

DOI: 10.38136/jgon.1233805

Sperm Kryoprezervasyonunda Epigenetik Değişiklikler
Epigenetic Changes in Sperm CryopreservationMEHMET CANER ÖZER ¹

Orcid ID:0000-0002-4398-9598

¹ Ankara Şehir Hastanesi Kadın Doğum Hastanesi Üremeye yardımcı Tedavi Merkezi, Ankara

ÖZ

Spermatozoa kriyoprezervasyon teknolojisi, erkek fertilitesi için en çok kullanılan koruma protokolüdür. Erkek doğurganlığının yönetimi, kanser tedavisi, vazektomi veya cerrahi infertilite tedavilerinden önce donör spermlerini depolamak ve korumak için kullanılmaktadır. Epigenetik yeniden programlamanın embriyonik gelişimde hayati bir rol oynadığı bildirilmiştir ve birkaç çalışma, kusurlu epigenetik yeniden programlamanın anormal fetal büyüme, kanser ve diyabet gibi hastalıklar ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Yapısal ve fizyolojik değişikliklerin yanı sıra, spermatozodaki gen ve proteinlerin ekspresyonunun, mRNA stabilitesinin ve epigenetik içeriğin donma-çözme işleminden etkilenebileceği bildirilmektedir. Dondurulmuş-çözülmüş spermatozodaki bu değişiklikler doğurganlık potansiyelini ve embriyo gelişimini etkileyebilmektedir. Kryoprezervasyonda toksisite, epigenetik stabilite, mikrobiyal kontaminasyon gibi birden fazla güvenlik sorunu vardır. Bu sorunlardan epigenetik stabilite ve dondurulmuş spermatozoa ile doğan çocukların sağlığı üzerindeki kriyoprezervasyonun etkileri hakkında çok az bilgi vardır. Bu derlemede, kriyoprezervasyon sırasında spermlerdeki değişiklikler ve epigenetik modifikasyonları hakkındaki makaleler özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Sperm Kryoprezervasyonu, Epigenetik, Yardımcı Üreme teknolojileri

ABSTRACT

Spermatozoa cryopreservation technology is the most widely used preservation protocol for male fertility. Cryopreservation of human sperm is used to store and preserve donor sperm prior to male fertility management, cancer treatment, vasectomy or surgical infertility treatments. Epigenetic reprogramming has been reported to play a vital role in embryonic development, and several studies have shown that defective epigenetic reprogramming is associated with diseases such as abnormal fetal growth, cancer, and diabetes. In addition to structural and physiological changes, it has been reported that the expression of genes and proteins in spermatozoa, mRNA stability and epigenetic content may be affected by freeze-thaw process. These changes in frozen-thawed spermatozoa can affect fertility potential and embryo development. There are multiple safety issues in cryopreservation, such as toxicity, epigenetic stability, and microbial contamination. Of these issues, little is known about the effects of cryopreservation on epigenetic stability and the health of children born with frozen spermatozoa. In this review, articles on changes in sperm and their epigenetic modifications during cryopreservation are summarized.

Keywords: Sperm Cryopreservation, Epigenetics, Assisted Reproductive Technologies

GİRİŞ

Spermatozoa kriyoprezervasyon teknolojisi, erkek fertilitesi için en çok kullanılan koruma protokolüdür. Kryoprezervasyon prosedürlerinde büyük gelişmeler olmasına rağmen bazı olumsuzluklar çözüm beklemektedir. Bunlardan en önemlisi, taze spermatozoa kullanılan siklusa kıyasla donmuş-çözülmüş spermatozoa kullanılan sikluslarda daha düşük doğurganlık hızıdır. Bu nedenle, kriyoprezervasyon altında spermin hayatta kalmasının iyileştirilmesi ve donmuş spermatozoanın güvenliği endişe yaratmaya devam etmektedir (1).

Spermleri ilk olarak 1776'da Lazaro Spallanzani dondurarak saklamıştır. Hamilelik ve canlı doğum sağlayan insan spermlerinin ilk başarılı dondurularak saklanması 1953'te Sherman ve Bunge tarafından bildirilmiştir. Daha sonraki bu alandaki geliş-

melerin ardından, donmuş-çözülmüş spermatozodan, 1984'te in vitro fertilizasyondan (IVF), 1990'da intrauterin inseminasyondan (IUI), 1992'de subzonal inseminasyondan ve 1994'te intrasitoplazmik sperm enjeksiyonundan (ICSI) sonra gebelik elde edilmiştir (2).

İnsan sperminin kriyoprezervasyonu, erkek doğurganlığının yönetimi, kanser tedavisi, vazektomi veya cerrahi infertilite tedavilerinden önce donör spermlerini depolamak ve korumak için kullanılmaktadır. Kryoprezervasyon sperm varlığını artırsa da, kriyoprezerve edilmiş spermin fertilizasyon potansiyeli, spermdeki yapısal ve fizyolojik değişiklikler nedeniyle tehlikeye girer. Dondurma işlemi sırasında, sıcaklıktaki ani değişiklikler, ozmotik stres ve buz oluşumu gibi çeşitli faktörlerin, çözüldükten

Sorumlu Yazar/ Corresponding Author: Buse Ozer Bekmez

Adres: Ankara Şehir Hastanesi Kadın Doğum Hastanesi Üremeye yardımcı Tedavi Merkezi

E-mail: mc.ozet77@gmail.com

Başvuru tarihi :10/10/2022

Kabul tarihi : 23/10/2022

sonra düşük sperm kalitesine yol açabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, donma-çözme işlemi sırasında artan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, spermatozoadaki yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin bir başka nedenidir (3). ROS üretimi, epigenetik hatalara yol açabilecek DNA metilasyonunu olumsuz yönde değiştirir (4).

Önceki çalışmalar, gametler ve preimplantasyon embriolarının hem doğum öncesi hem de doğum sonrası gelecekteki büyüme ve gelişme potansiyelini etkileyebilecek çevresel koşullara duyarlı olduğunu göstermiştir. Böylece in vitro manipülasyonların, preimplantatif embrioların gelişim potansiyellerini ve epigenetiklerini etkileyebileceği sonucu çıkarılmaktadır (5). Epigenetik yeniden programlamanın embriyonik gelişimde hayati bir rol oynadığı bildirilmiştir ve birkaç çalışma, kusurlu epigenetik yeniden programlamanın anormal fetal büyüme, kanser ve diyabet gibi hastalıklar ile ilişkili olduğunu göstermiştir (6).

Yapısal ve fizyolojik değişikliklerin yanı sıra, spermatozoadaki gen ve proteinlerin ekspresyonunun, mRNA stabilitesinin ve epigenetik içeriğin donma-çözme işleminden etkilenebileceği bildirilmektedir. Dondurulmuş-çözülüş spermatozoadaki bu değişiklikler doğurganlık potansiyelini ve embriyo gelişimini etkileyebilir (3).

Kriyoprezervasyonda toksisite, epigenetik stabilite, mikrobiyal kontaminasyon gibi birden fazla güvenlik sorunu vardır (1). Bu sorunlardan epigenetik stabilite ve dondurulmuş spermatozoa ile doğan çocukların sağlığı üzerindeki kriyoprezervasyonun etkileri hakkında çok az bilgi vardır. Bu derlemede, kriyoprezervasyon sırasında spermlerdeki değişiklikler ve epigenetik modifikasyonları hakkındaki makaleler özetlenmiştir.

SPERMATOZOANIN YAPISAL ÖZELLİKLERİ

Memeli spermatozoası, temel olarak belirgin şekilde yoğunlaştırılmış bir çekirdek, çok az sitoplazma ve genel bir hidrodinamik şekle sahip son derece uzun bir kamçıdan oluşan en özel hücrelerden biridir (7). Sperm hücresinin temel işlevi, babanın genetik mirasını ve epigenetik bilgiyi embriyoya iletmektir. Daha da önemlisi, sperm kromatinindeki genlerin yoğunluğu protaminler tarafından yüksek oranda yoğunlaştırılırken, gelişimin ilk aşamalarında potansiyel olarak ihtiyaç duyulan genler, bir epigenetik işaretleme biçimini temsil eden histonlarla ilişkilidir (7). Somatik hücrelerle karşılaştırıldığında, spermatozoa çok farklı bir kromatin yapısı ve organizasyonu barındırır. Spermdeki DNA, histonların büyük çoğunluğunun yerini alan ve altı kat daha yoğun bir DNA paketleme yapısına izin veren, sperma-

tozal DNA'yı hücre dışı stres faktörlerine karşı koruyan protaminlere bağlıdır. Spermatogenez sırasında protaminasyon, histonlar tarafından taşınan çoğu epigenetik bilginin çıkarılmasıyla sonuçlanır. Yine de kalan histon proteinleri önemlidir ve erken embriyonik gelişim için genleri dengeleyebilir (8).

Erkek gamet fonksiyonunu kontrol etmenin kilit bir unsuru, altta yatan genlerin aktivasyonuna veya baskılanmasına izin veren metilasyon, asetilasyon ve fosforilasyon gibi histonların transilasyon sonrası modifikasyonunu (PTM) içerir. Histon PTM'leri, transkripsiyon, DNA onarımı, DNA replikasyonu ve kromozom yoğunlaşması gibi hücresel süreçleri yönetmede esastır (9).

Montjean ve ark. yaptıkları çalışmada global sperm DNA metilasyon seviyesinin sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve sperm DNA bütünlüğü ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Düşük konsantrasyon ve düşük sperm motilitesinde global DNA metilasyon düzeyi düşük bulunmuştur (4,10).

SPERMATOZOA KRYOPREZERVASYONU

Semen kriyoprezervasyonu, Lazaro Spallanzani'den sonra Polge'nin gliserolün kriyoprotektan özelliklerini keşfetmesiyle ivme kazanmıştır. Bu çalışmalar, doğurganlığın korunması alanında bir dönüm noktası olmuştur. Bununla birlikte, sperm kriyobiyolojisindeki sayısız başarıya rağmen, kriyoprezervasyondan sonra canlı spermatozoayı optimal olarak geri kazanabilen yöntemler için araştırmalar devam etmektedir (11).

Semen kriyoprezervasyonunda, kriyoprotektan ve dondurma prosedüründe farklılık gösterebilen çeşitli protokolleri kullanılır, ancak çoğunlukla sperm koruma süreci nispeten birkaç adım içerir. İlk adım, suyun ozmoz yoluyla hareketiyle hücreyi dehidrate eden yüksek çözünen konsantrasyonları içeren bir kriyoprotektan eklenmesini içerir. Bu hücrelerin içindeki suyun uzaklaştırılması, donma ve çözme sırasında hücre tahribatına neden olan hücre içi buz kristali oluşumunu en aza indirmek için önemlidir. Kriyoprotektanlarla birlikte, buz oluşumuna veya yeniden kristalleşmeye bağlı olarak olası hücre içi su miktarını en aza indirmek için uygun soğutma ve ısıtma oranlarının uygulanması esastır (12).

Donma hasarı ile ilgili iki mekanizma vardır, birincisi hücreyi delip yok eden buz kristallerinin oluşumu, diğeri ise sıvı fazın bileşimindeki değişikliklere olan etkilerdir. Genel olarak, kriyoprotektanlar (CPA) toplam çözünen madde konsantrasyonunu artırır ve oluşan buz miktarını azaltır (2).

EPİGENETİK

Epigenetik, genler ve fenotipi meydana getiren ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen biyoloji dalıdır. Bugün bildiğimiz şekliyle epigenetik, mitotik ve/veya mayotik olarak kalıtsal olan ve DNA dizisinde bir değişiklik gerektirmeyen gen fonksiyonundaki değişikliklerin incelenmesi olarak tanımlanmıştır (13).

Epigenetik süreçler, DNA metilasyonunu, histon modifikasyonlarını ve kromatin yeniden şekillenmesini içerir. Bu modifikasyonların kısa veya uzun vadeli sonuçları olabilir ve mitotik olarak hücreden hücreye ve germ hattı yoluyla bir sonraki nesle aktarılabilir. Histonların etrafını saran DNA, kromatin modelinin bir parçası olan nükleozom oluşumu ile sonuçlanır. Özel DNA düzeni, bir genin transkripsiyonel olarak aktif mi yoksa sessiz mi olacağını belirler (9).

Embriyogenezin gelişim programı hem genetik hem de epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Epigenetik işaretler, DNA'nın ve bununla ilişkili kromatin proteinlerinin enzim aracılı kimyasal modifikasyonlarıdır. DNA'nın birincil dizisini değiştirmemelerine rağmen, genom fonksiyonunun düzenlenmesinde ve gelişmesinde önemli roller oynarlar. Genom çapında epigenetik yeniden programlama, döllenmeden hemen sonra zigotta başlayan ve preimplantasyon gelişiminin blastosist aşamasına kadar uzanan erken embriyoda meydana gelir (6).

Epigenetik, hangi genlerin, ne zaman ve hangi dokularda aktif olduğunu düzenlemede hayati bir rol oynayan DNA'nın kompaktlığını ve yeniden programlanmasını kontrol eder. Gametogenez ve erken embriyo gelişimi sırasında, iki terminal olarak farklılaşmış hücre (spermatozoon ve oosit) bir totipotent zigot oluşturmak üzere birleştikçe, hem erkek hem de dişi kalıtsal kromatine kapsamlı epigenetik modifikasyonlar eklenir. Gelişimin bu erken evresinde kromatine yapılan bu tür kapsamlı modifikasyonlar, memeli genomunu, DNA'ya, ilişkili proteinlere, kodlayan ve kodlamayan RNA'lara kovalent modifikasyonlar şeklinde gelebilen, çevresel olarak indüklenen epigenetik değişikliklere duyarlı hale getirir. Ağırlıklı olarak hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular, bu tür değişikliklerin, gelişimsel süreçlerde, yetişkinlikte belirli hastalıklara yatkınlıkla birlikte doğuştan anormalliklerle sonuçlanan değişikliklerde yol açabileceğini göstermektedir (9).

Memelilerde DNA metilasyonu, çoğunlukla CpG dinükleotidlerinde sitozin kalıntılarının 5. karbonunda meydana gelir (13). CpG olmayan metilasyon, embriyonik kök hücrelerde ve bölünmeyen hücrelerde saptanır ve hücre tipine özgü fonksiyonları düzenler. CpG bölgeleri, CpG adaları olarak bilinen belirli geno-

mik lokasyonlarda yüksek sıklıkta meydana gelir. Memelilerde, CpG adacıkları sıklıkla promotör bölgelerde bulunur ve genellikle metillenmezken, diğer CpG bölgeleri metillenir (3).

DNA metilasyonu, transkripsiyonel susturma ile ilişkilidir. Bununla birlikte, imprinting, X-kromozomu inaktivasyonu, tekrarlayan ve sentromerik dizilerin susturulması dahil olmak üzere diğer önemli moleküler işlemlerde kritik roller oynar. Kovalent histon transkripsiyon sonrası modifikasyonları gibi diğer epigenetik mekanizmalar, histon proteinleri üzerindeki fonksiyonel grupların (asetil, metil, fosforil, sumoil) eklenmesi veya çıkarılmasıyla kromatin yapısını değiştirir. Histon modifikasyonları, DNA-kromatin bağlanmasını etkiler, böylece DNA stabilitesini ve transkripsiyon faktörlerine uygunluğunu değiştirir. Gen ekspresyon paternleri, kromatin yeniden şekillenmesi ve histon varyantlarının tanıtılması dahil olmak üzere kovalent olmayan histon modifikasyonlarından da etkilenebilir. Kodlamayan RNA'lar, genomik imprinting ve gen susturma, hücre kaderi kararları için gerekli olan diğer önemli epigenetik mekanizma örnekleridir. Bu nedenle epigenetik mekanizmalar, dondurarak saklamanın hücre kaderi kararları üzerindeki bazı etkilerini açıklamak için potansiyel bir mekanizma sağlar (13). DNA metilasyonu, beş DNA metiltransferazdan (DNMT'ler) oluşan bir protein ailesi tarafından kurulur ve korunur. Bunlar arasında, üç de novo DNMT (DNMT3A, 3B ve 3C) ve katalitik olarak aktif olmayan bir kofaktör (DNMT3L), genellikle bir CpG bağlamında sitozin metilasyonunun kurulmasından sorumludur (14).

Genomik damgalama, memeli genlerinin bir alt kümesini etkileyen ve ebeveyn monoalelik ekspresyon paterni ile sonuçlanan epigenetik bir fenomendir. Ebeveyn alellerini farklılaştırmak için, germ hücrelerinde DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarını içeren epigenetik işaretler başlatılır ve embriyonik gelişim ve doğum sonrası yaşam süresi boyunca korunur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, sperm kriyoprezervasyonunun epigenetik bozukluklarla ilişkili olup olmadığı sorusuna cevap vermeye başlamıştır. Ancak kriyoprezervasyonun spermdeki epigenetik modülasyon üzerindeki etkileri ve olası epigenetik değişikliklerin donmuş spermatozoa ile doğan çocukların sağlığı üzerindeki etkileri hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Bazı çalışmalar kriyoprezervasyonun insan sperm genlerinin DNA metilasyon paternini etkileyemeyeceğini bildirmiş olsa da, diğer araştırmaların sonuçları bu çalışmalarla tutarlı değildir (3).

KRYOPRESERVASYONUN SPERMLERDEKİ EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİ

Kryoprezervasyonun sperm üzerine etkileri serbest oksijen radikallerin artışı, membran hasarı, DNA fragmentasyonu, can-

lılığın azalması, apoptosis, hücre iskelet hasarı, motilite azalması, fertilizasyon yeteneğinin azalması, mitokondri hasarı ve epigenetik değişiklikler olarak sıralanabilir. Sperm kriyoprezervasyonu, membran geçirgenliği, motilite, metabolizma, apoptoz, kapasitasyon ve fertilizasyon ile ilgili çeşitli hücresel süreçlerde yer alan proteinleri değiştiren fiziksel değişiklikleri indükler (2).

Kriyoprezervasyon, sperm transkriptomu ve proteomiklerinde moleküler bozukluklara yol açabilecek ani ozmotik ve sıcaklık değişikliklerini içerir. Mevcut kriyoprezervasyon protokollerini optimize etmek için kriyoprezervasyon sırasında bu moleküler bozuklukların tam olarak anlaşılması esastır. Epigenetik ile ilgili olarak, daha önceki çalışmalar, dondurarak saklamanın motilite, kapasitasyon, oosit bağlama yeteneği ve akrozom reaksiyonu gibi temel sperm fonksiyonlarında yer alan spesifik genlerin profillerini değiştirdiğini göstermiştir (1).

Spermatozoanın genleri ve protein ekspresyonu, mRNA stabilitesi ve epigenetik içeriğinin donma-çözme işlemi sırasında modüle edildiği düşünülmektedir. Kriyoprezervasyon, doğurganlık potansiyeli ile ilgili anahtar genlerin (SNORD116/PWSAS ve UBE3A) ekspresyonunu etkileyebilir (11).

Son zamanlarda, sperm hücrelerinde dondurma işlemi sırasında meydana gelebilecek bazı epigenetik modifikasyonları açıklamaya başlayan başka çalışmalar da vardır. Flores ve arkadaşları, kriyoprezervasyondan sonra domuz spermatozoası baş kısmında nükleoproteinik yapı değişikliklerini göstermişlerdir. Bunlar histon H1-DNA bağlayıcı proteinler ve protein-DNA disülfid bağlarındaki değişiklikleri içermektedir (17). Zeng ve arkadaşlarının bir çalışmada, DNMT3A, DNMT3B, JHDM2A, KAT8, PRM1, PRM2 ve IGF2 gibi epigenetik ile ilgili genlerin ekspresyonunun donma öncesi ve sonrasında değişebileceğini ve farklı kriyoprotektif ajanların eklenmesi, domuz spermatozoasındaki epigenetik ile ilgili genlerde donma veya kriyoprezervasyon kaynaklı ekspresyon değişikliklerine karşı daha iyi koruma sağlayabileceği belirtmiştir (16). Başka bir çalışma, kriyoprezervasyonun, anne tarafından transkribe olan LIT1, SNRPN ve MEST gibi insan sperm genlerinin DNA metilasyon modelini ve ayrıca baba tarafından transkribe edilen MEG3 ve H19 genlerini etkilemediğini bildirdi (11).

Spermatozoa, döllenme sırasında oosite paternal mRNA verir ve bu nedenle erken embriyo gelişiminde önemli bir rol oynar. Ayrıca, dondurma işlemi sırasında, spermatozoadaki transkriptler ve mRNA-protein etkileşimleri kaybolabilir ve bu da embriyo gelişimini doğrudan etkileyebilir. Sperm mRNA'sı ile erken gelişim arasındaki korelasyonlar insanlarda ve bazı hayvanlarda bildirilmiştir. Kriyoprezervasyonun insan sperm fertilitesi ile il-

gili birkaç anahtar transkript (PRM1, PRM2, PEG1/MEST ve ADD1) ifadesini azalttığı gösterilmiştir (11).

Dondurma ve çözme, sperm mRNA'sının transkripsiyonunu kısmen değiştirebilir ve mRNA'lar ile proteinler arasındaki etkileşimi engelleyerek embriyoların erken gelişimini etkileyebilir. Hayvan deneylerinde, sperm histon modifikasyonu ve metilasyonu gibi birçok epigenetik değişiklik, çözmeden sonra gözlenmiştir (15). Dondurulmuş hücrelerde histon H3 ve H4 asetilasyonunda önemli azalma tespit edilmiştir. Ayrıca, kriyoprezervasyon, aktif olarak kopyalanan genlerle ilgili bir değişiklik olan H3K4me3 seviyesini azaltır; ve transkripsiyonel baskı ile ilgili bir modifikasyon olan H3K27me3 seviyesini arttırır (3).

Dondurarak saklama sırasında sperm nükleer DNA'sının zarar görmesiyle ilgili endişelere rağmen, donmuş spermle döllenmiş yavrularda genetik veya fenotipik anomalilerde doğrulanmış bir artış tanımlanmamıştır. Spermdeki oksidatif stres, erken embriyonik gelişim sırasında epigenetik yeniden programlamayı etkileyebilir (3).

Mikro-RNA, mRNA translasyonunu etkiler ve miR-22 ve miR-450b-5p, taze spermatozoa ile karşılaştırıldığında kriyoprezervasyondan sonra spermatozoada önemli ölçüde down-regüle edilir. Bu epigenetik değişiklikler, donma-çözme işleminden etkilenen spermatozoa hareketliliği ve doğurganlığındaki düşüşün ana nedeni olabilir (1).

DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından oluşturulan metilasyon işaretlerini bozabilecek kriyoprezervasyon kaynaklı stres ve kriyoprotektan toksisitesi nedeniyle DNA değişiklikleri ve epigenetik mutasyonlar üretilebilir. ROS, DNMT ekspresyonunun up regülasyonuna veya bölgeye özgü hipermetilasyon ile sonuçlanan yeni bir DNMT içeren kompleks oluşumuna neden olabilir (4).

SONUÇLAR

Son yıllarda yapılan çalışmalar IVF/ICSI tedavilerini takiben doğan bebeklerde, anormal plasentasyon, düşük doğum ağırlığı veya yüksek doğum ağırlığı gibi epigenetik düzensizlik ile ilişkili olabilecek, olumsuz perinatal sonuç riskinin arttığını bildirmektedir. Bu çalışmalara rağmen, epigenetik bozuklukların sıklığını arttırmada infertilite nedeninin mi yoksa ICSI, kriyoprezervasyon gibi yöntemlerin mi rol oynadığını göstermek zordur (9).

Kriyoprezervasyon sırasında aşırı ROS üretiminin sperm kalitesi üzerinde zararlı etkileri vardır. Anormal sperm önemli bir serbest radikal kaynağı olduğundan, kriyoprezervasyon işleminin neden olduğu ROS seviyesi anormal spermde morfolojik olarak

normal spermden daha yüksek olabilir. Oksidatif stresin, DNA, histonlar ve histon değiştiricileri etkileyerek hücrelerin epigenetik durumunu etkileyebileceği düşünölmektedir (3).

DNA metilasyonundaki kriyoprezervasyonla ilgili değişikliklerin, kriyoprezervasyon ve/veya laboratuvar teknikleri ile ilgili protokollerin bir özelliği mi yoksa spermatogenez sırasında spermde neden olan epigenetik kusurlar mı olduğu henüz belirlenmemiştir. Bu tekniğin güvenliğini sağlamak için sperm kriyoprezervasyon protokollerini optimize etmenin, girdi DNA metilasyon hatalarının oluşmasını önlemek için ihtiyati bir yaklaşım olarak kabul edilebileceği görölmektedir. Ayrıca, sperm kriyoprezervasyonunun kullanımı küresel olarak arttığından, kriyoprezervasyon sonuçlarının çok merkezli, uzun vadeli bir takip çalışmasının yürütölmesi ve imprinting hatalarıyla ilgili daha fazla sayıda hastalığın değerlendirilmesi için daha fazla çalışma yapılmalıdır (4).

Kriyoprezervasyonun sperm DNA metilasyonu üzerindeki etkisi hakkında kesin bir sonuca varmak için, kriyoprezervasyon işleminin aynı koşulları altında daha büyük numune boyutlarına sahip multiklinik çalışmalara ve DNA metilasyon analizine ihtiyaç vardır.

Özetle, yardımcı üreme tekniklerinde sperm motilite ve fertilizasyonu tehlikeye atan durumların sperm kriyoprezervasyonu ile ilişkisi giderek artan çalışmalarla gösterilmiştir. Kriyoprezervasyonun epigenetik modifikasyonlar üzerinde meydana getirdiği değişiklikler açıktır. Bu yüzden sperm kriyoprezervasyon işleminin standartları belirlenmeli ve olası sonuçları hakkında hastalara danışmanlık verilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Wang W, Todorov P , Pei C , Wang M , Isachenko E, Rahimi G, et al. Epigenetic Alterations in Cryopreserved Human Spermatozoa: Suspected Potential Functional Defects. *Cells* . 2022 Jul 4;11(13):2110
2. Estudillo E, Jimenez A, Bustamante-Nieves PE, Palacios-Reyes C, Velasco I, Lopez-Ornelas A. Cryopreservation of Gametes and Embryos and Their Molecular Changes. *Int J Mol Sci* . 2021 Oct 8;22(19):10864
3. Khosravizadeh Z, Khodamoradi K, Rashidi Z, Jahromi M, Shiri E, Salehi E, et al. Sperm cryopreservation and DNA methylation: possible implications for ART success and the health of offspring. *J Assist Reprod Genet* . 2022 Aug;39(8):1815-1824
4. Khosravizadeh Z, Hassanzadeh G, Bazzaz JT, Alizadeh F, Totonchi M, Salehi E, et al. The effect of cryopreservation on DNA methylation patterns of the chromosome 15q11–q13 region in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank* . 2020 Sep;21(3):433-445
5. Fleming T P, Kwong W Y, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, et al. The embryo and its future. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1046–1054
6. Chao S, Li J, Jin X, Tang H, Wang G, Gao G. Epigenetic reprogramming of embryos derived from sperm frozen at -20°C. *Sci China Life Sci* . 2012 Apr;55(4):349-57.
7. Castillo J, Amaral A, Oliva R. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. *Andrology* 2014 May;2(3):326-38.
8. Donkin I, Barres R. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Mol Metab* . 2018 Aug;14:1-11.
9. Sciorio R, Esteves SC. Contemporary Use of ICSI and Epigenetic Risks to Future Generations. *J Clin Med* . 2022 Apr 11;11(8):2135.
10. Montjean D, Zini A, Ravel C, Belloc S, Dalleac A, Copin H, et al. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity, *Andrology* . 2015 Mar;3(2):235-40
11. Hezavehei M , Sharafi M, Kouchehfahani HM, Henkel R, Agarwal A , Esmaili V. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online* . 2018 Sep;37(3):327-339.
12. Bogle OA, Kumar K , Attardo-Parrinello C, Lewis SEM, Estanyol JM, Ballesca JL, et al. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology* . 2017 Jan;5(1):10-22.
13. Chatterjee A, Saha D, Niemann H, Gryshkov O, Glasmacher B, Hofmann N. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology*, 2017 Feb;74:1-7.
14. Hanna CV, Demond H, Kelsey G. Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum Reprod Update* . 2018 Sep 1;24(5):556-576.
15. Huang C, Tang YL, Hu JL, Zhou WJ, Huang ZH, Luo XF, et al. Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa. *Asian J Androl* (2022) 24, 1–7
16. Zeng C, Peng W, Ding Lİ, He L, Zhang Y, Fang D, et al. A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation, *Cryobiology* Volume 69, Issue 1, 2014, Pages 119-127

17. Floresa E , Ramio-Llucha L , Buccib D , Fernandez-Novellc JM , Penaa A , Rodriguez-Gil JE. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm, *Theriogenology* 76 (2011) 1450 –1464