

## Sperm değerlendirme testleri; dünden bugüne

### *Sperm function tests; from past to present*

© Filiz Yılmaz

Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi, Çorum, Türkiye

#### ÖZ

İnfertilite, korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen, bir yılın sonunda gebelik oluşmaması durumudur ve reproduktif yaş grubundaki çiftlerin %10-15'ini etkiler. İnfertilite nedenleri erkek ve kadın faktörleri arasında neredeyse eşit olarak bölünmüştür; her biri infertilite vakalarının yaklaşık %40'ını oluşturur, geri kalan %20'si de her ikisinin ortak etkisinden kaynaklanır. Erkek hastaların çoğunda, infertiliteden sorumlu moleküler mekanizmalar bilinmemektedir. Etiyolojide genetik, epigenetik, sistemik, çevresel faktörler veya bu faktörlerin birliktelikleri yer alır. Sperm fonksiyonunu değerlendirmek için birçok test geliştirilmiş, fakat henüz sperm fertilizasyon kapasitesini öngörebilen bir test bulunamamıştır. Günümüzde ise gelişen teknoloji sayesinde genomik, proteomik ve metabolomik gibi yeni yöntemler ile spermatogenezin moleküler mekanizmaları ve erkek infertilite patogenezi araştırmaları yapılmaktadır. Bu derlemede geçmişten günümüze gelen sperm değerlendirme testleri tartışılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Sperm, semen analizi, infertilite

#### ABSTRACT

Infertility is the condition that pregnancy does not occur at the end of a year despite unprotected and regular sexual intercourse, affects 10-15% of couples in the reproductive age group. The causes of infertility are real most equally divided between male and female factors; each accounts for about 40% of infertility cases, while the remaining 20% is due to combined effect of both. In most male patients, the molecular mechanisms responsible for infertility are unknown. Etiology includes genetic, epigenetic, systemic and environmental factors, or combinations of these factors. Several tests have been developed to evaluate sperm function, but any test has yet been found to predict sperm fertilization capacity. Today, molecular mechanism of sperm production, maturation and pathogenesis of male infertility are being investigated with new methods such as genomic, proteomic, and metabolomic thanks to developing technology. This review discusses the past, present and future of sperm evaluation tests.

**Keywords:** Sperm, semen analysis, infertility

#### GİRİŞ

İnfertilite korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen, bir yılın sonunda gebelik oluşmaması durumudur ve reproduktif yaş grubundaki çiftlerin %10-15'ini etkilemektedir. İnfertilite nedenleri erkek ve kadın faktörleri arasında neredeyse eşit olarak bölünmüştür; her biri infertilite vakalarının yaklaşık %40'ını oluşturur, geri kalan %20'si de her ikisinin ortak etkisinden kaynaklanır. Günümüzde erkek infertilitesi tanısında sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji gibi parametreleri içeren semen analizi, sperm değerlendirme testlerinin temelini oluşturur ve sperm kalitesi hakkında bilgi verir. Fakat erkeğin fertilizasyon kapasitesini ölçmemektedir. Yapılan araştırmalarda normal semen analizi sonucuna

sahip erkeklerde infertilite veya çelişkili sonuçlar olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle spermatozoonun fertilizasyon yeteneğini analiz etmek için daha ayrıntılı ve fonksiyonel testlere ihtiyaç vardır. Sperm disfonksiyonunu hücresel ve moleküler düzeyde tanımlamalıdır. İdeal sperm fonksiyon testi, spesifik sperm disfonksiyonunu teşhis etmeli, fertilizasyonu ve gebelik oranlarını tahmin etmeli ve tanımlanan sperm disfonksiyonunu azaltmak için uygun bir tedaviyi işaret etmelidir. Erkek faktör infertilite etiyojisinin doğru analiz edilmesi, en uygun tedavi şeklinin planlanması açısından oldukça önemlidir. Bu derlemede geçmişten bugüne gelen sperm değerlendirme testleri ayrıntılı olarak ele alınmış ve geleceğe yönelik neler yapılabileceği tartışılmıştır (1,2) (**Tablo**).

**Sorumlu Yazar:** Filiz Yılmaz, Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi, Çorum, Türkiye

**E-posta:** drfilizyilmaz@gmail.com

**Geliş Tarihi:** 17.12.2019 **Kabul Tarihi:** 31.12.2019 **Doi:** 323222/jhsm.660649

Cite this article as: Yılmaz F. Sperm değerlendirme testleri; dünden bugüne. J Health Sci Med 2020; 3(1): 71-76.

**Tablo.** Sperm değerlendirme testleri

1. Semen analizi
2. Sperm fonksiyon testleri
· Antisperm antikor (ASA) testleri
· Akrozom reaksiyon testi
· Sperm penetrasyon testi
· Zona pellucida (ZP) bağlanma ve penetrasyon testi: Hemizona testi (HZA)
· Hyaluronik asit bağlanma testi
· Sperm vitabilitesi
3. Oksidatif stres
· Kemilüminesans
· Floresan teknikler
· NBT testi
4. Sperm DNA fragmantasyon testleri
· Basit hücre jel elektroforezi (Comet)
· Sperm kromatin analizi (SCSA)
· Terminal deoksitriksinükleotit transferaz aracılı etiketleme (TUNEL)
· Sperm kromatin dispersiyon (Halo) testi
5. Epigenetik yaklaşım
· Proteomiks, genomiks, metabolomiks

## 1. SEMEN ANALİZİ

Semen; testisten gelen sperm, epididimis, ductus deferens, prostat, seminal veziküller, bulboüretal bezlerden gelen salgılarından oluşan alkali, opak, beyazımsı bir sıvıdır. Erkek infertilitesinde, ilk ve temel tetkik semen analizi (spermiyogram)'dir (3). Semen analizi yapılırken, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) İnsan Semen İncelemesi Laboratuvar El Kitabı, 2010 Baskısı referans alınır (4).

Semen analizini etkileyen birçok faktör bulunur. Bunlar; numunenin tümüyle toplanamaması, aksesuar cinsiyet bezlerin yetersiz aktivitesi, son cinsel aktiviteden itibaren geçen zamanın kısa veya uzun olması, sondan bir önceki cinsel perhis süresi, ejakülat başına düşen spermatozoon sayısını etkileyen testis büyüklüğüdür. Bu yüzden tek bir semen analizi ile erkeğin semen kalitesini tanımlamak mümkün değildir, 2 veya 3 numuneyi en az 15 gün ara ile incelemek gereklidir. Numune toplama aşamasından önce hasta ayrıntılı olarak yazılı ve sözlü bilgilendirilmelidir. Aksi takdirde sonuçların sağlıklı değerlendirilmesi mümkün değildir. İncelenecek ejakülat en az 48 saatlik cinsel perhis sonrasında mastürbasyon ile steril bir kaba alınmalı ve cinsel perhis 7 günü geçmemelidir. Örnek sıcaklığını muhafaza etmek için, laboratuvara yakın bir odada verilmelidir, nadiren hastanın evden örnek getirmesine izin verilir, en geç 30 dakika içerisinde tetkik yapılacak laboratuvara, sıcaklığı korumak amaçlı belinde taşıyarak getirilmiş olmalıdır (3,4).

Ejakülatın makroskopik bakışında görünümü, miktarı, likefaksiyon zamanı, viskozitesi, koku ve pH'sı değerlendirilir. Mikroskopik inceleme ise, faz kontrast mikroskopunda Makler kamera ile sperm sayımı, ıslak preparat ve sperm yayma preparatı ile morfoloji incelenir. WHO 2010 semen analizi normal değerler; Semen volümü 1.5 ml, total sperm sayısı 39 milyon/ejakülat, sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml, total motilite %40, ileri motilite %32, vitalite %58 canlı sperm, sperm morfolojisi %4 normal formlar, pH>7.2, peroksidaz-pozitif lökosit 2.4µmol/ejakülat, seminal fruktoz

>13µmol/ejakülat, seminal nötral glukozidaz >20 mU/ejakülat (3,4).

WHO insan semen analizinde referans değerleri belirlemiş olmasına rağmen, fertil erkeklerin bile semen parametrelerinde %50 referans değerlerin altında olabilir (5). Patel ve ark. (6) tarafından yakın zamanda yapılan derlemede, her üç semen parametresindeki anormallikler (sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji) subfertiliteyi gösterebilir, ancak aşırı kayıpları infertilitenin doğru tahminini ve infertiliteye sebep olan patolojik bulguların sadece azospermi, ağır astenospermi ve globozoospermi olduğunu göstermişlerdir. Leushuis ve ark. (7) semen analiz sonuçlarının değişkenliği ve tekrarlanabilirliğini için 5000'den fazla hastanın verilerini analiz etmiş, semen analizi sonuçlarının hasta kaynaklı (örneğin perhis süresi), analiz yöntemi ya da değerlendiren kişi kaynaklı ve doğal biyolojik etkenler nedeniyle değiştiğini, tüm semen parametrelerinde %28 ile %34 arasında değişkenlik olduğunu ve semen analizlerinin sınırlı tekrarlanabilirliğini göstermiştir.

## 2. SPERM FONKSİYON TESTLERİ

“Sperm fonksiyonu” terimi, spermatozoonun genetik materyalini bir oosite başarıyla iletme kabiliyetini belirtir. Fertilizasyonda ejakülasyon ile atılan sperm, dişi genital sisteminde kapasitasyonu tamamlamalı, zona pellucida'ya (ZP) bağlanmalı ve son olarak akrozom reaksiyonuna girmelidir. Bu nedenle, sperm fonksiyon testleri fertilizasyon basamaklarını değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bunlar; ASA testi, akrozom reaksiyon testi, zona pellucidaya bağlanma ve penetrasyon testidir (8).

ICSI yöntemi gelişmeden önce infertil çiftler için yaygın olarak yapılan sperm fonksiyon testleri, şimdi esas olarak araştırma amacıyla yapılmaktadır. Sebebi; ICSI sayesinde fertilizasyonun ilk aşamalarının atlanmış olmasıdır. IVF sonuçları, infertil erkeklerin sperminde sıklıkla yetersiz akrozomal reaksiyon ve/veya anormal sperm-zona pellucida ilişkisinin bulunduğunu göstermiştir.

### 2.1. Anti-sperm antikor (ASA) testleri

Normalde testis ile kan arasında bir bariyer vardır ve bu bariyer spermilerin immün sisteme maruz kalmasını önler. Sperm üretimi puberte sonrası başladığı için daha önce oluşmuş olan immün sistem, spermeleri tanımaz ve yabancı olarak değerlendirir. Sperm ile kan hücrelerinin karşılaşması durumunda antikor üretimi gerçekleşir. Sperm antikor oluşumu için risk faktörleri; duktal obstrüksiyon, önceki genital enfeksiyonlar, testiküler travma, önceden yapılmış vazo-vazostomi veya vazoepididimostomidir. Sperm antikorları, spermilerin aglütinasyonuna (kümeleşme) neden olabilir. Sperm üzerindeki antikorları gösteren testler ‘direkt testler’ olarak adlandırılır. Bunlar; 1) karma antiglobülin reaksiyonu (mikstantiglobülin reaksiyonu, MAR) testi, 2) immunobead (IB) testidir. İndirekt testler ise; serumda veya semende antikor tespit eder. ASA testleri; sperm sayısı normal, sperm aglütinasyonu olan izole astenospermili kişilerde yapılmaktadır. Direkt testler ile sperm yüzeyinde bulunan ASA indi-

rekt testler ile serum ve seminal plazmada bulunan ASA'dan daha fazla anlamlıdır. Eğer kişiye ICSI planlanıyorsa ASA ölçümü gerekli değildir (9).

## 2.2. Akrozom Reaksiyon Testi

Spermin zona pellucidaya bağlanması, akrozom reaksiyonu (AR) denilen hidrolize edici enzimlerin salınımını tetikler ve sadece akrozom reaksiyonu gerçekleşen spermatozoon, ZP'ye nüfuz edebilir, oosit membranını bağlayabilir ve oosit ile kaynaşabilir. Litik enzimlerin serbest bırakılması ve membran reseptörlerinin varlığı akrozom reaksiyonu için gereklidir, bu da spermin ZP yoluyla nüfuz etmesi ve oolema ile entegrasyona neden olur. AR, sperm bağlanmasından sonra ZP'de başlar. Akrozomal durum mikroskopi, flowsitometri ve floresan işaretli lektinler ile değerlendirilebilir. Taze ve depolanmış semende bulunan hasarlı akrozom içeren hücrelerin yüzdesinin hesaplanması, semen değerlendirmesinde önemli kısımlarından biridir. Zona bağlanma testlerine benzer şekilde, zayıf AR testine sahip hastalar intrasitoplazmik sperm enjeksiyonuna (ICSI) yönlendirilmelidir. AR testlerinde fertilizasyonun öngörülmesinde yüksek bir tahmin gücü olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, AR testi şu anda klinik amaçlardan çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır (10).

## 2.3. Sperm Penetrasyon Testi

1980'lerde ve 1990'ların başında popüler olan "hamster yumurta penetrasyon testi" (HES) veya "sperm penetrasyon testi" (SPA) şu anda çok az sayıda laboratuvarında kullanılmaktadır. Sperm kapasitesini ve fertilizasyon yeteneğini ölçmek için hamster oositi kullanılarak spermin oosite nüfuz etme yetenekleri in vitro koşullarda test edilmiştir. Her ne kadar bu testte birkaç modifikasyon geliştirilmiş olsa da, fonksiyonel prediktif değeri tartışmalıdır ve normal semen parametreleri olan erkekler için bile artık önerilmemektedir (11).

## 2.4. Zona Pellucida (ZP) Bağlanma ve Penetrasyon Testi: Hemizona Test (HZA)

HZA, zona yüzeyindeki glikoprotein reseptörleri ZP3'e bağlanmak ve uygun bir şekilde aktivasyon ve akrozom reaksiyonuna girmek için spermatozoon kapasitesini incelemek için canlı olmayan, ikiye bölünmüş insan oositlerini kullanan fonksiyonel bir homolog gamet etkileşimi modelidir. Bu analizin ana prensibi, sperm-zona bağlanmasının in vitro olarak değerlendirilmesidir. HZA testinin SPA testine göre daha iyi hassasiyet/özgüllük ve pozitif/negatif prediktif güç göstermiştir ve IVF sonucu ile korele olduğu tespit edilmiştir. Normal veya hafif anormal semene sahip erkeklerde bu test uygulanabilir ve yardımcı üreme tedavisi planında yararlanılabilir (12).

## 2.5. Hyalüronik Asit Bağlanma Testi

İnsan oositi, doğal bir selektör görevi gören hyalüronik asit ile çevrilidir. Sadece hyalüronik aside özgü reseptörleri eks-

prese eden olgun spermatozoon oositlere ulaşabilir ve onu fertilize edebilir. Hyalüronik aside bağlanan sperm normal bir şekilde sahiptir. Bu da in vivo koşullarda hyalüronik asidin doğal bir sperm seçici olarak rolü olduğunu düşündürür. ICSI için seçilen spermelerin hyalüronik asidi bağlama kabiliyeti değerlendirildiğinde fertilizasyon oranı ve gebelik oranı veya canlı doğum oranı için bir katkısı izlenmemiştir. Bu nedenle, hyalüronik asit sperm seçim tekniğinin rutin kullanımı için kesin bir klinik kılavuz denilemez. Bu konu hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekir (13).

## 2.6. Sperm Vitalitesi

Her hareketsiz sperm, ölü hücre demek değildir. Sperm canlılığı, hücre membran bütünlüğü ile değerlendirilir, Eosin-nigrosin boyama veya hipotonik şişme testiyle test edilir. Hipo-ozmotik şişme testi (HOST), canlı spermatozoonun membranının sağlam olup olmadığını test eder. Fertilizasyon için sağlam bir sperm membranı gereklidir. HOST, ejakülatta çok az veya hiç hareketli sperm bulunmayan olgularda endikedir. Hipo-ozmotik koşullarda, canlı sperm hücresinin sitoplazmik alanı şişer ve kuyruk kıvrımları oluşur. Ölü sperm, hipotonik ortamda şişemez ve bu özellikleri sergiler. Bu testin sonuçları, morfoloji ve motilite gibi diğer semen değerlendirmeleri ile ilişkilidir, ancak doğurganlık üzerindeki etkileri hakkındaki veriler tatmin edici değildir (8).

Eosin-nigrosin boyama da canlılığın değerlendirilmesinde kullanılır. Teknik, ölü hücrelerin eozini alacağı prensibine dayanır ve sonuç olarak pembe boya oluşturur. Nigrosin, preperat/yayma değerlendirmeyi kolaylaştıran koyu renkli bir fon sağlar. Değerlendirme herhangi bir zamanda yapılabilir ve preperat/yayma gelecekteki değerlendirme ve kayıt için de korunabilir (14).

## 3. OKSİDATİF STRES

Günümüzde popüler olan antioksidan ve oksidan dengesi sperm fonksiyonunu değerlendirmek için de analiz edilmiş ve oksidatif stresin, erkek infertilite etiyolojisinde yer aldığı gösterilmiştir. Oksidatif stres, sperm üretimini, hareketliliğini, hücre zarını ve DNA bütünlüğünü bozan reaktif oksijen türleri (ROS) üretir (15).

Aslında düşük ROS seviyeleri, spermatozoon olgunlaşması, kapasitesini, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve oosite füzyonundan sorumlu hücre içi yolların aktivasyonunda önemli bir rol oynar (15). Öte yandan, yüksek ROS seviyeleri, sperm zarına zarar verebilir; bu da zayıf hareketlilik, erken kapasite ve akrozom reaksiyonu, taşıyıcı ve haberleşme iyon kanallarının anormal davranışı, fosfatidil serin translokasyonu değişiklikleri, morfolojik anormallikler ve bozulmuş sperm-oosit füzyonuyla sonuçlanabilir. Oksidatif zincir reaksiyonları ayrıca lipid peroksidasyonuna, protein bozulmasına, hücre içi sinyal yollarında değişikliklere ve apoptoza yol açabilir. Üstelik oksidatif stres, sırayla zayıf embriyogenez, abortus ve infertiliteye neden olabilecek sperm DNA hasarı ile bağlantılı olmuştur (16).

Aziz ve ark. (14) infertil ve fertil erkeklerde sperm ROS değerlendirmişler ve sperm ROS üretimi ile spermin normal



morfoloji arasında anlamlı bir negatif korelasyon varken, morfolojik olarak deforme olmuş sperm ve lökositler ile pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Zamanla seminal oksidatif stres seviyelerinin değerlendirilmesi, antioksidan tedavilerin izlenmesine ve etkili doz ve sürelerin tanımlanmasına yardımcı olacaktır. Artan çalışmalara rağmen, infertil erkeklerin değerlendirilmesinde oksidatif stresin rutin testleri henüz belirtmemiştir. Nedeni, temel olarak testin kullanılabilirliği, karmaşıklığı, maliyet etkinliği ve daha da önemlisi, evrensel olarak kabul görmüş bir analiz yönteminin olmayışı ile ilgilidir. İnsan semenindeki oksidatif stresi ölçmek için çeşitli doğrudan ve dolaylı testler olmak üzere ikiye ayrılır. Direkt testler; kemilüminesans, flow sitometri, nitro mavi tetrazolyum (NBT) testi iken indirekt testler; myeloperoksidaz testi, lipid peroksidasyon ölçümü, total antioksidan kapasite ölçümüdür. Doğrudan ölçümler, sperm hücre zarı içindeki oksidasyon derecesini ölçmektedir (17).

### 3.1. Kemilüminesans

Kemilüminesans yöntemler, aynı anda farklı ROS'leri inceleme imkanı sayesinde oldukça hassastır ve spesifiktir (17).

### 3.2. Floresan Teknikler

Spermin içine yüklenebilen redoks duyarlı floresan problemleri, flowsitometre veya floresan mikroskopisi ile izlenebilir. Mitokondrinin hücresel ROS'un ana kaynağı olduğu göz önüne alındığında, mitokondriye özgü süperoksit ile floresan mikroskopu kullanılarak görüntülenebilir. Hücre içi ROS ölçümünde floresan teknikler, kemilüminesans yöntemden daha yüksek bir özgüllüğe, hassasiyete, duyarlılığa ve tekrar üretilebilirliğe sahiptir. Spermatozoonun spesifik analizleri ile ilgili olarak, akış sitometrisi, yalnızca erkek germ hücrelerine odaklanabilmesi bakımından avantajlıdır. Ayrıca, çok sayıda hücre kolayca analiz edilebilir, bu da yüksek özgüllük ve hassasiyete yol açar (17).

### 3.3. NBT Testi

Nitro mavi tetrazolyum (NBT) testi, hücresel oksidatif mekanizmayı ve nötrofil fonksiyonunu ölçmek için basit ama etkili bir laboratuvar yöntemi olarak ortaya çıkmıştır (16). Bu testin temeli, NBT'nin, spermatozoon veya lökositlerden salınan süperoksit ile etkileşime girdikten sonra diformazam adı verilen mavi bir pigmente dönüştürülmesine dayanır. Diformazam konsantrasyonu daha sonra ölçülebilir ve hücre içi ROS konsantrasyonu ile korele edilebilir (17).

En yaygın kullanılan yöntem, tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile malondialdehit (MDA) seviyesi ölçümüdür. Bu tetkikte, MDA, florometre veya spektrofotometre ile ölçülebilen renkli bir madde üreten, TBA ile bağlanır. Seminal plazma MDA seviyeleri spermde 5-10 kat daha yüksektir ve standart spektrofotometrelerle ölçüm yapılmasını mümkün kılar. MDA ölçümünün klinik önemi, infertilite tanılı erkeklerde seminal ROS seviyeleri ile anlamlı pozitif korelasyonundan kaynaklanır. Ayrıca, *in vitro* çalışmalarda, spermin motilitesi, DNA bütünlüğü ve sperm-oosit füzyonu anormalliklerini

nin MDA konsantrasyonunda artışla ROS kaynaklı olduğu gösterilmiştir (17).

## 4. SPERM DNA FRAGMENTASYON TESTLERİ

Üremeye yardımcı tedavi laboratuvarları için önemli bir test olma potansiyeline sahip olmasına rağmen infertil erkeğin sperm fonksiyon değerlendirmesi için rutin bir test değildir ve halen anormal bir DNA bütünlüğünü düzeltecek hiçbir tedavi yoktur (17,18).

### 4.1. Basit Hücre Jel Elektrofrezisi (Comet)

Spermatozoon DNA'sındaki hasarın düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisidir. Bu yöntem pek çok çalışmada kullanılan görsel floresan bir tekniktir. Nötr veya alkali koşullar altında gerçekleştirilen tek hücreli jel elektrofrezisinden oluşur. Bu yöntemle, birçok hücreyi analiz etmek mümkündür ve tek ve çift iplik DNA kırık yüzdeleri kolayca tespit edilebilir, ancak teknik kurulum zahmetlidir, sonuçları analiz etmek için özel bir yazılım gerektirir (18).

### 4.2. Sperm Kromatin Analizi (SCSA)

Acridin orange, tek (kırmızı) veya çift sarmallı (yeşil) DNA varlığında farklı bir floresan özelliğe sahip bir metakromatik boyadır. Test kolay ve hızlıdır, ancak gözlemciler arası öznel ve floresanın hızlı solması ile sınırlıdır. SCSA, akrinin orange boyamanın akış sitometrik versiyonudur ve sperm DNA'nın kırılmaya karşı duyarlılığını ölçer ve çok sayıda spermin analizine izin verir. Bununla birlikte, sadece DNA kırılmalarına karşı duyarlılığı yüksek olan sperm yüzdesini verir, ancak tek bir spermdeki DNA hasarı miktarı hakkında fazla bilgi vermez (19).

### 4.3. Terminal Deoksinükleotit Transferaz Aracılı Etiketlemesi (TUNEL)

Bu testin gebelik için, özellikle intrauterin inseminasyon için yüksek bir prediktif değeri olduğu bulunmuştur. Yüksek prediktif değeri ve test kitinin ticari kullanılabilirliği göz önüne alındığında, TUNEL testi şu anda sperm DNA fragmentasyonunu ölçmek için önerilmektedir (11,17).

### 4.4. Sperm Kromatin Dispersiyon (Halo) Testi

Halo testi, spermatozoon için tek/çift DNA zincirinde kırılmalarının sayısını kolayca tespit edilebilir. Floresan mikroskop altında sperm kromatin dispersiyonu değerlendirilir. Fragmentasyon içermeyen spermde halo izlenir. Comet testinde olduğu gibi, kurulum kolay değildir, özel yazılım gereklidir ve DNA hasarı yüksek oranda tahmin edilebilir (11).

## 5. EPİGENETİK YAKLAŞIM

'Gen üstü' anlamına gelen epigenetik kavramı, DNA sekansını değiştirmeyip DNA, protein ve RNA'ların fonksiyonunun ve regülasyonunun değişimi ile sonuçlanan modifi-

kasyonları içerir. Epigenetik işaretler olarak adlandırılan bu değişiklikler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi ve kodlanmayan RNA'lar ile ilişkili mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşir. Epigenetik işaretler; gen ifade düzeyleri, DNA-protein etkileşimleri, hücrel farklılaşma, embriyogenez ve genomik imprinting gibi hücrel süreçlerin kontrolünde anahtar rol oynar. Yapılan çalışmalarda epigenetik düzenlemelerden sorumlu olan mekanizmalardaki hataların kanser, nörolojik hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve çeşitli gelişim bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir (20).

Sperm hücresinin temel işlevi, embriyoya DNA dizisinde kodlanan paternal genetik mesajı ve epigenetik bilgiyi iletmeğidir. En iyi gösterilmiş epigenetik kalıtım mekanizması, gen ekspresyonu düzenlemesinde yer alan baskılanmış genlerdeki sitozin kalıntılarının sitozin-guanin dinükleotitlerinde geri dönüşümlü metilasyonudur. Birçok çalışma infertil/subfertil hastalarda sperm DNA metilasyon paternlerinde, RNA içeriği ve histon retansiyonunda değişiklikler olduğunu göstermiştir. Histon tutulmasındaki değişiklikler sperm fonksiyonunu iki düzeyde etkileyebilir. İlk olarak, spermin fertilizasyon kapasitesinin azalmasına ve spermde DNA hasarına neden olabilir. İkincisi, normal embriyo gelişimi üzerinde etkisi olabilecek gelişimsel genlerin kromatin organizasyonunu değiştirebilir. Aslında, sağlıklı erkeklerde bulunan histona özgü dizilim paketlemesinin, subfertiliteli hastalarda rastgele sperm DNA kromatin dağılımıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (2).

### 5.1. PROTEOMİK, GENOMİK, METABOLOMİK

Günümüzde üreme kliniklerinde erkek fertilitésinin rutin değerlendirmesi semen parametrelerinin incelenmesiyle sınırlıdır. Her ne kadar sperm konsantrasyonunun, hareketliliğinin ve morfolojisinin değerlendirilmesi bazı infertilite vakalarını açıklasa da, bu parametreler yardımcı üreme tedavisinin (YÜT) gebelik sonuçları ile orantılı bulunmamıştır. Bu gözlem, erkek fertilitésini ayırt edebilen ve farklı doğurganlık tedavilerinin başarısını öngören moleküler biyobelirteçler geliştirme ihtiyacını vurgulamaktadır (2).

Proteomik, insan üreme ve doğurganlığın araştırılmasında yaygın olarak uygulanmış, üreme fizyolojisine yararlı bilgiler sağlayan ve başarılı bir YÜT gebelik için potansiyel biyobelirteçleri ve/veya tedavi planlamasında rol oynayan proteinlerin tanımlanmasına yol açan, hızla gelişen ve teknoloji odaklı bir bilimdir (21). Gelişen proteomik teknolojiler ile öngörülen biyobelirteçler klinikte karşılığı doğrulandıktan sonra, ELISA gibi daha ucuz ve daha uygulanabilir testler geliştirmek mümkün olabilir (2).

Proteomik analizi yüksek verimlilik ve yüksek hassasiyete sahip bir yöntem olmasına rağmen, proteomik tekniklerin günlük klinik pratiğine dahil edilmesinde hala aşılması gereken bazı engeller var. Örneğin, biyolojik örneklerde albümin veya immüoglobulinler gibi proteinlerin fazlalığı, düşük seviyede olan proteinlerin tanınmasını engeller. Ayrıca proteomik yöntemlerinin pahalı olması da kısıtlayıcı bir diğer faktördür (21,22).

## SONUÇ

Semen analizi erkek fertilitésinde ilk ve temel test olarak kullanılmaktadır. Fakat erkek fertilitésinin değerlendirilmesinde semen analizi yeterli değildir. Bu nedenle moleküler ve hücrel düzeyde değerlendiren fonksiyonel testler geliştirilmelidir. Geliştirilen testlerin standardizasyonu, etkin olması, maliyeti, değerlendirme süresi, insan gücü önemlidir. Moleküler biyoloji tekniklerinin ilerlemesi ve bu testlerin optimizasyonu, erkek fertilitésinin yönetiminde yeni tanı ve tedavi geliştirmelerine yol açacaktır.

## MADDİ DESTEK VE ÇIKAR İLİŞKİSİ

Maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkarı dayalı ilişkisi yoktur.

## KAYNAKLAR

1. Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility, Ninth Edition: Lippincott Williams & Wilkins; 2019.
2. Castillo J, Estanyol JM, Ballescá JL, Oliva R. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl* 2015 Jul-Aug; 17: 601-9.
3. Satar D, Gençdal S, Sperm Değerlendirmesi, sperm analizi. *Arşiv Kaynak Tarama Derg* 2013; 22: 532-42.
4. World Health Organization, WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th Edition, 2010, ISBN: 978 92 4 154778 9.
5. Blickenstorfer K, Voelkle M, Xie M, Fröhlich A, Imthurn B, Leeners B. Are WHO Recommendations to perform 2 consecutive semen analyses for reliable diagnosis of male infertility still valid? *J Urol* 2019 Apr; 201: 783-91. doi: 10.1016/j.juro.2018.11.001.
6. Patel AS, Leong JY, Ramasamy R. Prediction of male infertility by the World Health Organization laboratory manual for assessment of semen analysis: a systematic review. *Arab J Urol* 2017; 16: 96.
7. Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, et al. Reproducibility and reliability of repeated semen analyses in male partners of subfertile couples. *Fertil Steril* 2010 Dec; 94: 2631-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.03.021.
8. Kosteria I, Anagnostopoulos AK, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Tsangaris GT. The use of proteomics in assisted reproduction. *In Vivo* 2017 May-Jun; 31: 267-83.
9. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of assisted reproductive techniques, laboratory and clinical perspectives, 4th Edition. New York, Taylor & Francis, 2012.
10. Oehninger S, Franken DR, Sayed E, Barroso G, Kolm P, Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2000 Mar-Apr; 6: 160-8.
11. Sikka SC, Hellstrom WJ. Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian J Androl* 2016 May-Jun; 18: 392-401. doi: 10.4103/1008-682X.179161.
12. Kızılay F, Altay B, Sperm function tests in clinical practice. *Turk J Urol* 2017 Dec; 43: 393-400. Published online 2017 Dec 1. doi: 10.5152/tud.2017.96646
13. Vogiatzi P, Chrelias C, Cahill DJ, et al. Hemizona assay and sperm penetration assay in the prediction of IVF outcome: a systematic review. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 945825. doi: 10.1155/2013/945825. Epub 2013 Oct 21. Review.
14. World Health Organization. 5th ed. Geneva: WHO; 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Sperm.
15. Gosalvez J, Tvrda E, Agarwal A. Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future. *J Assist Reprod Genet* 2017 Jun; 34: 697-707. doi: 10.1007/s10815-017-0912-8. Epub 2017 Mar 25. Review.
16. Talwar P, Hayatnagarkar S. Sperm function test. *J Hum Reprod Sci*

- 2015 Apr-Jun; 8: 61-9. doi: 10.4103/0974-1208.158588.
17. Agarwal A, Majzoub A, Laboratory tests for oxidative stress. *Indian J Urol* 2017 Jul-Sep; 33: 199-206. doi: 10.4103/iju.IJU\_9\_17.
  18. G Türk, E Hicazi, A Bozkurt, Spermatozoon DNA Hasarı, *FÜ Sag Bil Derg* 2006; 20: 85-95.
  19. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol Biol* 2013; 927: 147-64.
  20. GK Kürekçi, M Bunsuz, G Önal, P Dinçer, Kazanılmış epigenetik değişikliklerin kalıtımı ve hastalıklara yatkınlıktaki rolü, *İst Tıp Fak Derg* 2017; 80: 1. *J Ist Faculty Med* 2017; 80: 1.
  21. Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R; Molecular Biology of Reproduction and Development Research Group. Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics* 2017 Jun 6; 162: 125-34. doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.018. Epub 2016 Aug 26. Review.
  22. Barazani Y, Agarwal A, Sabanegh ES, Functional sperm testing and the role of proteomics in the evaluation of male infertility, *Urology* 2014 Aug; 84: 255-61. doi:10.1016/j.urology.2014.04.043.