



FARKLI HASTA GRUPLARINDA SPERM MORFOLOJİSİ VE DNA HASARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ
THE DETERMINATION OF SPERM MORPHOLOGY AND DNA DAMAGE IN THE DIFFERENT PATIENT GROUPS

Burak Cihad CANER¹, Fazile CANTÜRK TAN², Esra BALCIOĞLU¹, Münevver BARAN³,
Gözde Özge ÖNDER¹, Arzu Hanım YAY^{1*}

¹ Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

² Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Kayseri

³ Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı, Kayseri

ÖZ

Bu çalışmada, izole oligozoospermi, izole astenozoospermi, izole teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi hastalarından ve sağlıklı bireylerden alınan semen örneklerinde sperm kalite düzeyleri arasındaki farklılıkların ve DNA hasarının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, izole oligozoospermi, izole astenozoospermi, izole teratozoospermi, oligoastenoteratozoospermi tanısı alan hastalar ile sağlıklı erkek bireylerden alınan sperm örnekleri kullanılmıştır. Sperm örneklerinin sayı ve motilitesi Makler kamera ile belirlendi ve Spermac boyama yöntemi ile boyanarak morfolojileri değerlendirildi. Gruplar arasında sperm hücresi DNA hasarını belirlemek amacıyla alkali comet assay yöntemi kullanıldı. Çalışmamızın morfolojik bulgularına göre; normozoospermi grubuna ait sperm morfolojisi normal sınırlar içinde iken, izole astenozoospermi ve izole oligozoospermi gruplarında normal sperm morfolojisi %4 idi ve kayda değer sperm morfoloji anomalilerine rastlanmadı. İzole teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi gruplarında ise, normal sperm morfoloji yüzdeleri %4' ün altında olup, anomali yüzdesi diğer gruplara göre daha fazlaydı. Comet ile incelediğimiz sperm DNA hasarı bulguları morfolojik değerlendirmeler ile uyumluydu. Sonuç olarak, rutin semen analizi ve morfolojik değerlendirmelerin yanı sıra DNA hasarını incelemekte comet assay'in de yol gösterici nitelikte kullanılabilirliği kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: DNA hasarı, Spermatozoon, Tek hücre jel elektroforez.

ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate the DNA damages and the variations among sperm quality levels in semen samples from healthy individuals and oligozoospermic, insulated asthenozoospermic, insulated teratozoospermic and oligoastenoteratozoospermic patients with the factors effecting spermatozoon quality. The sperm samples from healthy individuals and patients diagnosed as insulated oligozoospermia, insulated asthenozoospermia, insulated teratozoospermia, and oligoastenoteratozoospermia in separated groups were used. The number of sperm samples was detected by using Makler camera and their morphologies were evaluated by coloring with Spermac Coloration Assay. To determine the DNA damages among groups, Alkaline Comet Assay method was carried out. According to morphologic results of our study, while the sperm morphology belonging to normozoospermia group was within the normal ranges, the normal sperm morphology in insulated asthenozoospermia and insulated oligozoospermia groups was %4 and no significant sperm morphology anomalies were found. In insulated teratozoospermia and oligoastenoteratozoospermia groups, normal sperm morphology percentages were below %4 and the anomaly percentages were higher than those in the other groups. The results we obtained by using Comet Assay were consistent with morphologic evaluations. As a result, we believe that the Comet Assay can also be guide for determining DNA damages in addition to routine semen analysis and morphologic evaluations.

Keyword: comet assay, DNA damage, spermatozoon.

Corresponding Author: Doç. Dr. Arzu Hanım YAY, ORCID-ID: 0000-0002-0541-8372, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Betül Ziya EREN Genom ve Kök Merkezi, Kayseri
E-mail: arzu.yay38@gmail.com
Telefon: 0544 628 93 32
Burak Cihad CANER ORCID-ID: 0000-0002-0017-8162
Doç. Dr. Fazile CANTÜRK TAN ORCID-ID: 0000-0002-0747-2209
Dr. Öğr. Üyesi. Esra BALCIOĞLU ORCID-ID:0000-0003-1474-0432
Dr. Öğr. Üyesi. Münevver BARAN ORCID-ID: 0000-0003-0369-1022
Dr. Öğr. Üyesi Gözde Özge ÖNDER ORCID-ID: 0000-0002-0515-9286

Makale Geliş Tarihi : 01.11.2019

Makale Kabul Tarihi: 05.06.2020

GİRİŞ

Semen analizi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde rutin olarak kullanılan bir yöntemdir. Semen analizinde ejakulata fiziksel özellikleri ile sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, sperm motilitesi ve morfolojisi, vitalite oranı gibi spermatozoaya ait faktörler incelenmektedir (1). Ancak infertil erkeklerin yaklaşık % 15'inde normal semen analiz sonuçlarına rağmen infertilitenin kesin tanısı semen analizi ile konulamamaktadır (2). Dolayısıyla fertil ve infertil erkeği birbirinden ayıracak, gebelik sonuçlarını ön göreceği yeni belirteçlere ihtiyaç vardır. Fertil ve infertil erkeklerde sperm DNA hasar düzeylerindeki farklılıkların fertilité potansiyelinin bir göstergesi olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir (3). Böylece dikkatli sperm DNA bütünlüğü üzerine yoğunlaşmıştır. Düşük sayı, motilite ve anormal morfoloji gibi bozuk semen parametreleri sıklıkla yüksek sperm DNA hasarı ile birliktelik göstermektedir. Ancak normal semen parametrelerine sahip hastaların % 8'inde sperm DNA hasarı olduğu da bilinmektedir (4). Erkeklerde DNA kalitesi üreme yeteneği ile eşdeğerdir. DNA hasarlı sperm, fertilizasyonu gerçekleştirebilir; ancak anöploid oranı yüksek embriyo oluşumu, erken dönem gebelik kayıpları, epigenetik değişimlere bağlı olarak metabolik hastalık riski, çocukluk çağı kanserleri gibi problemlere neden olmakta ve halen araştırmalara konu olmaktadır (5). Sayı, hareketlilik veya morfolojik olarak bozukluk kromozomal yapıya etkileri sonucu hem normal cinsel ilişkide hem de tüp bebek intrastoplazmik ICSI ve aşılama gibi yardımcı üreme tekniklerinde dölleme yeteneğini azaltır ve düşük ihtimalini artırır. Bu sebeple de izole ya da birkaç bozukluğun bir arada olduğu teşhisi konmuş hastaların sperm morfolojisi ve DNA hasarının incelenmesi kaliteli bir embriyo oluşumu için son derece önemlidir (6). Bu çalışmanın amacı, erkek infertilitesinde çok önemli yeri olan izole oligozoospermi, izole astenozoospermi, izole teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi olguları ile fertil kabul edilen kontrol grubundan elde edilen semen örneklerinde genel sperm morfolojisi değerlendirilmesinin yanı sıra comet metodu kullanılarak DNA hasarının incelenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın 20/06/2014 tarih ve 2014/369 no'lu kararı ile Etik Kurul onayı alındı. İlaveten tüm hastalara çalışma öncesi bilgi verildikten sonra onam formu doldurulup imzalandı. Çalışmamız, HÜMA Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran ve normospermi (n=20), izole oligozoospermi (n=20), izole astenozoospermi (n=20), izole teratozoospermi (n=20), oligoastenoteratozoospermi (n=20) tanısı alan hastalardan (18-35 yaş aralığında) alınan sperm örnekleri üzerinde yapılmıştır. Hastalardan üç günlük cinsel perhiz sonucunda alınan semen örneklerinin 37°C'de 1 saat inkübe edilerek likefiye olması sağlandı. Daha sonra kruger kriterlerine göre; sayı, motilite, yoğunluk, pH ve morfoloji yönünden değerlendirilmek üzere ayrıldı (7). Sperm morfolojilerini değerlendirmek için bir damla semen örneği (10 µl) lam üzerine damlatılıp yayılarak havada kurutuldu. Sperm boyama yöntemi kullanılarak boyanan preparatlar kurutma işleminin ardından Olympus CH40 mar-

ka ışık mikroskobunda 100'lük objektifle incelendi ve görüntüler Olympus Camedia kamerayla fotoğraflanarak değerlendirmeye alındı (8).

Sayım işlemi makle kamera ile yapıldı ve sperm hareketlerine göre A, B, C ve D olarak ayrıldı. Makle kamerasındaki kareleri ileri-düz hareketle 5 saniye içinde geçenler A hareketli, yavaş ya da doğrusal olmayan hareketle geçenler B hareketli, yerinde hareket edip duranlar C hareketli, kıvılcıktan duranlar ise D hareketli olarak değerlendirildi. Semen pH'sını ölçmek için pH-indicator paper kullanıldı. pH paper semene daldırılıp çıkarıldı ve 5 saniye içindeki renk değişimi tablodan bakılarak pH tespiti yapıldı. Volüm 5 cc'lik pipetlerle ölçüldü. Volümü 5 cc'den fazla olan semen örnekleri ise 10 cc'lik pipetlerle ölçüldü.

Spermde DNA hasarı yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforez yöntemiyle araştırıldı. Dilüe edilen semen örnekleri 4 °C'de 10 dakika 300 g de santrifüj edildikten sonra süpernetant atıldı ve kalan sperm örnekleri PBS ile yıkandı (9). Lamlar PBS'de hazırlanmış %1'lik normal erime noktalı agarozla kaplanarak oda sıcaklığında kurutuldu. 100 ml 37°C de %0,7'lik düşük erime noktalı agaroz ile 10 ml hücre süspansiyonu karıştırıldı ve lam üzerine yayıldı. Lamlar 4°C'de buz aküsü üzerinde 5 dakika katılaşmaya bırakıldı. Lameller lamlardan kaldırıldı, taze hazırlanmış soğuk lyzis çözeltisinde (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100, %10 DMSO ve 40 mM dithiothreitol, pH:10) 1 saat 4°C'de bekletildi. Daha sonra lizis çözeltisine 100 mg/ml proteinaze K eklenerek, lamlar 37°C de bir gece inkübe edildi. Yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH: 13) ile doldurularak lamlar yerleştirildi. DNA sarmalının çözülmesi için 8°C'de 12 V-250 mA'de 20 dakika elektroforez uygulandı. Daha sonra lamlar alkali iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için nötralizasyon çözeltisi (0.4 M Tris, pH 7.5) ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra preparatlar 50 ml ethidium bromide (1g/ml) ile boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler oda ısısında ve karanlık ortamda yapıldı (10). Preparatlardan elde edilen görüntüler floresan mikroskop (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) kullanılarak X400 büyütmede incelendi. Her bir semen örneğinden rastgele seçilmiş 100 adet hücre görüntüsü Comet Assay Software Project (CASP-1.2.2, Windows 2010) ile analiz edildi (11). Hücrede meydana gelen hasar sperm başından göç etmiş, comet'e neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi (12).

Verilerin analizi, IBM SPSS Statistic 22 (IBM Inc. ILL, USA) paket programında değerlendirildi. Grup içi ve gruplararası karşılaştırmalar tek yönlü Anova testi ile yapıldı. Çoklu karşılaştırma testi bağımsız değişkenli Tukey HSD yöntemi ile yapıldı. Veriler ortalama± standart sapma ile ifade edildi. p<.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Normozoospermi grubuna ait sperm morfoloji değerlendirmesi normal sınırlar içerisindeydi. Normozoospermik bireylere ait morfolojik değerlendirme diğer hasta gruplarında uygulandığı gibi rutin sperm boyası ile boyanıp 100 sperm sayımı içerisinde incelendiğinde normozoospermik bireylerin normal yüzdesi %4 ve üzeri olarak gözlemlenmiştir. İzole astenozoospermi ise

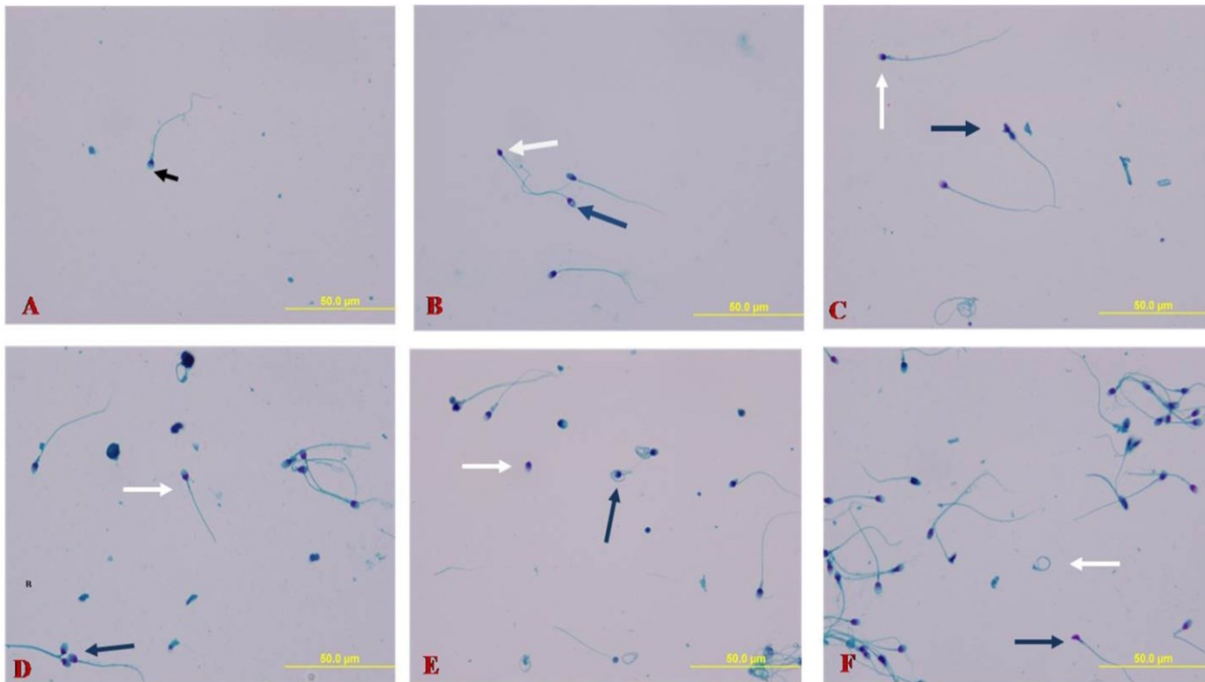
yine WHO'nun 2010 verilerine göre sayının ml'de 15 milyon ve üzerinde olduğu normal sperm morfolojisinin ise %4 ve üzerinde olduğu hasta grubudur. İzole oligozoospermi ve izole astenozoospermi grubuna ait hastalarda yine 100 sperm sayımı içerisinde normal sperm morfoloji ortalaması %4 veya %4'ün üzerinde iken oligoastenoteratozoospermi grubuna ait hastalarda ise sperm morfoloji ortalaması %4'ün altında bulunmaktaydı. İzole oligozoospermi hasta grubuna ait bireylerden alınan sperm örnekleri WHO'nun 2010 verilerine göre düzenlemiş olduğu kriterler çerçevesinde hareketliliğin %40 ve üzerinde olduğu, normal sperm morfolojisinin ise %4 ve üzeri olduğu hasta grubuydu. Oligoastenoteratozoospermi grubuna ait hastalarda karşılaşılan anomaliler ise yetersiz hareketliliğin ve sayısal değerinin düşük olmasının yanında izole teratozoospermide karşımıza çıkan bazı anomalilerle paralel ilişki göstererek oligoastenoteratozoospermi grubu bireylerinde de morfoloji yapılarındaki bozukluklar gözlenmiştir. Oligoastenoteratozoospermi grubu hastalar WHO'nun kriterlerine göre sayı, hareketlilik ve normal sperm morfoloji yüzdesinin standartın altında olduğu hasta grubuydu. Bu grupta tıpkı izole teratozoospermi grubu hastalarına ait morfolojik değerlendirmede ortaya çıkan yapısal bozukluklara sahip anomaliler gözlemlendi. Buna paralel olarak anormal morfolojili sperm daha fazla sayıda bulunduğu izole teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi boyanma yüzde oranı, izole oligozoospermi ve izole astenozoospermi hasta bireylerine ait sperm morfoloji değerlendirmesine oranla fazla bulundu. İzole teratozoospermi'ye ait semen örnekleri incelendiğinde 100 sperm sayımı içerisinde normal sperm hücre sayısı %4'ün altındaydı. Çeşitli anomalilerin en fazla bulunduğu gruplardan biri olan izole teratozoospermi grubunda sayı ve hareketliliğin normal değerlerde yani ml'de 15

milyon ve üzerindeydi, hareketliliğin %40 ve üzerinde olduğu fakat sperm morfolojilerinde fazlasıyla akrozomal, nuklear ve kuyruk bölgeleri düzensiz yapıları ile karakterize olmuştur. Burada sitoplazmik dorplet, pin-head, kinked, dag defekti, kısa kuyruk, tapered gibi sperm morfoloji anomalileri karşımıza çıkmıştır.

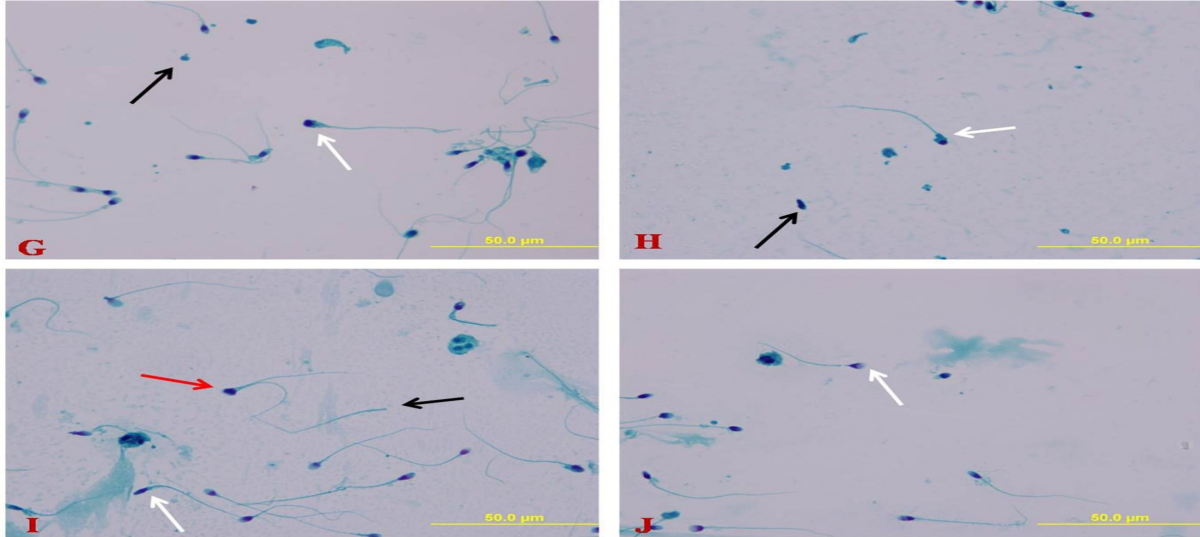
Spermak boyaları ile yapılan ışık mikroskopi değerlendirmesinde, sperm başı yapısındaki anomalilerin, kondensasyon defektlerinin, buna benzer birçok parametrenin ve DNA hasarlarının oranlarını yine izole teratozoospermi oligoastenoteratozoospermi hasta spermelerinin, izole oligozoospermi ve izole astenozoospermi hasta bireylerinin spermelerine göre daha fazla olduğunu belirledik.

Şekil I ve Şekil II'de karşımıza çıkan anomaliler ve normal sperm morfoloji yapısı fotoğrafları ile desteklenmiştir. Anomali yapısının en fazla görüldüğü gruplar olan izole teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi hasta bireylerine ait bazı anomaliler şekilde gösterilmiştir (Şekil I ve II).

Çalışmada izole oligozoospermi, izole astenozoospermi, izole teratozoospermi, oligoastenoteratozoospermi hasta gruplarından elde edilen veriler ile Normozoospermi grubundan elde edilen comet parametrelerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo I'de gösterilmiştir. Tüm gruplar Length Head değerleri bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol, izole oligozoospermi ve izole astenozoospermi grupları ile sadece teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi grupları arasında anlamlı fark olduğu saptandı ($p < 0.05$). Ancak izole teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$). İstatistiksel olarak Length Tail değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile izole oligozoospermi, izole teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi



Şekil I: Sperm morfolojisi resimleri A: Normozoospermi (siyah ok: Normal sperm şekli), B: İzole Astenozoospermi (beyaz ok: Akrozomalvakuol, mavi ok: Küçükbaşanomalisi), C: İzole Oligozoospermi (Beyaz ok: İrregularakrozomal şekil bozukluğu, Mavi ok: Kinked), D: Oligoastenoteratozoospermi (Beyaz ok: Kısa kuyruk, Mavi ok: Çift baş), E: Oligoastenoteratozoospermi (Beyaz ok: Serbest baş, Mavi ok: Dagdefekti), F: İzole Teratozoospermi (Beyaz ok: Pin-Head, Mavi ok: Abeysiyel implantasyon) X100.



Şekil II: Sperm morfoloji resimleri G: İzole Teratozoospermi (Beyaz ok: Roundhead, Mavi ok: Serbest baş), H: İzole Teratozoospermi (Beyaz ok: Stoplazmikdroplet, Bordo ok: Tailstump), I: Oligoastoteratozoospermi (Beyaz ok: Uzun baş, Mavi ok: Pinhead, Kırmızı ok: Akrozomalvakuol), J: Oligoastoteratozoospermi (Koyu ok: Mitokontriyal kayıp), X100.

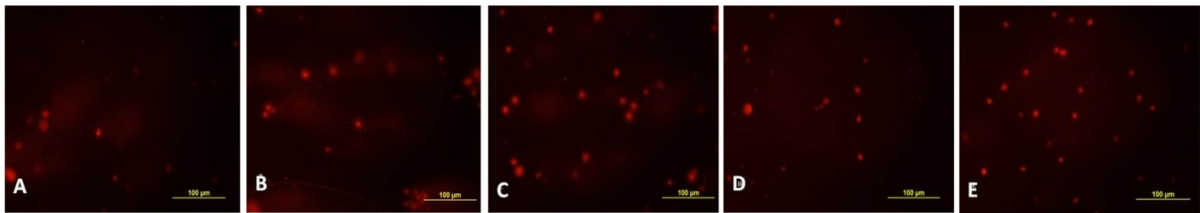
grupları arasında anlamlı artış vardı ($p<0.05$). Kontrol grubu sperm hücreleri Length Comet değeri bakımından değerlendirildiğinde sadece izole teratozoospermi grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi ($p<0.05$). Ancak diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlılık yoktu ($p>0.05$). Head DNA değerleri bakımından deney grupları karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile izole oligozoospermi ve izole astenozoospermi grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0.05$), izole teratozoospermi ve oligoastoteratozoospermi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0.05$). Gruplar arasında Tail DNA değerleri karşılaştırıldığında, tüm grupları ile kontrol grubu arasında anlamlılık düzeyinde fark bulundu ($p<0.05$). Dolayısıyla, kontrol grubuna göre, deney gruplarına ait spermelerde comet parametrelerinden Tail DNA'da gözlenen artış, deney gruplarında belirgin DNA hasarının olduğu gösterdi. Tail Moment değerleri karşılaştırıldığında ise, kontrol grubu ile izole astenozoospermi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) ancak diğer tüm gruplardan elde edilen veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Olive Tail değerleri karşılaştırıldığında ise, kontrol grubu ile izole astenozoospermi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) ancak izole oligozoospermi, izole teratozoospermi ve oligoastoteratozoospermi grupları arasında anlamlılık seviyesinde fark olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Şekil III).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çiftlerin en az bir yıl süre ile herhangi bir korunma yöntemi olmaksızın çocuk sahibi olamamaları infertilite olarak adlandırılmaktadır. İnfertilite probleminin üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkileyen bir faktör olduğu bilinmektedir (13). Dünya çapında yapılan ve 32 kliniği içeren çok merkezli bir çalışmada, infertil çiftlerin %30-40'ının sadece erkek faktörlü infertilite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (14). Erkek fertilitésinin devamı için, spermelerin normal sayı ve hareketliliklerinin yanı sıra genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması da son derece önemlidir. Dolayısıyla, erkekte DNA kalitesinin üreme yeteneği ile eşdeğer olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda; erkek kısırlığına sebep olan sperm morfolojilerinin, genel morfolojik değerlendirmesinin yanı sıra hasta grupları ve kontrol grubundan elde edilen semen örneklerinde comet assay metodunu kullanarak DNA'nın hangi düzeyde etkilendiğine dair bilgiler elde etmeyi planladık. Böylece, sperm morfolojilerinin anlaşılması, tedavinin yönlendirilmesi ile üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde işlem sırasında sperm seçimi ve değerlendirmesi için önceden elde edilecek bilgilerle tedaviye yarar sağlamayı amaçladık.

Semen kalitesi, klasik olarak semen içerisindeki spermelerin sayısı, motilitesi ve morfolojisine bakılarak değerlendirilir. Sperm morfolojisinin incelenmesi, spermatogenez kalitesi ve fertilitenin duyarlı bir göstergesi olduğu bilinmektedir (15). Diğer yandan morfolojik olarak



Şekil III: Comet görüntüleri, A: Normozoospermi (Kontrol grubu), B: İzole Astenozoospermi, C: İzole Oligozoospermi, D: İzole Teratozoospermi, E: Oligoastoteratozoospermi.

Tablo I: Kontrol ve diğer gruplar arasındaki DNA hasar ölçüleri. L Head: Baş uzunluğu, L Tail: Kuyruk uzunluğu, L comet: Comet uzunluğu, Head DNA: Başta %DNA, Tail DNA: Kuyrukta %DNA, TM: Kuyruk Momenti, OTM:OliveTail Moment, SH: Standart hata, Gruplar 1: Kontrol grubu, 2:İzole oligozoospermi, 3: İzole Astenozoospermi, 4: İzole Teratozoospermi, 5: Oligoastenoteratozoospermi

	1	2	3	4	5	p
L head	95.95±21.21 ^a	96.52±17.75 ^a	95.95±23.62 ^a	91.95±22.97 ^b	92.20±21.63 ^b	0.001
L tail	21.69±16.37 ^a	24.82±15.70 ^b	20.69±16.22 ^a	31.35±29.76 ^c	29.76±18.02 ^d	0.001
Lcomet	117.17±27.53 ^{ab}	121.33±26.06 ^{bc}	117.27±33.66 ^{ab}	123.47±33.36 ^c	116.20±29.45 ^a	0.001
Head DNA	94.00±29 ^a	93.42±4.04 ^a	92.30±12.58 ^{ac}	87.80±11.76 ^b	89.41±7.22 ^{cb}	0.001
Tail DNA	1.70±1.90 ^a	7.07±8.99 ^b	5.80±4.10 ^c	12.10±11.70 ^d	10.80±7.70 ^e	0.001
TM	1.25±1.42 ^a	2.09±2.92 ^b	1.44±2.11 ^a	5.20±9.02 ^c	4.09±7.06 ^d	0.001
OTM	1.99±1.42 ^a	2.68±2.28 ^b	1.73±1.81 ^a	4.34±5.57 ^c	4.62±4.93 ^c	0.001

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. $p < 0.05$ Anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

yeterli olmayan sperm, eşin yumurta hücresinin döllenme gücünü azaltmakta ve döllenme gerçekleşse bile, oluşan embriyonun düşükle sonuçlanması olasılığını arttırmaktadır. Morfolojik değerlendirmenin başlıca amacı normal ve anormal spermelerin ayırt edilmesidir. Çünkü morfolojik bozukluğun lokalizasyonu, türü ve miktarının fertilité ile sıkı bir ilişkisi olduğu ve anormal yapıdaki spermelerin fertilité yeteneklerinin olmadığı bilinmektedir. Bu yüzden sperm morfolojisi, erkeğin çocuk sahibi olabilme potansiyelini en iyi biçimde gösteren kriterlerden biridir (16).

Literatür incelendiğinde, Kruger kriterlerine göre yapılan değerlendirmelerin ön plana çıktığı ve sınır değeri olarak çoğunlukla %4'ün alındığı anlaşılmaktadır. Buna göre sınırdan ya da hafif anormal olan spermatozoalar anormal olarak kabul edilmektedirler. IVF yöntemlerinde başarıyı etkileyen faktörler araştırıldığında sperm sayısı, hareketlilik ve morfolojik özelliklerinin fertilizasyon üzerinde direkt etkili olduğu saptanmıştır (7).

Bu çalışmada, kontrol grubu dışında incelenen tüm semen örneklerinde kruger kriterlerine göre baş anomalilerine sahip spermeler bulunmaktaydı. Aynı zamanda gruplar arasındaki sperm morfolojileride değerlendirilmiş ve karşılaşılan bazı anomaliler açıklanmıştır. Normozoospermik bireylere ait morfolojik değerlendirmede normal yüzdenin %4 ve üzeri olduğu gözlenmiştir. Bu grupta genel itibarıyla birçok sperm normal veya normale yakındı. İzole teratozoospermi'ye ait semen örnekleri incelendiğinde normal sperm hücre sayısı %4'ün altındaydı. Ayrıca, çeşitli anomalilerin en fazla bulunduğu deney grupları izole teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi grupları olup, burada pin-head, sitoplazmik droplet, tapered, amorf sperm yapısı, round-head, abaksiyel implantasyon kırık boyun anomalisi, tail stump, dag defekti gibi birçok sperm anomalisine rastlandı.

Sperm morfoloji ve motilite anomalilerinin DNA hasarı ile ilişkili olduğu (17), hasarlı DNA'ya sahip sperm

fertilizasyon oranını negatif yönde etkilediği (18), embriyo gelişim kalitesini bozduğu ve düşük oranda artışa neden olduğu bildirilmiştir (19). Bu riski en aza indirebilmek için, çeşitli sperm morfoloji anomalileri ile DNA hasarına sahip spermelerin kullanımından sakınılması önerilmiştir (20). Yapılan bir çalışmada; sperm DNA fragmantasyonu indeksi ile semen parametreleri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu gösterilmiştir (21). Diğer bir çalışmada ise sperm DNA'sındaki hasarın üreme yeteneği üzerinde olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir (22).

Sperm morfolojik değerlendirmesinin infertilite sebebini belirlemede tek başına yetersiz olabileceği ve spermdeki DNA hasarını belirlemenin de gerekli olduğu savunulmaktadır. Bu amaç için kullanılan Comet metodu basit, hızlı, duyarlı olması, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilirliği, en önemlisi ise radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (23).

Comet yönteminin avantajlarını mümkün kılan bir diğer çalışmada da insan spermelerinde, hücrelerdeki DNA hasarını belirleyen iki teknik olan Eliza ve Comet yöntemleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak Comet yönteminin Eliza üzerindeki en temel avantajının, DNA hasarının bireysel hücrelerde belirlenebileceği ve yayılı hasarının şekilsel bakımdan bir bilgi verdiğidir. Çünkü bu yöntem herhangi bir hücre popülasyonunda karşılaştırılabilir toplam DNA hasarını göstermektedir (24). Yapılan bir çalışmada insan spermatozoalarındaki ssDNA ve dsDNA kırıklarını eş zamanlı değerlendirme amacıyla modifiye edilmiş bir comet yöntemi kullanılmışlar ve sperm DNA'larındaki tek ve çift kırıklarının belirlenmesinde pozitif kolerasyon gösterdiğini saptanmıştır (25). Eugin ve ark., alkalın ve nötral comet yöntemi analizleri kullanarak yaptıkları çalışmada oligoastenoteratozoospermi, astenoteratozoospermi ve varikoselli astenoteratozoospermi hasta gruplarında ssDNA ve dsDNA fragmantasyon düzeyinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (26). Biz de çalışmamızda, DNA hasarını göstermek

amacıyla comet metodunu kullandık ve belirlediğimiz hasta grupları ile kontrol grubu arasında DNA hasarı açısından anlamlı bir ilişki olduğunu belirledik.

Sperm morfolojisindeki bozukluğun asıl kaynağı sperm kromatin yapısındaki defektlerden kaynaklanmaktadır. Literatürde sperm kromatin yapısının bir problem olarak görülmesi gerekliliğine dikkat çeken birçok çalışmalar bulunmaktadır. Ngo ve ark., sperm kromatin hasarının fertilité ile olan ilişkisini göstermek için yaptığı çalışmada kromatin hasarına sahip olan erkek bireylerin çocuklarında doğum defekti görüle ihtimalinin arttığına dikkat çekmiştir (27). Host ve ark., DNA dizi kırılmalarının normal erkeklerden alınan sperm örneklerine nazaran oligozoospermik erkeklerden alınan sperm örneklerinde daha sık görüldüğünü bulmuşlardır. DNA dizi kırılmalarına sahip olan spermatozoa seviyesinin Kruger Strict kriterleri ile belirlenen morfolojik patolojik sperm seviyeleri ile kısmen ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (28).

Yapılan bir çalışmada comet yöntemi kullanılarak spermatozoonlardaki DNA hasarının bu spermatozoonlardan elde edilen embriyo kalitesi üzerindeki etkisine bakıldığında, düşük DNA hasarına sahip spermatozoon grubunun anlamlı bir şekilde daha yüksek, iyi kalitede embriyo yüzdesine sahip olduğu gösterilmiştir (29).

Yapılan çalışmalar sperm kromatin yapısındaki hasarların sperm morfolojisi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Biz de bu çalışmalardan yola çıkarak sperm mac boyama ile hastaların sperm morfolojilerini ve sperm DNA hasarını birlikte değerlendirdik. Çalışmamızda belirlemiş olduğumuz farklı hasta gruplarında DNA hasarını göstermek amacıyla comet yöntemini kullandık. Elde edilen verilere göre izole oligozoospermi ve izole astenozoospermi içeren olgularda daha fazla sayıda sperm hücrelerinin DNA hasarı içerdiğini, izole teratozoospermi ve oligostenoteratozoospermi olgularında ise sperm hücrelerinin tamamında yüksek DNA hasarı olduğunu gösterildi. Normal semen parametrelerine sahip hasta olgularının bazılarında küçük ölçekte DNA hasarına sahip hücrelere rastlanılsa da bu anlamlı derecede olmadığı için pozitif korelasyon göstermemiştir. Elde ettiğimiz comet bulguları morfolojik değerlendirmeler ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak, sperm şekil bozuklukları, erkeklerde fertilitéye yol açan önemli bir neden olarak kabul edilse de, sperm DNA hasarının embriyo kalitesini önemli derecede etkileyebileceği ve DNA hasarına sahip bireylerden olan çocuklarda da doğum defektlerinde artış riski bulunabileceği söylenebilir. Yani normal olmayan ve kriterlerin altında kalan semen parametrelerine sahip bireylerden özellikle de teratozoospermi ve oligostenoteratozoospermi tanısına sahip hastalardan doğan erkek çocukların da DNA hasarı içeren sperm değerlerinde olma ihtimalleri mevcuttur.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization 2010: 70-107.
2. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005; 84: 850-853.
3. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009; 30: 219-229.
4. 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: 674-677.
5. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 1999; 31: 361-366.
6. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 1999; 4: 31-37.
7. Ambe AK, Mondragon EC, Gonzales SE. Impact of spermatozoid head anomalies as predictor factor of nondetermined infertility. *Ginecol Obstet Mex* 2008; 76: 151-155.
8. Kruger TF, Ackermann SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of Andrology* 1987; 18: 275-277.
9. Arabi M. Bull spermatozoa under mercury stress. *Reprod Dom Anim* 2005; 40: 454-459.
10. 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: 789-791.
11. Sarıozkan S, Cantürk F, Yay A, Akçay A. The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored new zealand rabbit spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18: 475-480.
12. Verit FF, Verit A, Kocyigit A et al. No increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stress in patients with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 274: 339-344.
13. Macleod J. Human male infertility. *Obstet Gynecol Surv* 1971; 26: 335-351.
14. Comhaire FH, de Kretser DM, Farley TM, Rowe PJ. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl* 1987; 7: 1-53.
15. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF et al. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia* 1997; 29: 1-7.
16. Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relation between morphologically abnormal spermatozoa and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int J Androl* 1982; 5: 379-386.
17. Sharbatoghli M, Valojerdi MR, Amanlou M, Khosravi F, Jafar-abadi MA. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 286:1315-1322.
18. Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility*

- 2010; 94: 549-557.
19. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and metaanalysis. *Human Reproduction* 2012; 27: 1-10.
 20. Zhang L, Wang L, Zhang X et al. Sperm chromatin integrity may predict future fertility for unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *International Journal of Andrology* 2012; 35: 752-757.
 21. Chi HJ, Chung DY, Choi SY et al. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clin Exp Reprod Med* 2011; 381: 10-17.
 22. Saleh R, Agarwal A, Nada E et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility* 2003; 79: 1597-1603.
 23. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *American Society Andrology* 2013; 25: 2047-2927.
 24. Hughes MC, McKelvey-Martin VJ, Lewis SE. Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis* 1999; 14: 71-75.
 25. Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernandez JL, Gosalvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reproductive BioMedicine* 2009; 18: 609-616.
 26. Ribas-Maynou J, Garcí'a-Peiro A, Abad C et al. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Human Reproduction* 2012; 27: 652-658.
 27. Ngo AD, Taylor R, Roberts CL, Nguyen TV. Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2006; 355: 1220-1230.
 28. Host E, Lindenberg S, Kahn J, 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: 336-339.
 29. Simon L, Murphy K, Shamsi MB et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction* 2014; 29: 2402-2412.