

**BAŞLIK: SPERM DNA FRAGMENTASYONU VE MİTOKONDRIYAL MEMBRAN POTANSİYELİ KOMBİNASYONU STANDART SPERM PARAMETRELERİNE GÖRE DOĞAL KONSEPSİYONU ÖNGÖRMEDE DAHA ÜSTÜNDÜR**

**ORİJİNAL BAŞLIK: SPERM DNA FRAGMENTATION AND MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL COMBINED ARE BETTER FOR PREDICTING NATURAL CONCEPTION THAN STANDARD SPERM PARAMETERS.**

**Fertil Steril 2016;105:637 –44. 2016 by American Society for Reproductive Medicine**

**Çeviren:** Op. Dr. Meryem Kuru Pekcan

Kadın Hast. ve Doğum uzmanı

Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve EAH

**Yazarlar:** Sladana Malic Voncina, Barbara Golob, Alojz Ihan, Andreja Natasa Kopitar, Mojca Kolbezen, and Branko Zorn

**Çalışma Merkezi:** Andrology Unit, Reproductive Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Center; and b Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Slovenia

**GİRİŞ:**

Dünya Sağlık Örgütü(WHO), korunmasız cinsel ilişkiye rağmen 1 yıl yada daha uzun süreli gebe kalamamayı infertilite olarak tanımlamaktadır. Sanayileşmiş ülkelerde infertil çiftler %14'lük grubu oluşturmakta olup, erkek faktörü nedeniyle infertilite oranı %20-70 arasında değişmektedir. Çiftlerin %80'i 1 yıl içinde gebe kalmakta olup %20'si 1 yıldan daha uzun sürede gebe kalabilmektedir. Bununla birlikte pratikte 1 yıl içinde doğal yoldan gebe kalamayan çiftler klinik değerlendirme için yönlendirilmektedir.

Semen analizi erkek fertilitesinde tek başına önemli bilgiler sağlamaktadır. Azospermi, hareketsiz sperm, teratozoospermi gibi aşırı erkek infertilite nedenlerine tanı konmaktadır. Ancak fertil ve subfertil erkekleri tek başına tanımlamada güvenilirliği daha azdır. Standart semen analizinin dışında sperm fonksiyon testleri geliştirilmiştir. Erkek fertilitite potansiyelini belirlemede kalıtsal sperm DNA'sı ve erkek gametinin mitokondriyal bütünlüğü önemlidir. Sperm DNA fragmentasyonunun düşük oranları ve MMP'nin yüksekliği normal fertilitite potansiyelini belirlemede önemli yol göstericilerdir.

DNA bütünlüğünü değerlendirmede önemli araçlardan biri TUNEL(deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein nick-end labeling)dir. Bozulmuş DNA bütünlüğü gebe kalma süresini uzatmakta, doğal yoldan gebelik başarısını azaltmakta ve gebelik kayıplarını artırmaktadır.

Mitokondri, hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan multifonksiyonel bir organeldir. Yüksek sperm fertilizasyon yeteneğinin sağlanması için,

sperm germinal epitelinin hızlı turnover'ı ile spermatogenezin regülasyonunda farklı mitokondriler rol oynarlar.

Sperm MMP; erkek fertilité potansiyelini belirlemede önemli bilgiler sağlamakta olup, sperm kalitesini yansıtmakta ve spesifik floresan belirteçlerle saptanabilmektedir. Düşük sperm MMP, hücrelerin düşük kaliteli olduklarını ve azalmış konsepsiyon oranları ile ilişkili olduklarını göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı; DNA fragmantasyonu, MMP ve semen analizi eşik değerlerinin infertil çiftlerde doğal konsepsiyonu predikte etme değeri ve bu testlerin doğal konsepsiyon ve asiste konsepsiyondaki gebe kalma başarısını belirlemede kullanılabilirliğini saptamaktır.

### **HASTALAR VE METOD:**

Çalışma 2010-2013 yılları arasında Ljubljana Üniversitesi androloji ünitesi infertilite kliniğine başvuran hastalar üzerinde yapıldı. Etik komite kararı alındı.

136 azospermik olmayan hasta çalışmaya katılmış olup; 85'i infertil, 51'i fertil erkekti. İnfertil erkekler 12-18 aylık başarısız gebelik süresine ek olarak 6-12 ay izlenmiş. Grup 1 infertil hastalar 24 ay düzenli korunmasız ilişkisi olan, eşlerinde tubal patolojisi olmayan, FSH düzeyi normal olan (11 IU/ml altı), 37 yaşın altı, endometriozisi olmayan hastalardan oluşmaktaydı. Grup 2 fertil erkekler olup eşi şu an hamile olanlardan oluşmaktaydı. Tüm çiftlerden çalışmaya katılmak istediklerine dair onam alındı. Gözlem süresinin sonunda, grup 1 konsepsiyonun varlığına göre 2 alt gruba ayrıldı. Grup 1A gebelik olmayan, 1B ise gebelik olan grup olarak adlandırıldı.

### **Standart Semen Analizi:**

Semen örnekleri 2-5 günlük cinsel perhiz sonrası toplanarak WHO kriterlerine göre değerlendirildi. Sperm konsantrasyonu  $\geq 15 \times 10^6$ /ml, ileri hareketli  $\geq 32$  ve normal morfoloji  $\geq 4$  ve üzeri ise normozoospermik (normal semen analizi) olarak yorumlanmış ve eşik değerleri istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

Saf sperm konsantrasyon gradyenti 2 basamaklı ayırma (% 40-100) ve 30 dakika santrifüj edilerek flow sitometrik olarak semen hazırlanmış, DNA fragmantasyonu ve semenin MMP değeri ölçülmüştür. 2 ml'lik sperm medyumunu 10 dakika yıkanmış ve 0,5 ml'lik süspansiyon hazırlanmıştır.

MMP; DiOC6 (3,3 dihexyloxacarbocyanine iodide)'nin ortalaması ile ölçülmüş. 37derecelik inkübatörde 20 dakika işleme maruz bırakılmış. DiOC6 tek dalga uzunluğunda emisyonuna sahip olup, yüksek floresan sinyaller normal MMP olarak atfedilmiş.

Sperm DNA fragmantasyonu TUNEL assay kullanılarak hesaplanmıştır. Taze semen konsantrasyonu  $2 \times 10^7$  hücre/ml olarak ayarlanmıştır. Semen süspansiyonu %2'lik formaldehit içindeki PBS( phosphate buffered salin) ile fikse edilip, % 0,1 triton X-100 ve % 0,1 sodyum sitrat ile boyanmıştır. PBS içinde ikinci yıkamadan sonra yeniden süspansiyon edilerek 50 ml'lik fresh sperm pelletleri hazırlanmıştır.

### **İstatistiksel Analiz:**

Bu analiz SPSS 15.0 kullanılarak hazırlandı. Tüm infertil ve fertil erkeklerdeki parametrelerin ortalama dağılım değerleri Kruskal- Wallis testi ve x2 testi kullanılarak hesaplanmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Mann- Whitney testi kullanılmıştır. Pearson korelasyonu ile DNA fragmantasyonu, MMP, sperm konsantrasyon, motilite ve morfolojisinin etkinliği saptanmıştır. Standart parametreler, DNA fragmantasyonu ve MMP arasındaki ilişkinin belirlenmesinde logistik regresyon analizi kullanılmıştır. Standart semen parametreleri ve sperm fonksiyon testlerinin eşik değerlerinin belirlenmesi için ROC analizi kullanılmıştır. Normal semen analizine ve sperm fonksiyonlarının doğal konsepsiyona etkisini göstermek için tek değişkenli ve multipl logistik regresyon analizleri kullanılmıştır. P <0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### **SONUÇLAR:**

İnfertil çiftlerin %31'i grup 1 B olup (26/85) gebe kalmış, 37 hafta sonrası doğum yapmıştır. Grup 1A'daki %69 (59/85) hasta ise spontan gebe kalamamıştır. Erkeklerin ortalama infertilite süreleri 18 ay(8-20)dır. Gebe kalan grup(grup 1B, n=26) ilave olarak ortalama 9 ay (4-16) ve diğer grup(grup 1A, n=59) 6 ay(4-12) ilave olarak izlenmiştir.

Hastaların klinik karakteristikleri, standart sperm parametreleri, DNA fragmantasyonu ve MMP düzeyleri tablo 1'de gösterilmiştir.

İnfertil ve fertil gruplar arasında varikosel, orşidopeksi hikayesi ve kadın yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmezken; erkek yaşı, standart semen parametreleri ve sperm fonksiyon testleri açısından anlamlı fark izlendi. Fertil erkeklerde(grup 2) en yüksek ortalama standart sperm parametreleri bulunmuş olup; konsantrasyon  $95 \times 10^6$  ( $2-230 \times 10^6$ ); motilite % 55(30-75), morfoloji %35(7-59) ve grup 1A-1B arasındaki tüm ikili farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ; Tablo 1). En düşük ortalama değer grup 1A'da olup değerler sırasıyla  $28 \times 10^6$ , %45 ve % 12 idi (Tablo 1, figür 1). Gebelik olan grup 1B'de ise sırasıyla  $54,5 \times 10^6$ /ml, %50 ve %15 idi. Grup 1A ve 1B arasında istatistiksel olarak tek anlamlı bulunan sperm motilitesi idi. Ortalama sperm DNA fragmantasyonu grup 1A'da istatistiksel olarak en yüksek bulunup (%31), grup 2'de %15,5 ve grup 1 B'de %18 idi. Grup 1B ve grup 2 arasındaki değerler benzerdi. Ters ama benzer bir durum MMP değerleri için de izlendi. MMP; grup 1A'da anlamlı en düşük (%50) olup, grup 2'de %74, grup 1B'de % 65,5 idi.

### **DNA fragmantasyonu, MMP ve standart sperm parametreleri arasındaki ilişki:**

İki fonksiyonel test ve standart semen parametreleri arasında anlamlı bir korelasyon izlendi. Sperm DNA fragmantasyonu ve MMP negatif korele idi ( $r = -0,69$ ;  $p < 0,001$ ). Sperm motilitesi, DNA fragmantasyonu ile ters yönde ilişkili idi. Hem sperm morfolojisi hem de motilitesi MMP ile pozitif ilişkiliydi. Çoklu logistik regresyon analizi sonrası sadece MMP, normal semen analizi ile pozitif ilişkili idi.

### **Sperm fonksiyonel testleri ve standart semen parametrelerinin eşik değerleri:**

Optimal DNA fragmentasyonu; gebe kalan grupla (20/26, % 77) ; gebe kalamayan (23/59, % 39) grupla kıyaslandığında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş. Gebe kalan 26 hastanın 17'sinde (%65,4)(grup 1 B) MMP değeri eşik değerin üzerinde ( $\geq$ %62,5) olup konsepsiyon açısından grup 1 A'da 17/59 (%28,8) yüksek olasılığa sahipti. Gebe kalan grupta 15/26 (%57,7) (grup 1B), motilite için belirlenen eşik değeri %47,5 olup ; gebe kalamayan 18/58(% 31) gruptan daha yüksek bulunmuştur. Sperm konsantrasyonu için optimal eşik değerleri olan hasta sayısı grup 1 B'de 12/26 (%46,2); grup 1A'da 11/59 (%18,6) olarak saptanmıştır. Morfoloji için optimal eşik değeri ( $\geq$ %18), grup 1B'de 12/26(%46,2); grup 1A'da 14/57(%24,6) olarak bulunmuştur.

### **Sperm fonksiyonel testleri, semen analizi ve gebe kalma yeteneği arasındaki ilişki:**

İki fonksiyonel testin normal seviyelerinin etkisi kendi içinde yada normal semen analizi ile kombine edildiğinde oldukça anlamlı bulunmuştur (Tablo 3). Kombine fonksiyonel test sonuçları normal olan erkeklerde, normal olmayan erkeklere göre konsepsiyon oranlarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur.

### **TARTIŞMA:**

Bizim çalışmamızın sonucunda erkek fertilité potansiyelinin doğal konsepsiyonu belirlemede önemli olduğu ve canlı doğum oranları açısından tek başına standart semen analizinden DNA fragmentasyonu ve MMP kombinasyonunun daha belirleyici olduğu saptanmıştır. Bizim bilgilerimize göre bu çalışma, kombine sperm fonksiyonel testleri ve daha iyi gebelik sonuçlarının belirlenmesi amacıyla yapılmış ilk çalışmadır.

Bu çalışmada; DNA fragmentasyonu, MMP ve standart sperm parametreleri önceki çalışmalarla korele idi. Normal sperm formlarıyla MMP, motilite, morfoloji arasında pozitif ilişki saptanmışken; DNA fragmentasyonu ile motilite arasında negatif ilişki görülmüştür. Ayrıca normal semen analizi ve MMP arasındaki ilişkide sperm hücre mitokondri bütünlüğünün önemini doğrulamıştır.

İç mitokondriyal membran bütünlüğünü ve sperm motilitesi fertilizasyon başarısında önemlidir. Biz çalışmamızda MMP bozulmasının konsepsiyon başarısını belirlemede negatif etkileri olduğunu saptadık. Bizim sonuçlarımız MMP için yeterli minimal eşik değeri % 64 olup daha önce rapor edilen sonuçlarla korele idi. Bununla birlikte MMP değerlerinin etkisi fertil erkeklerde hiçbir zaman komfirm edilemedi. Biz çalışmamızda MMP'nin standart semen analizine göre konsepsiyon başarısını belirlemede daha üstün olduğunu bulduk.

DNA bütünlüğü; doğal süreçlerdeki iç faktörler (kromatin paketlenmesi, başarısız apoptozis) yada dış faktörlerden dolayı olabilmektedir. Ayrıca spermin oksidatif strese duyarlılığı, MMP kaybı ile mitokondriyal membran geçirgenliğinin değişmesi, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu doğrulanmıştır. Sperm DNA fragmentasyonunda tek major etki bağlantının sağlanamaması değildir. Bununla birlikte spermdeki hasar düşük ise , oosit kendi tamir mekanizmalarını kullanarak embriyoyu koruyabilmektedir.

DNA fragmentasyonunun eşik değerleri TUNEL ile ölçülmüş olup % 4-36,5 aralığındadır (Metod için kullanılan farklı laboratuvar protokolleri nedeniyle geniş bir aralığa sahiptir). Bizim sonuçlarımız TUNEL ile ölçülen eşik değerler olan %19,25 ; %20 ve % 26 ile kıyaslanabilir.

Bizim sonuçlarımız sperm hücre fonksiyonlarının aynı anda DNA fragmentasyonu ve MMP ile doğal konsepsiyon açısından pozitif korele olduğunu göstermektedir. Her 2 testte normal değeri olan hastalar 8 kat daha fazla doğal yoldan gebe kalmakta, anormal değeri olan %80'lik bir grup ise infertil olarak sınıflandırılmaktadır.

Her ne kadar çalışmalar MMP'ye yoğunlaşsa da; sperm DNA bütünlüğü tartışmalı olarak kalmakta ve method kullanımıyla ilişkili olarak kafa karıştırmaktadır. ASRM'nin son verilerine göre, klinik yarar ancak methodun standardizasyon sonrası doğrulanmasına ve klinik olarak eşik değerlerde uygulanabilirliğine ve aynı kriterlere ulaşılabilirliğine bağlıdır.

Bizim sonuçlarımız aynı zamanda bazı belirsizliklere de sahiptir. Örnek sayısının az olması, sperm hücre biyolojisinin çeşitliliğinin kaynağının bilinmemesi ve dataların tam doğrulanamamış olması çalışmamızın tek kısıtlayıcı yanı olduğunu düşünmekteyiz.

Konsepsiyon üzerinde olumsuz faktörlerin etkisini azaltmak için ek patolojisi olmayan kadınlar çalışmaya dahil edildi. Bu da bizim en kuvvetli delilimizdi. Sonuç olarak oldukça homojen bir erkek popülasyonu üzerinde çalıştık ve diğer erkek patolojilerinin potansiyel etkisi oldukça sınırlıydı.

Bizim çalışmamızdaki gibi net olarak belirlenmiş erkek infertil grup hastalarda, bu yeni modelin oldukça önemli klinik faydaları olacağına inanmaktayız. Standart semen analizi sonuçlarına bakmaksızın bu erkeklerin kombine semen analizlerinin değerlendirilmesi, klinik kararı vermede ve başarısız teşebbüslerden korunmada etkili olacaktır. Bu gibi zamanında alınan kararlar, kost etkinite ve infertilite yönetiminde olumlu etkilere sebep olacaktır.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda DNA fragmentasyon ve MMP kombinasyonunun infertil erkeklerde değerlendirilmesinin, doğal konsepsiyonu predikte etmede standart semen analizi sonuçlarından bağımsız olarak daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bu yüzden biz erkek infertilite faktörlerinin yönetiminde bu etkenlerin düşünülmesi gerektiğine inanmaktayız.