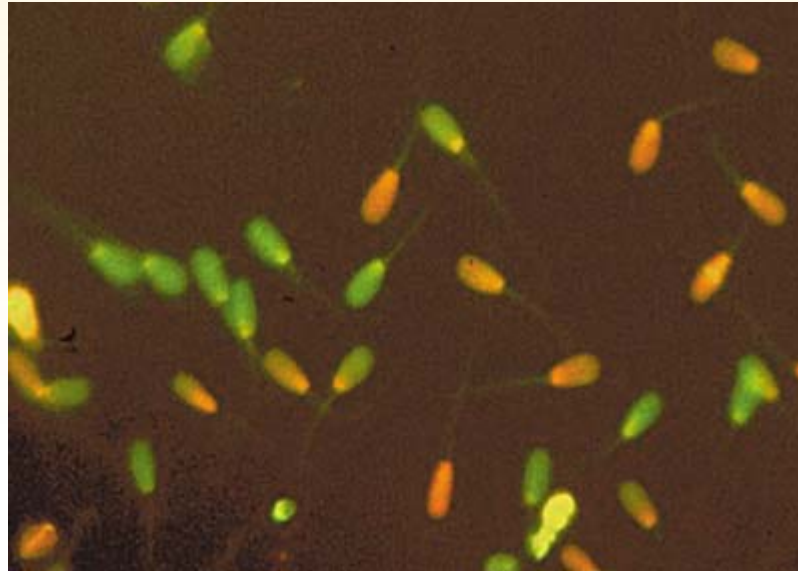
Figure 6 Effect of sperm DNA damage on pregnancy outcome. Solid bars represent in vitro fertilization insemination. Open bars represent intra-cytoplasmic sperm injection insemination. Data expressed as mean \pm SEM. *Significantly different from the non-pregnant group ($p < 0.05$).

Sperm DNA Hasarını Tespit Yöntemleri

- Sperm chromatin structure assay -SCSA (Sperm Kromatin Yapısı Tayini)
- Acridine orange testi
- Toluidin Blue testi
- Anilin Blue testi
- TUNEL (The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine (TdU) Triphosphate (dUTP) Nick End Labeling Assay)
- In situ nick translation (NT- Asıl Çentik Okuma Tayini)
- Comet assay (Tek hücre jel elektroforezi)
- Halotest (Sperm Chromatin Dispersion; Sperm Kromatin Ayrılma Testi)

Sperm chromatin structure assay - SCSA (Sperm Kromatin Yapısı Tayini)

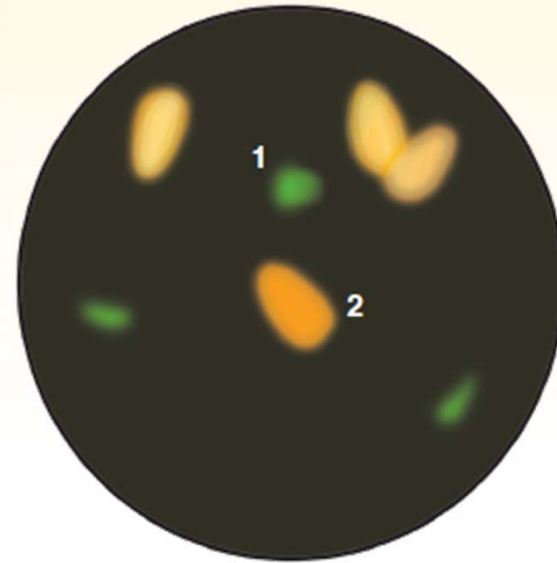
- SCSA anormal kromatin yapısının asit ve ısı ile denatürasyona yatkın olması prensibine dayanır.
- Ölçülen DNA denatürasyonu, DNA fragmentasyon indeksi (DFI)



Acridine orange testi

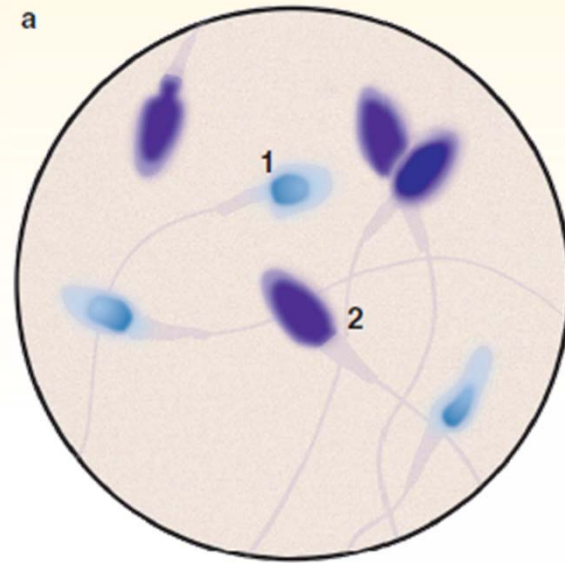
- Akridin turuncu, nükleik asite özgü, katyonik floresan boyadır. Çift sarmal ya da tek sarmal DNA'ya bağlandığında eksitasyon ve emisyonu farklıdır.

1. Denatürasyon olmayan sperm
2. Denatüre DNA ya sahip sperm



Toluidin Blue testi

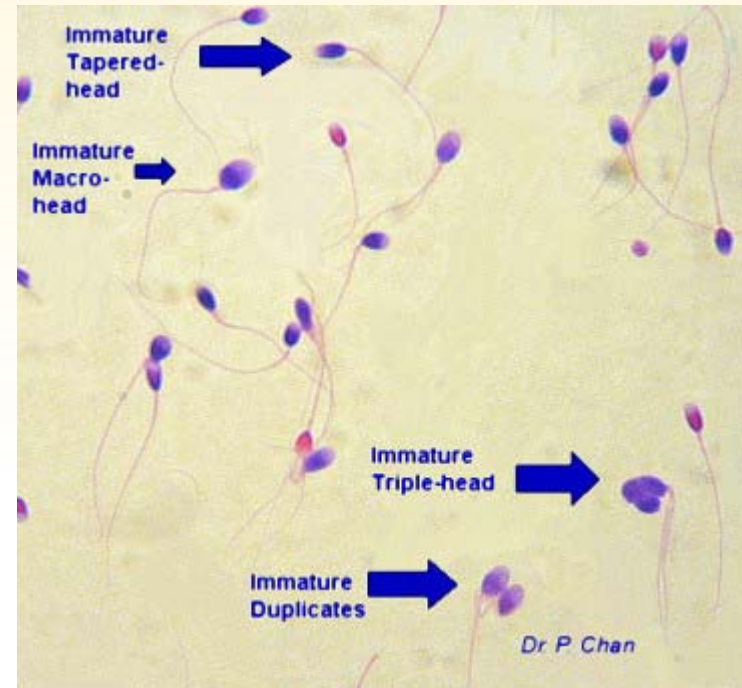
- TB sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan temel boyadır.
- Hasarlı spermeler daha koyu boyanırlar



1. Mature sperm
2. Immature sperm

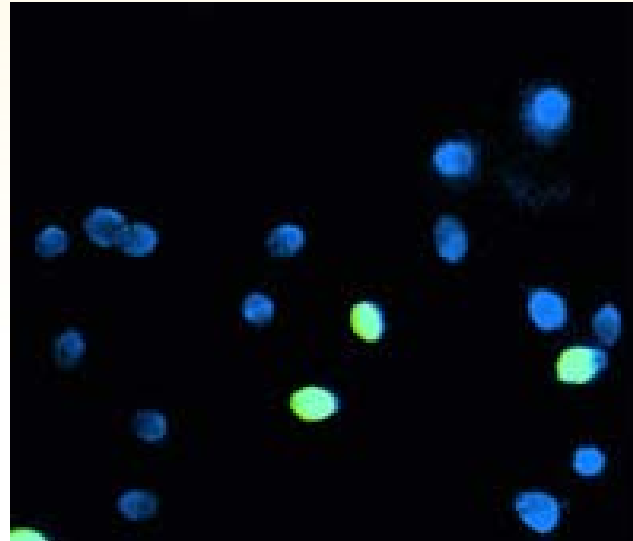
Anilin Blue testi

- Anilin mavisi sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan asidik bir boyadır. Hasarlı DNA'ya sahip spermelerde boya zayıf kromatin paketlemesinden yararlanarak boyama sağlar.



TUNEL Test

- DNA kırıklarını ölçmektedir
- TdT enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla tek veya çift zincir DNA kırıklarına dUTP birleştirilir ve bu DNA kırıkları işaretlenerek ışık mikroskopisi, floresan mikroskopi ya da Flow Cytometry ile ölçülür.

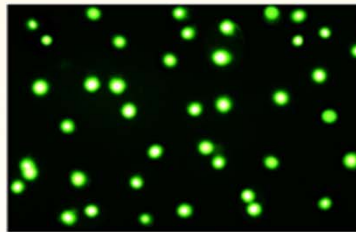


In situ nick translation (NT- Asıl Çentik Okuma Tayini)

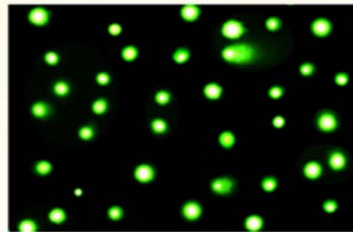
- TUNEL testine benzer bir mekanizma olan dUTP'ın DNA kırıkları ile birleşmesi esasına dayanır. Sadece tek DNA kırıklarını tespit eder.

Comet assay (Tek hücre jel elektroforezi)

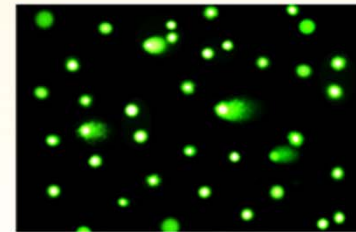
- Agaroz jele yerleştirilen spermler floresan DNA bağlayan boya eklenmiş elektroforetik bir gradiente maruz bırakılarak görüntülenirler. Hasarlı DNA hareket ederken sağlam DNA hareketsiz kalır.



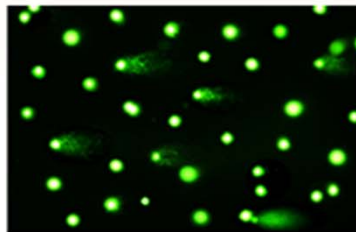
Fragmentation 0%



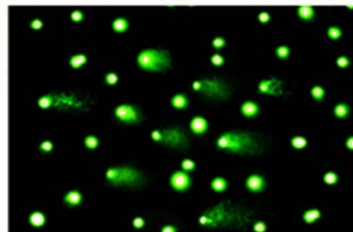
Fragmentation 5%



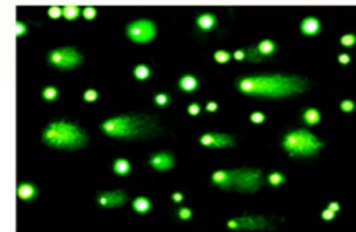
Fragmentation 10%



Fragmentation 15%



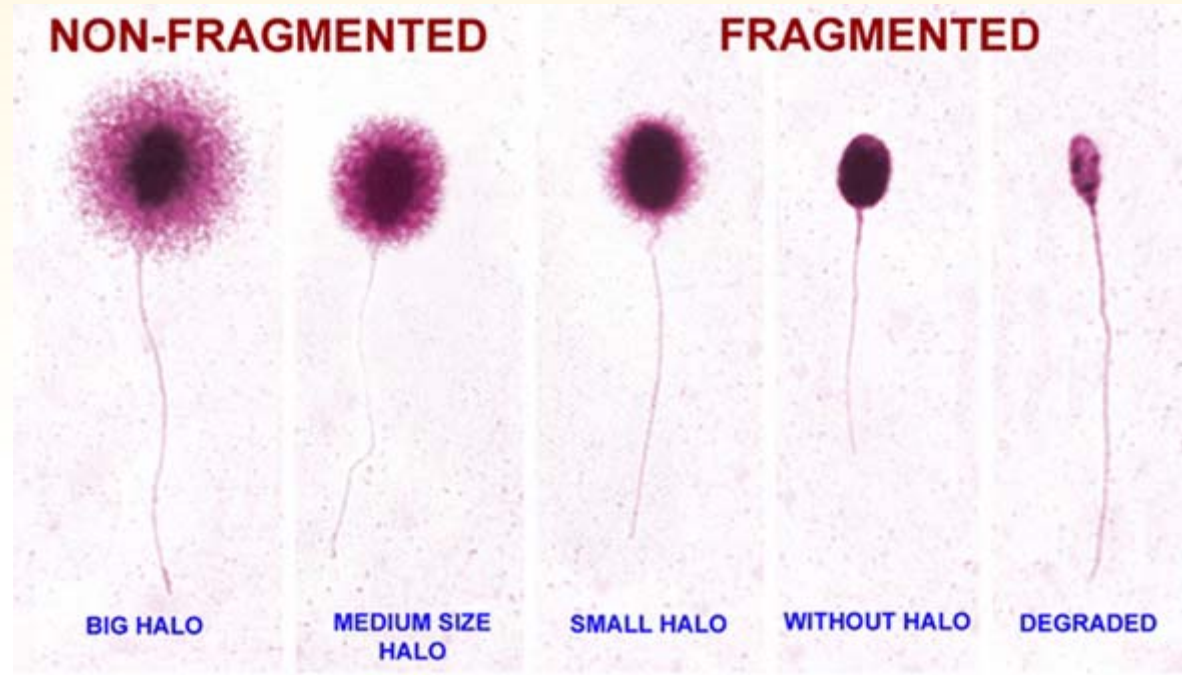
Fragmentation 20%



Fragmentation 30%

Halotest (Sperm Chromatin Dispersion - Sperm Kromatin Ayrılma Testi)

- Agaroz jele yerleştirilmiş sperm asit veya alkaliye maruz bırakılır.
- Sağlam DNA ya sahip spermelerde halo halkaları gözlenir.



Tablo I: Sperm DNA hasarı değerlendirme testleri.

	Prensip	Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
SCSA	DNA denatürasyonuna duyarlılık	Akım sitometrisi	Standardize olması Duyarlılığı yüksek Klinik olarak önemli	Özel ekipman gerektirir
AOT	DNA denatürasyonuna duyarlılık	Floresan Mikroskopisi	Basit ve ucuz	Kişiler arası değerlendirme farkı ve diğer testlerle korele değil
TUNEL	Tek ve çift zincir kırıkları	Akım sitometrisi Floresan mikroskopisi	Duyarlılığı yüksek Klinik olarak önemli	Özel ekipman gerektirir Laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları
COMET	Tek ve çift zincir kırıkları	Tek hücre elektroforezi Floresan mikroskopisi	Duyarlılığı yüksek Kantitatif bir test	Zaman alıcı Standardize olmamış
Anilin Mavi Boyaması	Lizin rezidülerini ve artık histonları boyar	Parlak alan mikroskopisi	Basit ve ucuz	Laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları Heterojen boyanma
Toluidin Mavi Boyaması	Fosfat rezidülerini boyar	Parlak alan mikroskopisi	Basit ve ucuz	Laboratuvarlar arası değerlendirme farklılıkları Heterojen boyanma

Sperm Anöploidi Tayini: FISH

- Sperm genomunda DNA hasarı dışında görülebilecek diğer bir anormallik kromozom sayılarındaki değişikliklerdir.
- Haploid olması gereken sperm genomunda bazı kromozomlarda

bir kopyanın fazla olması **dizomi**

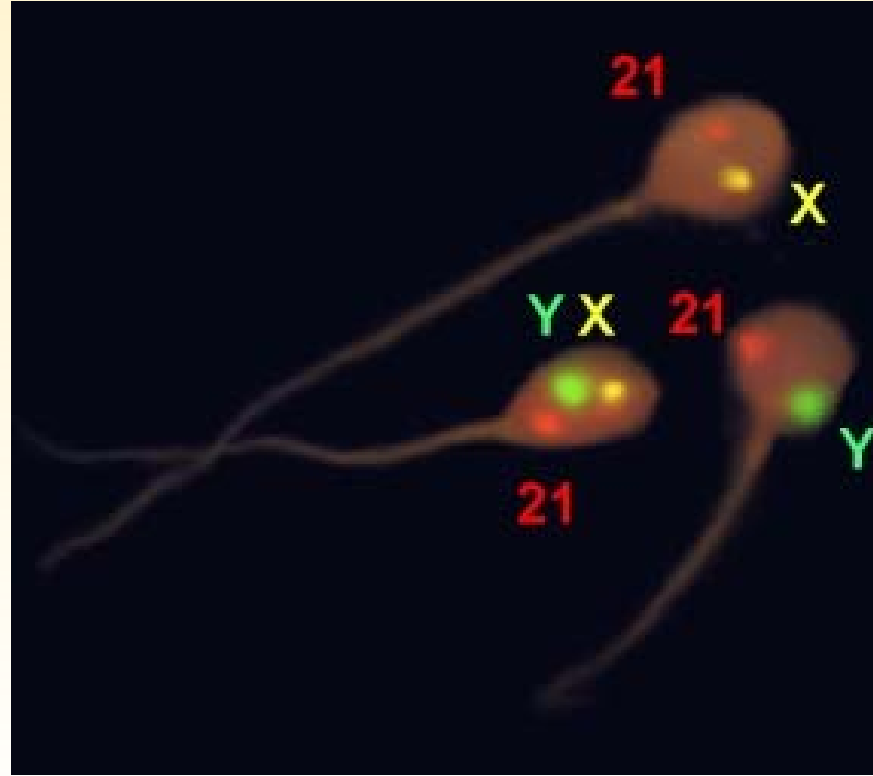
bir kromozomun olmaması **nullizomi**

bir setolarak genomun fazla olması **diploidi**

Sperm Anöplöidi Tayini: FISH

- Bu işlemde, incelenecek kromozomla eşleşmek üzere prob (her prob farklı boya ile işaretli) adı verilen küçük DNA molekülleri kullanılmaktadır.
- Floresans mikroskopu ile yapılan inceleme sonucu her kromozom renklere göre ayırdedilir.
- Analiz edilebilecek kromozomlar 13,16,18, 21, (22),X ve Y'dir.

Sperm FISH



İki sağlıklı sperm ve bir adet cinsiyet kromozomu anöploidi XY
(Andy Wyrobek/Lawrence Berkeley National Laboratory)

- Güncel meta-analizler sonucunda, DNA hasarlı/anöplodik spermelerin IVF ve ICSI sonrası gebelik kayıpları ile de ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.
- Vurgulanması gereken en önemli nokta:
- Tüp bebek tedavisi gereken hastaların spermelerinde daha yüksek **DNA hasarı** bulunma ihtimali yüksektir.
- ICSI işlemleri sırasında, doğal seleksiyon ve sperm yarışının atlandığı düşünülürse tedavide kullanılacak *hasarlı spermin* izole edilmesi veya uzaklaştırılması ve uygun kalitede sperm seçimi daha da önemli hale gelmektedir.

- IVF tedavisi öncesinde erkek partnere Sperm DNA hasarı ya da Anöploidi taraması sonraki tedaviyi çok etkilemeyecektir.
- Bu testlerden fayda sağlayacak grup IUI/IVF planlanacak hasta grubu olabilir.
- Diğer fayda sağlayacak grup ise Spontan Gebelik Kayıpları olan hastalar, ya da Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı olan hastalar

- Erkek translokasyon taşıyıcılığı olan hastalarda ART tedavisine başlama kararı öncesi
- Test sonuçları başarıyı arttırmaktan çok Genetik Danışmanlık verilerek sağlıklı bebek sahibi olabilecek seçeneklere yönlendirme amacıyla;

Donasyon (Türkiye’de kanunen yasak) ya da
Pre İmplantasyon Genetik Tanı uygulanması

Teşekkürler