

Spermatozodaki DNA Hasarı ve Oksidatif Stresin Önemi ve Bunların Spermioyogram Parametreleri ile İlişkisi

The Value of Oxidative Stress and DNA Damage in Spermatozoa and Their Relationship with Spermioyogram Parameters

Kaan OSMANAGAUGLU* 0000-0003-3125-8058

Alexine MESSIAEN* 0000-0002-0950-7946

Frederik MAHIEU* 0000-0002-6152-011X

Wim DECLER* 0000-0001-7676-1277

Mustafa DEMİR 0000-0002-0130-0254**

Bulent YILMAZ*0000-0002-9458-2253**

* In-Vitro Fertilisation Center, AZ Jan Palfijn Hospital, Gent, Belgium

**In-Vitro Fertilisation Center, NOVAFERTIL, Gaziantep, Turkey

***Department of Obstetrics and Gynecology, Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of Medicine, Rize, Turkey.

Yazışma Adresi: Kaan OSMANAGAUGLU

Beheerder Weefselbank, AZ Jan Palfijn Hospital,

Watersportlaan 5 9000 Gent, Belgium

e-mail: dr.kaan.osmanagaoglu@gmail.com

Öz

Amaç: İnfertilite de çözüm arayışları milattan önce 2500 lü yıllara kadar uzanmaktadır. Erkek faktörü infertilitesi olan erkeklerin %15'nin normal semen analizi vardır. Son yıllarda erkek infertilitesi için bir neden olarak gösterilen oksidatif stres ve sperm'de DNA hasarı ayrıntılı olarak incelenmeye başlanmıştır. Oksidatif stres ve reaktif oksijen radikalleri , yüksek reaktif kapasiteli oksitleyici ajanlardır. Reaktif oksijen radikalleri, endojen veya ekzojen kökenli olabilir ve kusurlu spermatogenezise ve erkekte kısırlığa neden olabilir . Artmış reaktif oksijen radikalleri; lipid peroksidasyonu ile sperm fonksiyon bozukluğuna, sperm kalitesinin düşmesine ve sperm DNA hasarına yol açabilir.

Gereçler ve Yöntem: DNA hasarını ve oksidatif stresi ölçmek için kullanımı kolay farklı tekniklere odaklanmıştır. Bu teknikler, standart bir semen analizinde uygulanabilecek en doğru ve güvenilir tekniği bulmak için karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlar ile standart bir semen analizinden elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyonlar araştırılmıştır. Bu veriler kontrol grubu, hasta grubu ve her iki grubu birleştiren üçüncü bir grupta (toplam grup) incelendi. DNA bütünlüğü beş farklı test ile incelenmiştir. HaloSperm G2, yeni Sperm DNA fragmentasyonu (SDF) kiti, Aniline Blue boyaması ve Acridine Turuncu Test kullanımı kolay tekniklerdir. DNA bütünlüğünü incelemek için altın standart olduğu için Sperm Kromatin Yapı testi (SCSA) de dahil edildi. Bu çalışma DNA hasarını ve oksidatif stresi ölçmek için kullanımı kolay farklı tekniklere odaklanmıştır.

Bulgular: HaloSperm G2'nin tüm gruplara göre diğer testlerden anlamlı derecede yüksek sonuçlar verdiğini saptadık (p <0.05). SDF kiti farklı gruplardaki çoğu testle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük sonuçlara sahipti (p <0.05). HaloSperm G2, SCSA'dan önemli ölçüde farklı olmayan tek tekniktir. Toplam hareketli sperm ile HaloSperm G2 arasında negatif bir ilişki bulundu.

Sonuç: HaloSperm G2, SCSA'dan önemli ölçüde farklı olmayan, kullanımı kolay tek testtir, böylece bir semen analizinde kullanmak için en iyi seçimdir. Resazurin redüksiyon testi oksisperm'den daha iyi bir testtir, çünkü kullanımı daha kolaydır, renk şemasında daha geniş bir aralığa sahiptir ve bir spektrometre üzerinde kolayca incelenir.

Anahtar Kelimeler: Semen analizi, DNA fragmentasyonu, oksidatif stres, halosperm G2 test, resazurin redüksiyon testi

Abstract

Aim: Increased reactive oxygen radicals can lead to sperm dysfunction, decreased sperm quality and sperm DNA damage by lipid peroxidation. Aim of this study was to investigate oxidative stress and DNA damage in spermatozoa and their relationship with spermioqram parameters.

Materials and Method: This study focuses on different easy-to-use techniques for measuring DNA damage and oxidative stress. These techniques have been compared in order to find the most accurate and reliable technique that can be applied in a standard semen analysis. In this study, the correlations between the results obtained from the tests and those obtained from a standard semen analysis were investigated. These data were analyzed in the control group, the patient group, and a third group (total group) combining both groups. DNA integrity was examined using five different tests. HaloSperm G2, the new Sperm DNA fragmentation (SDF) kit, Anilin Mavisi Boyaması, and Acridine Turuncu Test are easy-to-use techniques. Sperm Chromatin Structure assay (SCSA) was also included as it was the gold standard for examining DNA integrity. This study focuses on different easy-to-use techniques to measure DNA damage and oxidative stress.

Results: HaloSperm G2 gave significantly higher results than other tests when all groups were compared ($p < 0.05$). The SDF kit was shown to have significantly lower results compared to most tests in different groups ($p < 0.05$). The HaloSperm G2 was the only technique that was not significantly different from SCSA. A negative correlation was found between total motile sperm count and HaloSperm G2.

Conclusion: HaloSperm G2 is similar to standart SCSA test for DNA damage and oxidative stress analysis; thus, it is ideal test for semen analysis. Moreover, resazurin reduction test better than oxisperm test since it was easy-to-use.

Keywords: Semen analysis, DNA fragmentation, oxidative stress, halosperm G2 test, resazurin reduction test

Giriş

İnfertilite de çözüm arayışları milattan önce 2500 lü yıllara kadar uzanmaktadır(1). İnfertilite, çiftlerin bir yıldan fazla sürede düzenli ilişkilerine rağmen gebelik oluşmaması olarak tanımlanır (2). Bu çiftlerin yaklaşık %10-25'i gebe kalma gücünü çekmektedir (3). Erkek faktörü infertilitesi olan erkeklerin %15'nin normal semen analizi vardır ve %10 ila 30'unda infertilite idiyopatiktir (4).

Yapay üreme teknikleri'nin (ART) geliştirilmesi infertilite sorunları olan çiftlere çocuk sahibi olma olanağını sağladı. Yapay dölleme, 1770'lerden elimize ulaşan ilk belgelere göre 200 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır (5). Gebe kalmak için başvuran infertil çiftlere yardımcı olmak için farklı teknikler geliştirilmiştir. Kullanılacak tekniği çoğu zaman semen kalitesi belirler. Son yıllarda erkek infertilitesi için bir neden olarak gösterilen oksidatif stres ve sperm'de DNA hasarı ayrıntılı olarak incelenmeye başlanmıştır.

Oksidatif stres ve reaktif oksijen radikalleri (ROS), yüksek reaktif kapasiteli oksitleyici ajanlardır. ROS, endojen veya ekzojen kökenli olabilir ve kusurlu spermatogenez ve erkekte kısırlığa neden olabilir (6). Artmış ROS; lipit peroksidasyonu sperm fonksiyon bozukluğuna, sperm kalitesinin düşmesine ve sperm DNA hasarına yol açabilir(7). Oksidatif stres ve ROS, spermin fertilizasyon potansiyelini değiştirebilen DNA, RNA, proteinlere ve lipitlere zarar verebilir(8,9,10). Sperm DNA'sının koruyucu sıkı paketlenmesine rağmen, deoksiribonükleik asit bazları ve fosfodiester omurgalar peroksidasyona açıktır (11). Bununla birlikte, DNA bütünlüğündeki defekt ile zayıf sperm morfolojisi arasındaki ilişki tespit edilemeyebilir (12,13).

DNA hasarına apoptoz, enfeksiyon, spermiyogenez defekti ve oksidatif stres sebep olabilir(14). DNA hasarı defektif apoptoz sonucu olmasından çok genelde oksidatif stres kaynaklıdır. Oksidatif stresin DNA hasarına; bazların değişimi, boş baz alanları oluşumu, silinme, çerçeve kayması, çapraz bağlantılar ve kromozomal değişim neden olabilmektedir. Ayrıca, tek veya çift DNA sarmalındaki kırıkların sık tekrarlama da oksidatif stres ile ilişkilidir. Artmış ROS seviyesi, DNA kırılmalarında artış ve DNA metilasyonunda azalmaya neden olabilir ve bunlara ek olarak nokta mutasyonlar, polimorfizm gibi semen kalitesini düşüren mutasyonlar da yapabilir. Yüksek ROS seviyelerine sahip infertil erkeklerin fertil olanlara göre daha fazla kromozomal kırık taşıdığı gösterilmiştir (15-19).

Spermatozodaki DNA bütünlüğü DNA'nın sağlamlığını temsil eder. İyi bir DNA bütünlüğü, eksik baz veya değişiklik olmaksızın çift sarmallı bir helezon olduğu anlamına gelir. Bütünlük iyiyse, örneğin ısı veya aside maruz kalındığında sperm DNA'sı daha az kırılabilir olacaktır. DNA yapısı, DNA bütünlüğünde düşüklük olduğu zaman zarar görme potansiyeline sahiptir (20). Spermatogenez sırasında, sarmal bazları kaybedebilir veya başka DNA hasarı veya mutasyonları elde edebilir. DNA, ısı ve asit ile kolayca zarar görebilir, aynı zamanda oksidatif stres, parçalanmış DNA'yı ve düşük DNA bütünlüğünü tetikleyebilir (21,22,23). Parçalanmış DNA, her iki ipliğin parçalara ayrıldığı bir tür DNA hasarıdır.

Oositlerden farklı olarak, spermatozoanın spermatogenez veya olgunlaşma sırasında edinilen DNA hasarını onarabilmek için bir mekanizması yoktur. Bununla birlikte oosit, spermatozodaki DNA hasarını bir dereceye kadar azaltabilir (24). Onarım mekanizmasının yeteneği oositin kalitesine ve DNA hasarının türüne bağlıdır. DNA hasarı yüzde sekiz eşliğini aştığında onarım eksik veya uygunsuz olabilir (22). Oositi bağlamak, döllenmeyi başlatmak ve embriyoyu geliştirmek için sperm DNA'sının kalitesi önemlidir (25). Kromatinin bütünlüğü böylece doğurganlık potansiyelini yansıtır ve gebe kalma başarısı ve zamanı için öngörücü olabilir (26). DNA kalitesi Sperm Kromatin Yapısı Testi (SCSA), (2,26,27,28,29), sperm kromatin fragmentasyon testi (SDF) (21), halosperm (30,31), fertipro, Anilin Mavisı Boyaması test (ABS)(32,33), spermatozoa da oksidatif stres (35,36), Oksisperm (4), rezazurin redüksiyon analiz testi (37,38) gibi çeşitli tekniklerle değerlendirilebilir; ancak, döllenme potansiyelinin tahmini kullanılan teste, DNA hasarının nedenine ve DNA fragmentasyonunun derecesine bağlıdır (23,27). Arızalı DNA'ya sahip spermatozoa oositi döleyebilir. Bir oositin parçalanmış DNA içeren sperm ile fertilizasyonu kaliteli embriyolar verebilir, ancak düşük yapma riskini artırır (2). Birçok çalışma, DNA hasarının daha düşük spermatozoa motilitesi, bozulmuş spermatozoa-oosit füzyonu, bozulmuş embriyo bölünmesi, bozulmuş blastosist oluşumu ile ilişkili olduğunu ve bunun sonucunda daha düşük bir implantasyon oranı, daha düşük embriyo kalitesi, daha yüksek abortus oranı ve genel olarak daha düşük bir döllenme oranı ile sonuçlandığını belirtmiştir (22,24,28).

Bu çalışmanın amacı, spermatozodaki oksidatif stres ve DNA hasarını araştırmak ve bunların spermogram parametreleri ile ilişkisini ortaya koymaktır.

Gereçler ve Yöntem

Çalışmaya AZ Jan Palfijn Gent/Belçika yerel etik kurulundan onay alındıktan sonra başlanmıştır. Çalışma Az Jan Palfijn hastanesi tüp bebek merkezine IVF/ICSI için başvuran 32 erkek hastadan ve çalışmayı kabul eden daha önceden infertilite problemi olmayan sağlıklı olduğu düşünülen 31 erkek gönüllüden oluşmuştur. Çalışmadaki gönüllülerimiz 18 yaşından büyük ve çalışmaya katılım onayı veren kişilerden oluşmaktadır. Çalışmaya iki grup dahil edilmiştir. Bu iki grubun hepsinin dahil edildiği 3. bir grup da oluşturulmuştur. Helsinki Bildirgesi kurallarına sadık kalınmıştır.

Semen hazırlanması, kontrol grupları ve hasta grubundan bu çalışma için bir örnek vermeden önce üç günlük cinsel perhiz yapmaları istendi. Sperm alındıktan sonraki 1. saat içinde rutin bir semen analizi yapıldı. Konsantrasyon ve hareketlilik, parlak bir alan mikroskobu altında bir Makler® sayma odası kullanılarak belirlendi. Morfoloji 0.5 ml menide spermatozoanın Spermac boyası (SPS050; FertiPro, Beernem, Belçika) kullanılarak değerlendirildi. Numune 5 dakika sabitlendi, ardından üç boyama adımı (her 1 dakikada bir) takip edildi: İlk olarak çekirdeği kırmızıya boyayan çözelti, ekvatorial bölgeyi boyayan ikinci bir çözelti, soluk yeşil ve akrozomu koyu yeşile boyayan üçüncü bir çözelti kullanıldı.

Spermatozoalar Tygerberg strict kriterlerine göre değerlendirildi. Rutin analizden sonra, meni FertiPro yıkama ortamı (FLUSH100; FertiPro, Beernem, Belçika) ile 20×10^6 spermatozoa / ml konsantrasyonuna seyreltildi, ikinci bir kısım 50×10^6 spermatozoa / ml konsantrasyonuna seyreltildi, üçüncü bir kısım 1:1 dilüsyon ve dördüncü bir kısım seyreltilmeden kaldı.

A) DNA bütünlük analiz testleri;

A1) HaloSperm G2;

HaloSperm G2, Halotech DNA (HT-HSG2; Selinion Medical, BM 's-Hertogenbosch, Hollanda) tarafından sağlanan ticari bir kittir. Bu test, numune oluşturulduktan sonraki 3 saat içinde gerçekleştirildi. Üreticinin talimatları doğrultusunda, 100 µl agaroz 95°C 'de eritildi ve beş dakika 37°C 'de yerleştirildi. Agaroz karıştırıldı seyreltilmiş numunenin ilk fraksiyonunun 50µl'si ile (20×10^6 spermatozoa/ ml). Bu karışımın sekiz mikrolitresi, kit ile sağlanan bir mikroskop lamı üzerine yerleştirildi. Lam bir lamel ile kapatıldı ve 5 dakika 4°C 'de konuldu. Daha sonra lamel çıkarıldı ve denatüre uygulanmış fragmanlı DNA'ya 7 dakika boyunca lam üzerinde denatüre solüsyonu uygulandı. Bu solüsyon, lamin eğimli tutulmasıyla solüsyonun atılması sağlandı ve tüm sperm proteinlerini ve zarlarını çıkarmak için 20 dakika boyunca bir lizis çözeltisi uygulandı. Lizis çözeltisi çıkarıldıktan sonra, lam denatüre % 70 su ve % 100 etanol ile durulandı. Birinci boyama lama 10 dakika ilave edildi, ardından birinci boyama atıldıktan sonra ikinci boyama eklendi. Bu ilave bir 10 dakika daha yapıldı. Bu çift boyama, sperm başındaki parlak alan mikroskobu altında görünür hale gelen DNA'yı renklendirdi. Denatürasyon ve lizis nedeniyle, parçalanmış DNA'sı olmayan spermatozoalar haleler olarak görünür hale gelen DNA döngüleri oluşturur. DNA parçalanmışsa, ilmek oluşmaz ve sonuç olarak halo görülmez. Beş yüz spermatozoa değerlendirildi. Büyük bir hale veya orta boy bir hale görünürse, DNA parçalanması için negatif olarak sayıldı. Küçük bir hale görünürse veya spermatozoonda hiç halo yoksa, DNA parçalanması için pozitif olarak sayılır. Bozulmuş spermatozoa da DNA fragmentasyonu için pozitif olarak sayıldı. SDF, bozulmuş sperm de dahil olmak üzere DNA hasarı olan sperm yüzdesini gösterir. Üreticinin talimatlarına göre bu eşik % 27 olarak belirlendi.

A2) FertiPro SDF kiti;

FertiPro, piyasada satışa sunulacak yeni geliştirilmiş bir SDF kitine sahiptir. Bu kit HaloSperm G2 ile kıyaslanabilir. SDF testi, numune alındıktan sonra 3 saat içinde gerçekleştirildi. Üreticinin talimatlarını takiben, agaroz 95°C 'de eritildi ve 5 dakika boyunca 37°C 'ye konuldu. Bir jelbond film kesildi ve hidrofilik tarafı yukarı bakacak şekilde bir mikroskop lamı üzerine yerleştirildi. Agaroz, bir meni örneğinin (20×10^6 spermatozoa / ml) ilk fraksiyonundan 25 µl ile karıştırıldı. Bu karışım, 20 ul, jelbondun hidrofilik tarafına aktarıldı ve üstüne bir lamel konuldu. Lam daha sonra karışımın jelleşmesine izin vererek 5 dakika boyunca 4°C 'ye yerleştirildi. Lamel çıkarıldı ve jelbond mikroskop lamından ayrıldı. Jelbond daha sonra kitle birlikte sağlanan bir kasete konuldu. Bu kaset, 8ml lizis çözeltisi ve 2ml lizis çözeltisi katkısı 10 dakika süreyle inkübasyonda lizis için bekletildi.

Daha sonra kaset, 5 dakika boyunca bir denatürasyon çözeltisine aktarıldı, ardından 5 dakikalık bir yıkama aşaması alındı. Daha sonra kaset, her biri 2 dakika boyunca % 70, % 90 ve % 100 etanol içine yerleştirilerek kurutuldu. Jelbond çıkarıldı ve boyama çalışmasına yerleştirildi 5 dakika boyunca 0.5ml boya çözeltisi, 4.75 ml boya seyreltme tamponu ve 4.75 ml su ihtiva eden çözelti. Daha sonra jelbond beş kez suya batırıldı ve kurumaya bırakıldı. Parlak alan mikroskobu altında açık veya orta mavi renkte olan hücreler DNA fragmentasyonu için negatif, koyu mavi hücreler pozitif olarak sayıldı. Karanlık bir hücrenin açık bir lekesi varsa, negatif olarak sayıldı. Mikrosefali içeren spermatozoa, bozulmuş hücreler gibi pozitif olarak sayıldı. % SDF, pozitif hücre miktarının toplam spermatozoa * 100 miktarına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Toplamda 500 spermatozoa değerlendirildi. Üreticinin talimatlarına göre % 25'lik bir eşik değeri belirlendi. **A3) Anilin mavisikle boyama;**

Numunelerin toplanmasından sonraki 3 saat içinde, numunenin ikinci fraksiyonunun (50 x 10⁶ spermatozoa / ml) 5 µl'si bir lam üzerine konuldu ve kurumaya bırakıldı. Lam daha sonra Na₂HPO₄ ve NaH₂PO₄ (SIALG5882-50ML; VWR International, Leuven, Belçika) içinde 30 dakika süreyle Na₂HPO₄ ve NaH₂PO₄ (SIALS7907-100G + SAFSS5011-100G; VWR International, Leuven'den oluşan bir 0.2M fosfat tamponu içinde sabitlendi. , Belçika). Sabitlemeden sonra, lam % 4 asetik asit (VWRC20104.243; VWR International, Leuven, Belçika) ile % 5 sulandırılmış anilin mavisini (VWRC21999.183; VWR International, Leuven, Belçika) içinde 5 dakika süreyle boyandı. Normalde olgunlaşmış spermatozoa renksiz veya açık mavi görünürken, olgunlaşmamış spermatozoa veya olgunlaşma sorunları olan spermatozoa koyu mavi boyalıdır. Beş yüz spermatozoa parlak bir alan mikroskobu altında sayıldı. Hammadde ve arkadaşlarına göre % 25 bir eşik değeri belirlenmiştir (32).

A4) Akridin Turuncu Testi;

Üç saat içinde, 10µl ikinci örnek fraksiyonu (50 x 10⁶ spermatozoa / ml) ile bir boyama yapıldı ve lam 20 dakika kurumaya bırakıldı. Daha sonra, üç parça metanol (HONC34860-2.5L19 R; VWR International, Leuven, Belçika) ve bir kısım glasiye asetik asit (VWR International, Leuven, Belçika) içeren en az 4 saat süreyle Carnoys çözeltisine sabitlendi. Boyama çözeltisi iki aşamada hazırlandı. İlk olarak, 500 ml damıtılmış su içinde 0.5 g akridin portakalından (SIALS318337-1G; VWR International, Leuven, Belçika) bir stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra, bu stok çözeltisinin 10ml'si 40ml 0.1M sitrik asit (SIALS251275-5G; VWR International, Leuven, Belçika) ve 2.5ml 0.3M Na₂HPO₄ • 7H₂O (SIALS2429-250G; VWR International, Leuven, Belçika) ile karıştırıldı. Lam, damıtılmış su ile yıkanmadan önce 5 dakika boyunca bu çözeltiye daldırıldı. Lam kurutulmadan önce bir lamel uygulanmış ve şeffaf bir oje ile kapatılmıştır.

Floresan mikroskop altında yeşil renk veren hücreler DNA hasarı olmadan çift zincirli DNA içerir. Kırmızı renkte olan hücreler, tek iplikçikli DNA içerir. DNA hasarı. Toplam 500 spermatozoa değerlendirildi (39). **A5) Sperm Kromatin Yapı Deneyi;**

İki yüz ila 1000µl üçüncü fraksiyon (1: 1 seyreltme) sıvı azot içinde saklandı. SCSA testinin yüksek maliyeti nedeniyle, HaloSperm G2, SDF kiti, Anilin Mavisini Boyaması veya Acridine Turuncu Test ile DNA hasarı için pozitif bulunan on iki numune seçildi ve kör değerlendirme için Danimarka'nın Kopenhag'daki SPZ laboratuvarına gönderildi. Dondurulmuş numuneler, 37 ° C'lik ılık su banyosunda çözündürüldü. Denatüre fragmente DNA'ya asit-deterjan çözeltisi ilave edildi. Otuz saniye sonra spermatozoayı boyamak için akridin turuncusu ilave edildi. 3 dakika sonra 488 nm'lik dalga boyuna sahip Floresansla aktive edilen hücre sınıflandırması (FACS) kullanılarak 5000 spermatozoanın floresansı ölçüldü. FACS, renklerine göre spermatozoa (yeşil ve yeşil olmayan). Bu, parçalanmış DNA'ya sahip hücrelerin yüzdesini verir ve % DFI ile sonuçlanır (26).

B) Oksidatif stres testleri

B1) Oksisperm;

3 saat içinde Oksisperm kitinden alınan jel 95°C'de 5 dakika eritildi ve daha sonra üreticinin talimatları izlenerek 37°C'ye soğutuldu. Jel, numunenin dördüncü fraksiyonu (seyreltilmemiş) ile 1:1 oranında karıştırıldı. Karıştırılacak jel ve semen hacmi; numunenin konsantrasyonu bin ile bölünerek hesaplandı. Karışım, önce 5 dakika boyunca 4°C'ye ardından 45 dakika boyunca 37°C'ye koyuldu. Bu reaksiyon süresi boyunca, nitro blue tetrazolium içeren jel, semen örneğindeki süperoksit anyonları ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon formazan adı verilen mavi kristaller oluşturur. Bu kristaller hücrelerden serbest bırakılır ve süspansiyona pembe-mor renk verir. Elde edilen renkler bir renk şeması ile karşılaştırılır. Jel süspansiyonu, karışımın 5 ila 10 saniye boyunca 95°C sıcak su banyosuna konulmasıyla sıvılaştırılır. Sıvılaştırılmış jel daha sonra bir spektrometre ile 610 nm'de değerlendirildi. Oksidatif stresli olmayan ve olan numuneleri sırasıyla göstermektedir.

B2) Resazurin redüksiyon testi;

Protokolü takip ederek; 3 saat içinde, her mililitre seyreltilmemiş semen (dördüncü fraksiyon) için 25 ul resazurin ilave edildi. Bu, 0.5ml semen de 12.5µl resazurin ile sonuçlandı. Karışımı içeren tüp, sıcak su (46 ° C-48 ° C) ile plastik bir kaba konuldu. Bir saat sonra sıcaklık 32 ° C-34 ° C'ye düşürüldü. Bu süre zarfında resazurin, NADH ve H + ile reaksiyona girerek resorufin oluşturur. Bu, maviden pembeye bir renk değişikliğine neden olur. Daha sonra, renk değişikliğini indüklemek için karışım vortekslenildi. Oluşan renk, renk şeması ile karşılaştırıldı ve 610 nm'de spektrometre ile ölçüldü. Bu, spermatozoanın metabolik aktivitesinin ve oksidatif stresin dolaylı bir bulgusunu verdi.

Oksidatif stres ne kadar yüksek olursa, metabolik aktivite o kadar düşük ve çözelti o kadar mor olur. Sırasıyla oksidatif stresli olmayan ve olan numuneleri göstermektedir. İstatistiksel analiz için SPSS (versiyon 24) Two-way Anova kullanılmıştır. Two-way Anova, iki bağımsız değişkeni (teknik tekrar / teknik) bağımlı bir değişkenle (SDF veya oksidatif stres) karşılaştırır. Sonuçlar bir dağılımda gösterilir. Bu grafikte bir R2 görüntüleyen uygun bir hat bulunmaktadır. Mükemmel doğrusalık ve analiz içi değişkenlik $R^2 > 0.75$ 'te bulunur. R2, 0.64 ile 0.75 arasındaysa, iyi bir tahlil içi değişkenliği bulunur. 0.42 ve 0.64 arasındaki R2 zayıf bir test içi değişkenliği gösterir ve $R^2 < 0.42$ test içi zayıf değişkenliği gösterir.

Veriler, kutu grafiklerde gösterilen ortalama değerler +/- standart sapma olarak ifade edildi. DNA parçalanması için sayılan değerler, DNA kutu grafikleri için kullanıldı. Bu kutu grafiklerinde yüzdelere daha güvenilir bir genel bakış sağlamak için kullanılmamıştır. Kutu grafiği oksidatif stres için renk şemalarının kategorik değerleri ile yapılmıştır. Resazurin redüksiyon testi daha fazla seviyeye sahip olduğundan, karşılaştırmaya izin vermek için bunlar dört seviyeye dönüştürülmüştür. Kategoriler bir ila dört arasında değişiyordu, bunlardan biri oksidatif stres olmadığını ve dört tanesi yüksek oksidatif stres olduğunu gösteriyor. Sonuçlar SPSS yazılımı kullanılarak iki yönlü Anova ile analiz edildi. Anlamlılık, en az % 80 istatistik gücü ile $P < 0.05$ 'e ayarlandı.

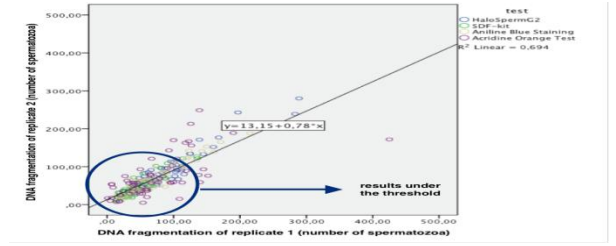
İncelenen teknikler ile standart semen parametreleri arasındaki korelasyonlar 'iki değişkenli korelasyon' kullanılarak SPSS kullanılarak araştırılmıştır. Pearson korelasyonu 0,5'ten yüksek veya -0,5'ten düşükse, $P < 0,05$ ile, incelenen iki parametre arasında sırasıyla bir korelasyon veya negatif korelasyon bulundu. SDF yüzdeleri değiştirilmiş sonuçları en aza indirmek için kullanılır. Bunun yerine, sayılan değerler kullanıldı. Oksidatif stres değerleri için renk şeması ve spektrometre değerleri dikkate alınmıştır. Spektrometrenin değerleri, Oksisperm'in (A610nm) emilim değerlerini, bir numune ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$) ile reaksiyona girdikten sonra resazurin konsantrasyonunu ve resazurin (A610nm) emilimini içeriyordu.

Bulgular

A) DNA bütünlüğü

Tahliller içi değişkenlik (Intra-assay)

Tüm testler için teknik tekrar 1 ve 2'nin sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Bu, Şekil 1'da gösterildiği gibi her test için iyi bir tahlilin olduğu anlamına gelir. Teknik kopyalar arasında bir regresyon çizgisi gösterilir. Çoğu numune bu çizgi etrafında hizalanır iyi bir test içi ve tekrarlanabilirlik gösterir.



Şekil 1: Tahliller içi değişkenlik. Verilen numunenin teknik kopyası 1 ve teknik kopyası 2 üzerindeki DNA bütünlüğü deneylerinin sonuçları arasındaki regresyon çizgisi ile korelasyonu. Çoğu örnek, iyi bir korelasyon ve iyi bir analiz içi olduğunu gösteren regresyon çizgisi etrafında hizalanır. Daha yüksek sonuçlar, eşğin altındaki sonuçlardan daha fazla değişir. Bu, orta yüksek ancak ideal olmayan R2 ile doğrulanır.

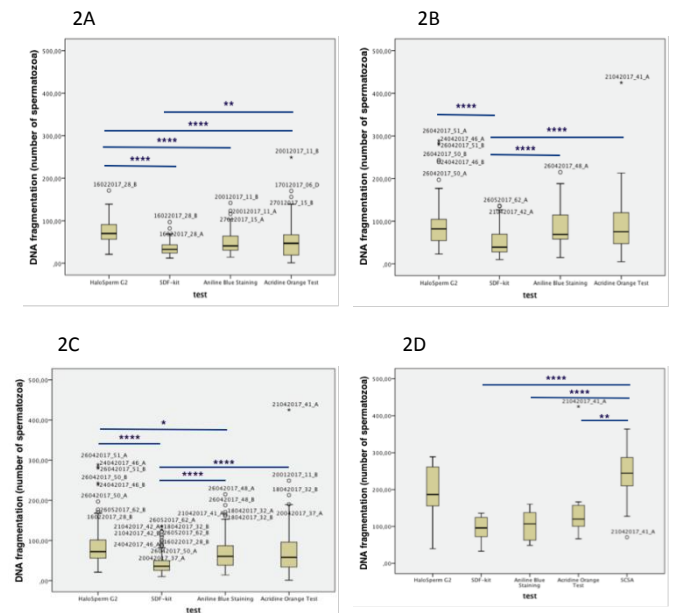
Tahliller arası değişkenlik (Inter-assay)

Şekil 2, DNA fragmentasyon sonuçlarına genel bir bakış vermektedir.

Kontrol grubunda, HaloSperm G2 ile elde edilen sonuçlar, kullanımı kolay diğer testlerden anlamlı olarak daha yüksektir (SDF kiti ve Anilin Mavi Boyama için $p < 0.001$ ve Akridin Turuncu Testi için $P = 0.007$). SDF kitinin sonuçları, Anilin Mavi Boyama haricinde önemli ölçüde daha düşüktür (HaloSperm G2 için $p < 0.001$, Akridin Turuncu Testi için $P = 0.022$) (Şekil 2A).

Hasta grubu (Şekil 2B) ve toplam grupta (Şekil 2C), SDF kiti sonuçları diğer tüm testlerden anlamlı olarak daha düşük olan tek kitledir ($p < 0.001$). Toplam grupta, HaloSperm G2'den elde edilen sonuçlar SDF kiti ve aniline mavisi boyaması sonuçlarından önemli ölçüde farklıdır (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p = 0.046$) (Şekil 2C).

HaloSperm G2, altın standart SCSA'dan önemli ölçüde farklı sonuçları olmayan, kullanımı kolay tek testtir (Şekil 2D)

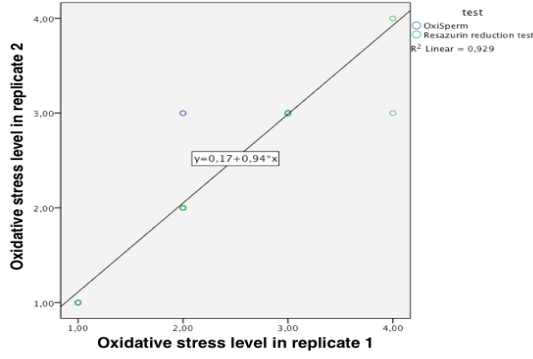


Şekil 2: DNA bütünlük testleri. 2A: Hasta grubuna göre daha düşük DNA fragmentasyonuna sahip kontrol grubu. 2B: Hasta grubu. 2C: Karışık grup. 2D: SCSA sonuçlarına kıyasla toplam gruptan sonuçlar.

B) Oksidatif stres

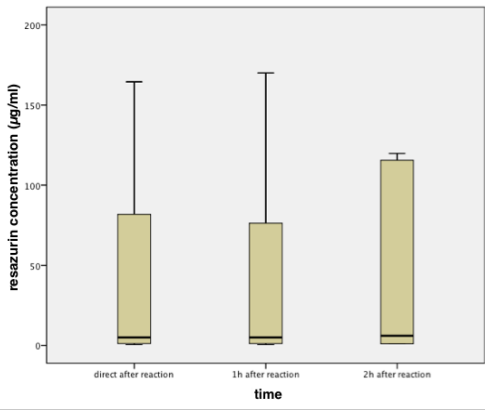
Tahliller için değişkenlik (Intra-assay variability)

Her iki oksidatif stres testi de test için iyi değişkenliğe, dolayısıyla tekrarlanabilirliğe sahiptir. Bu kontrol grubunda, hasta grubunda ve toplam grupta ölçüldü. Bu, Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3: Oksidatif stresin test için değişkenliği. Hemen hemen tüm noktalar, üst üste binen hat üzerinde hizalanır. R2 neredeyse idealdir.

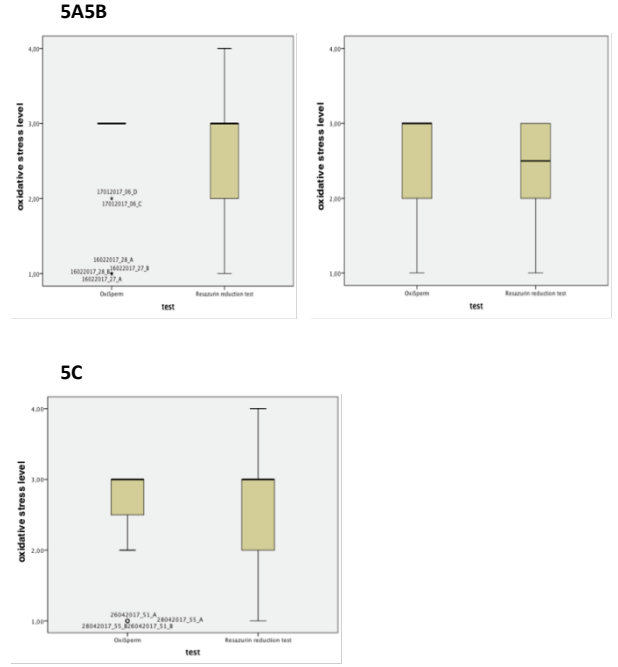
Spektrometre ile sonuçlar reaksiyon gerçekleşikten bir saat sonra elde edildi. Bu gecikmenin sonuçlar üzerinde bir etkisi olmamıştır, çünkü numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra reaksiyon sona ermiştir. Bu dokuz örnekle test edildi. Her numune, reaksiyon gerçekleştikten hemen sonra, bir saat sonra ve iki saat sonra renk şeması ve spektrometre ile ölçüldü. Şekil 4'de gösterildiği gibi istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4: Resazürin redüksiyon testi. Numuneler (n = 9) reaksiyondan hemen sonra, 1 saat sonra ve 2 saat sonra renk şeması ve spektrometre ile ölçüldü. Bu zaman dilimi içerisinde istatistiksel farklılık bulunmadı.

Sonuçlar arası değişkenlik (Inter-assay variability)

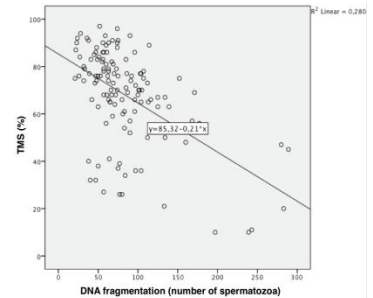
Her iki testten elde edilen sonuçlar arasında, testler arası değişkenliğin iyi olduğunu gösteren anlamlı bir fark yoktu. Bu kontrol grubunda, hasta grubunda ve toplam grupta ölçüldü (Şekil 5).



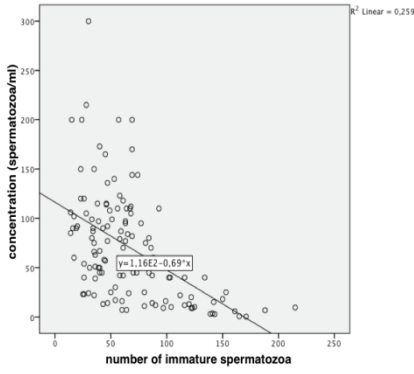
Şekil 5: Oksidatif stres. 5A: Hasta grubundakine benzer sonuçlar gösteren kontrol grubu. 5B: Hasta grubu. 5C: Toplam grup. Oksisperm ve Resazürin redüksiyon testi arasında istatistiksel fark yoktur.

C) DNA bütünlük testleri, oksidatif stres testleri ve standart semen parametreleri arasındaki ilişki

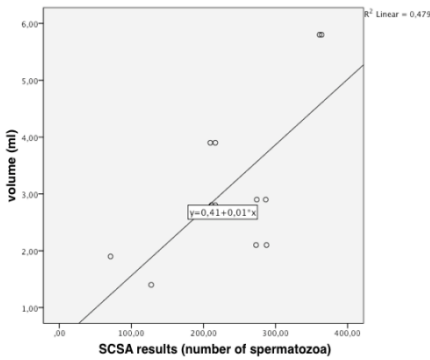
HaloSperm G2 ve SDF kitinin sonuçları birbirleriyle ilişkilidir ($r = 0,688$, $p < 0,001$) ve toplam hareketli sperm ile ters korelasyona sahiptir (sırasıyla $r = -0,589$ ve $r = -0,527$, $p < 0,001$). Şekil 6, HaloSperm G2 sonuçları ile toplam hareketli sperm arasındaki korelasyonu göstermektedir. Anilin mavisi boyama ve akridin turuncu test sonuçları da birbirleriyle korelasyon gösterir ($r = 0,629$, $p < 0,001$) ve anilin mavisi boyanması sonuçları konsantrasyon ile negatif korelasyon gösterir ($-0,526$, $p < 0,001$). Şekil 7, anilin mavisi boyanma sonuçları ve konsantrasyon arasındaki korelasyonu göstermektedir. SCSA sonuçları, semen örneğinin hacmi ($r = 0,692$, $p = 0,050$) (Şekil 8) ve HaloSperm G2'nin sonuçları ($r = 0,956$, $p < 0,001$) ile ilişkilidir (Şekil 9).



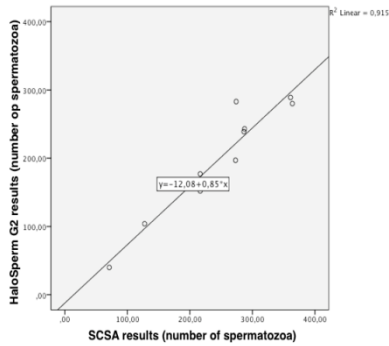
Şekil 6: HaloSperm G2 ile ölçülen DNA fragmentasyonu ve TMS arasında ters korelasyon.



Şekil 7: Anilin Mavisi Boyanması ile ölçülen olgunlaşmamış spermatozoa sayısı ile konsantrasyon arasında negatif korelasyon.



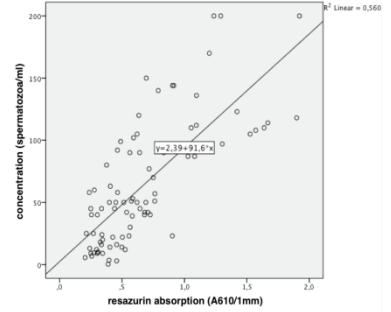
Şekil 8: SCSA sonuçları ile bir meni örneğinin hacmi arasındaki korelasyon.



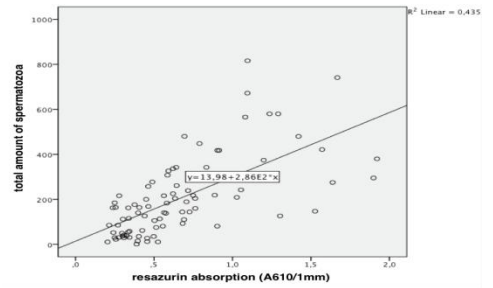
Şekil 9: SCSA sonuçları ile HaloSperm G2 sonuçları arasındaki korelasyon.

Renk tablosundan Oksisperm sonuçları ile standart parametreler arasında korelasyon bulunmadı. Bununla birlikte, rezazurin azaltma testi renk şemasından elde edilen sonuçlar, Oksisperm'in emilimi ($r = -0.666$, $p < 0.001$), rezazurin emilimi ($r = -0.530$, $p < 0.001$) ve rezazurin konsantrasyonu ($r = -0.508$, $p < 0.001$). Spektrometrenin sonuçları konsantrasyonla (Oksisperm absorpsansı ve rezazurin konsantrasyonu için $r = 0.738$, rezazurin absorpsansı için $r = 0.748$) ve Rezazurin azaltma testi için toplam spermatozoa sayısı ile korelasyon gösterdi (rezazurin emilimi için $r = 0.0658$, rezazurin konsantrasyonu için $r = 0.649$, $P < 0.001$). Şekil 10 ve 11, sırasıyla rezazurin emilimi ve konsantrasyonu ile rezazurin emilimi ve toplam spermatozoa sayısı arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Bu sonuçlar da birbiriyle korelasyonlu idi (Oksisperm absorpsansı ve rezazurin arasında $r = 0.783$) absorpsansı ve Oksisperm absorpsansı ve rezazurin konsantrasyonu arasında, $r = 0.997$ rezazurin absorpsansı ve rezazurin konsantrasyonu arasında, $p < 0.001$).



Şekil 10: Bir spektrometre ile ölçülen rezazurin emilimi ve konsantrasyon arasındaki ilişki.



Şekil 11: Bir örnekte rezazurin emilimi ile toplam spermatozoa miktarı arasındaki korelasyon.

Tartışma

Bazı infertilite hastalarında profesyonel yardım ve iyi standart semen parametreleriyle bile gebelik elde edilemez. Bu nedenle, spermde DNA hasarı ve oksidatif stres gibi yeni parametreler araştırılmıştır. Bu çalışmamızda, bahsi geçen parametreleri spermde saptayabilmek ve en güvenilir testi belirlemek için birbirinden farklı kullanımı kolay olan testler karşılaştırılmıştır.

DNA bütünlük testlerinin sonuçları hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksekti. Tüm DNA bütünlük testleri için benzer eşikler kullanıldı. Bu testler ve test içi değişkenliğe ve tekrarlanabilir güvenilirliğe sahipti. Sonuçlar ne kadar yüksek olursa, teknik kopya 1 ve teknik kopya 2 arasında o kadar farklı olurlar. Benzer eğilim Evenson ve ark. Akridin turuncu Testini tartıştıklarında (2), bir numunede % 20'den fazla DNA parçalanması olduğunda hassasiyetin düştüğünü gördüler. Bulunan sonuçlarda monte edilen hat iyidir, ancak ideal bir monte edilmiş hat 45 ° eğime sahip olacaktır. Bu DNA parçalanma testleri arasında daha önce hiç bir karşılaştırma yapılmamıştır.

Bununla birlikte, SCSA sonuçları ile HaloSperm sonuçları arasında veya SCSA sonuçları ile TUNEL veya Comet testi gibi diğer test sonuçları arasında karşılaştırmalar yapılır (26,40). HaloSperm G2'nin hem kullanımı hem de sonuçlarının yorumlanması kolaydı. Sonuçların yorumlanması için eğitimin gerekli olduğu SDF kitinde durum böyle değildi, ancak testin kullanımı kolaydı. FertiPro'nun bu kiti daha önce hiç çalışılmadı, çünkü henüz piyasada mevcut değildi. Anilin Mavisi Boyaması'nın kullanımı da kolaydı, ancak bazı durumlarda olgun ve olgunlaşmamış spermatozoa arasında net bir fark göstermedi. Bu, aşırı veya az tahmin edilmesine yol açabilir. Anilin mavisi boyaması farklı proteinleri (lizin bakımından zengin histonlar) ölçmesine rağmen, bu testin değerleri DNA fragmentasyon testleri ile karşılaştırılabilir. Akridin Turuncu Testinin sonuçlarını da yorumlamak kolaydı, ancak bu testin dezavantajı, lamaların sıklıkla lekelenmeyi emmesi ve DNA parçalı spermatozoanın aşırı tahmin edilmesiyle sonuçlanmasıydı. Bu test Tejada ve ark. ve SCSA'nın mikroskopik versiyonudur. Slaytlar akridin turuncu ile etkileşime girebildiğinden ve yanlış pozitiflikler verebildiğinden, bu sonuçlar SCSA sonuçlarıyla eşleşmedi. Bu yanlış pozitiflikler Evenson ve ark. (2) tarafından saptanmıştır. SCSA altın standart olarak kabul edildiğinden, diğer testlerden elde edilen sonuçlar SCSA sonuçlarıyla karşılaştırıldı (30). Sadece HaloSperm G2, SCSA ile benzer sonuçlara sahiptir. Literatürde tarif edilmiştir (27,31,41). Genel olarak, HaloSperm G2, diğer kullanımı kolay testlerden daha yüksek sonuçlar elde etti ve altın standarttan önemli ölçüde farklı sonuçları olmayan tek testti (30). Sonuçlardaki bu farklılıkların birden fazla açıklaması olabilir. SDF kiti hala optimize ediliyor. Bazı spermatozoanın kaçırıldığı açıktır, çünkü lekelenme yeterince görünür değildir. Bu, bu kit tarafından bulunan düşük değerleri açıklayabilir. Kit daha kesin sonuçlar verecek şekilde ayarlanacaktır. Anilin'deki düşük değerler mavi boyama, bazı olgunlaşmamış ve olgun spermatozoa arasındaki zor ayrımcılıktan dolayı, daha yanlış negatif sonuçlar verir ve bu testteki genel sonuçları düşürür. Son olarak, bu testin, slaytta lekenin emildiği alanlarda yanlış pozitif sonuçlar verdiği bilindiğinden, spermatozoa sayılırken bu alanlardan kaçınılır. HaloSperm G2 ve SDF kitinden elde edilen sonuçlar geri dönüşümlü olarak motilite ile ilişkilidir. Ancak bu, anilin mavisi boyaması ve akridine turuncu test'in sonuçları için geçerli değildir. Bu test sonuçları birbiriyle ilişkilidir ve anilin mavisi boyaması'nın sonuçları da konsantrasyon ile ters bir korelasyona sahiptir. SCSA sonuçları HaloSperm G2 sonuçları ve örnek hacmi ile korelasyon gösterir. DNA bütünlüğü, hareketlilik ve konsantrasyon da (23,40) önceki araştırmalarda SCSA sonuçları ile semen hacmi arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Bunun nedeni popülasyon örneğinin çok küçük olması olabilir. Bununla birlikte, birkaç çalışmada SCSA ve HaloSperm G2 sonuçları arasında ilişki bulunmuştur(27,31,41). SCSA sonuçları ayrıca literatüre göre DNA bütünlüğü yöntemlerinden elde edilen diğer sonuçlarla da ilişkilidir.

Bu yöntemler, TUNEL ve Comet testlerini içerir ve bu tekniklerin maliyeti nedeniyle ve kullanımları daha zor oldukları için bu çalışmada araştırılmamıştır. İnfertilite kliniklerinin uygulaması için daha az çekicidir(26). Ayrıca, DNA bütünlüğü ve morfolojisi arasında bir ilişki araştırmacılar tarafından gösterilmiştir, ancak bu çalışmada kanıtlanamamıştır (40,42). Çalışmamızda istatistiksel olarak Oksisperm ve Resazurin redüksiyon testi arasında fark yoktu. Bu testler arasındaki en büyük fark kullanılan yöntemler ve sonuçların renk şeması üzerinden yorumlanmasıdır. Oksisperm spermatozoada süperoksit anyonlarını ölçerken, resazurin azaltma testi spermatozoanın metabolik aktivitesini ölçer (4,37). Resazurin redüksiyon testinin renk şeması Oksisperm tablosundan daha fazla seviyeye sahiptir (sırasıyla 4 yerine 14). Bununla birlikte, resazurin redüksiyon testi renk şemasında ne kadar oksidatif stres olduğunu görmek daha kolay olsa da, bazı seviyelerin benzer renklere sahip olması nedeniyle de okumak daha zordur. Kontrol grubunun sonuçları hasta grubunun sonuçlarına benzerdi. Bunun nedeni büyük olasılıkla testleri başlatmak için geçen gecikme süresidir. Resazurin azaltma testi kullanımı en kolay olanıdır, çünkü sadece bir ürüne ihtiyaç vardır. Bu test, standart bir semen analizi planlanmadan önce eve götürme testi olarak uygulanabilir. Oksidatif stres mevcutsa; hasta, semen parametrelerini iyileştirmek amacıyla ilk semen analizinden önce antioksidan tedaviye başlayabilir. Bu iki kullanımı kolay test arasında daha önce hiçbir karşılaştırma yapılmamıştır. Oksidatif stres ölçüldüyse, genellikle kemilüminesans gibi diğer daha pahalı yöntemlerle yapıldı (43). Oksidatif stres için korelasyonlar, hem oksisperm hem de resazurin redüksiyon testi için ölçülen absorpsiyon ve numune konsantrasyonu arasında bulunur. Numunenin toplam spermatozoa sayısı, resazurin redüksiyon testinin sonuçları ile de ilişkilidir. Bu korelasyonlar, Mahmoud ve arkadaşlarının çalışmasıyla benzerbulundu (44). Ayrıca, resazurin redüksiyon testi ile motilite veya morfoloji arasındaki korelasyonlar gibi, doğrulamadığımız diğer parametrelerle korelasyonlar buldular (44).

Bu çalışmanın bazı sınırlamaları vardır. İlk olarak, özellikle SCSA için küçük bir numune boyutu kullanılmıştır. Bu, önemli sonuçlara ulaşmak için yeterliydi, ancak güçlü sonuçlar çıkarmak için yeterli değildi. Bu araştırmayı genişletmek ve daha fazla gönüllü ve hasta eklemek daha iyi olacaktır. Normal bir semen analizinin DNA fragmentasyonu ve oksidatif stres üzerinde yüksek bir risk sağlamadığını doğrulamak için donörler de dahil edilebilir. Tüm donörlerin normal bir semen analizi olmasına rağmen, bu grup özellikle ilginçtir, çünkü tüm donörler gebeliği indükleyemez. Çalışmamızdaki ikinci bir sınırlama, bazı istisnalar dışında

sadece bir kişinin numuneleri incelemesidir. Bu nedenle, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçları en aza indirebilecek gözlemler arası sonuçlar yoktur. Üçüncüsü, özellikle kontrol grubunda döllenme gebelik oranları ile ilgili veri yoktur. Kullanılan örnekler bu çalışma için üretildi maalesef tedavi için üretilmedi.

Tüm bunların yanısıra, testler, oksidatif stres için bir saat yerine, DNA bütünlük testleri için iki saat içinde toplandıktan sonra üç saat içinde yapıldı. Bu, daha yüksek sonuçların sonucunu doğurdu ve korelasyonları daha az güvenilir hale getirdi. Bununla birlikte, bu tüm testler ve tüm numuneler için yapıldığından sonuçlar hala karşılaştırılabilir. Diğer bir yanlışlık, gönüllülerin ve hastaların doğurganlık durumlarıdır. Bazı gönüllülerin kanıtlanmış bir doğurganlığı yoktu. Öte yandan, bazı hastaların infertil olduğu kanıtlanmamıştır. İnfertil gönüllüler kontrol grubunda daha yüksek sonuçlar verebilirken, fertil hastalar hasta grubundaki sonuçları düşürebilir. Sonuçlar ve özellikle korelasyonlar değerlendirilirken bu dikkate alınmalıdır. Bu çalışmanın diğer bir kısıtlaması, çevresel faktörlerin ve yaşam tarzının dikkate alınmamasıdır. Sanayileşmiş bölgelerde sigara içmenin veya yaşamının (hava kirliliği, ksenobiyotikler v.b.) oksidatif stres ve DNA hasarına neden olabileceği kanıtlanmıştır (22,24). Çalışmamızda standart bir semen analizi normal olduğunda hem DNA fragmentasyonu hem de oksidatif stres yüksek sonuçlar vermedi. Ayrıca gerçekleştirilmesi çok uzun sürdü ve semen değerlendirmesine hakkında ek bilgi sağlayamadılar. Bu nedenle, bu testlerin standart bir semen analizine dahil edilmesi tavsiye edilmez. Bazı durumlarda, örneğin oligozoospermi veya astenozoospermi gibi durumlarda ek bilgi verebilir. DNA bütünlüğünün motilite ve konsantrasyon ile zayıf bir korelasyonu vardır. Bu, astenozoospermi veya oligozoospermisi olan hastaların, bunun bozukluklarına neden olmadığından emin olmak için bir DNA bütünlük testi yapabileceği anlamına gelir. Korelasyon zayıf olduğu için, DNA parçalanmasının düşük konsantrasyon veya hareketliliğinin nedeni olmaması ihtimali vardır. Oksidatif stresin konsantrasyon ile zayıf bir korelasyonu vardır. Bu, oligozoospermiden muzdarip hastaların onaylamak için oksidatif stres testi yapabileceğini gösterir. Düşük konsantrasyon seviyelerine oksidatif strese neden olmaktadır. Bu oksidatif stres düşük konsantrasyonun nedeniyle ise, hastalar oksidatif stresi azaltmak için bir antioksidan tedaviye başlayabilir. Bu da konsantrasyonu arttırabilir ve doğurganlık problemlerini azaltabilir. Gelecekte, bu çalışmayı daha fazla gönüllü, hasta ve bağışçı ile genişletmek akıllıca olacaktır.

Ayrıca kontrol grubunda kanıtlanmış doğurganlık, hasta grubunda erkek faktörüne bağlı infertilite, yaşam tarzının dikkate alınması gibi daha iyi seçim kriterleri yardımcı olabilir. Testler ayrıca numunenin üretilmesinden sonraki ilk saat içinde yapılmalıdır.

Bu şekilde daha güvenilir korelasyonlar bulunabilir. Kemilüminesans gibi diğer daha otomatik yöntemlerle de karşılaştırılabilirler, ancak bu yöntemler genellikle daha pahalı ve kullanımı daha zordur.

Yapılabilecek başka bir test, tüm numune yerine spektrometre üzerinde bir rezazurin reaksiyonundan sonra süpernatantı incelemektir. Bu şekilde, sonuçları yorumlamak için bu teknik kullanıldığında konsantrasyon karışmaz. Spektrometre ile yapılan ölçüm, bu testin öznelliğini en aza indirebilir, ancak artık bir ev testi olarak kullanılmaya uygun olmayacaktır. Mümkünse, klinikler arası varyasyonları en aza indirmek için kullanımı kolay bir DNA parçalanma testi veya oksidatif stres testi standartlaştırılmalıdır. Bu, açıkça boyanmamış spermatozoaların kategorize edilmesine ek olarak seçilen testle ilgili eğitimi içerebilir. Bu mümkün ise, test rutin bir test olarak uygulanabilir.

Sonuç olarak, haloSperm G2, SCSA'dan önemli ölçüde farklı olmayan, kullanımı kolay tek testtir, böylece bir semen analizinde kullanmak için en iyi seçimdir. Resazurin redüksiyon testi oksisperm'den daha iyi bir testtir, çünkü kullanımı daha kolaydır, renk şemasında daha geniş bir aralığa sahiptir ve bir spektrometre üzerinde kolayca incelenir. haloSperm G2 ile korelasyon bulmak için resazurin redüksiyon testlerinin verilen süre içinde tekrarlanması tavsiye edilir. Böyle bir korelasyon bulunabilirse, haloSperm G2'ye göre resazurin redüksiyon testi tercih edilir, çünkü kullanımı daha kolaydır ve renk şeması ile kullanılması kolay bir testtir. Bununla birlikte, klinik açıdan, bu testler standart semen analizinden daha üstün değildir. Çok fazla zaman alırlar ve ek bilgi vermezler. Sadece bir çiftin kötü embriyo kalitesinin olması, çok sayıda başarısız ICSI denemesi olması veya erkeğin oligozoospermi veya astenozoospermiden muzdarip olması durumunda, DNA bütünlük testi veya oksidatif stres testi ek bilgi verebilir.

Referanslar

1. Turp A B, Guler, I, Bozkurt N, Uysal A, Yılmaz B, Demir M, et al. Infertility and surrogacy first mentioned on a 4000-year-old Assyrian clay tablet of marriage contract in Turkey. *Gynecological Endocrinology*, 2018, 34.1: 25-27.

2. Evenson Donald P, Larson Kjersten L, Jost Lorna K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of andrology*, 2002, 23.1: 25-43

3. Merviel P, Heraud M H, Grenier N, Lourdel E, Sanguinet P, Copin H. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertility and sterility*, 2010, 93.1: 79-88.

4. Iommiello VM, Albani E, Di Rosa A, Marras A, Menduni F, Morreale G et al. Ejaculate Oxidative Stress Is Related with Sperm DNA Fragmentation and Round Cells. *International Journal of Endocrinology* 2015:6.

5. Ombelet W, Dhont N, Thijssen A, Bosmans E, Kruger T. Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review. *Reproductive Biomedicine Online* 2014;28:300-9.

6. Aitken R J, De Iulius GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*, 2010, 25.10: 2415-2426.

7. De Lamirande EVE, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of andrology*, 1992, 13.5: 368-378.

8. Aitken R, John Baker, Mark A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and cellular endocrinology*, 2006, 250.1-2: 66-69.

9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin, M T, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007, 39.1: 44-84.

10. Agarwal Ashok, Makker Kartikeya, Sharma Rakesh. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American journal of reproductive immunology*, 2008, 59.1: 2-11.

11. Agarwal A, Said Tamer M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human reproduction update*, 2003, 9.4: 331-345.

12. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2011, 28.1: 41-48.

13. Mehdi M, Gmidene A, Brahem S, Guerin JF, Elghezal H. Saad A. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with severe teratozoospermia. *Andrologia*, 2012, 44: 139-143.

14. Aitken RJ, Wingate JK, De Iulius, GN, McLaughlin EA. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using bodipy c11. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2007, 13.4: 203-211.

15. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T: Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997;68: 519-24.

16. Duru KN, Morshedi M, Oehninger S: Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000;74:1200-7.

17. Tunc O, Tremellen K: Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26:537-44.

18. Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF: Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod* 2002;8:719-21.

19. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A: Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007;33:603-21.

20. 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. *Fertility and Sterility* 2001;75:674-7.

21. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update* 2003;9:331-45. 22. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* 2010;93:1027-36.

23. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 2002;17:3122-8.

24. Aitken J, De Iulius GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive Biomedicine Online* 2007;14:727-33.

25. Tomlinson M, Lewis S, Morroll D. Sperm quality and its relationship to natural and assisted conception: British Fertility Society Guidelines for practice. *Human Fertility* 2013;16:175-93.

26. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 1999;14:1039-49.

27. Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez J, Remohi J, Pellicer A et al. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Human Reproduction* 2006;21:738-44.

28. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional invitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Andrology* 2003;26:279-85.

29. Hosseinifar H, Yazdanihah S, Modarresi T, Totonchi M, Gilani MAS, Sabbaghian M. Correlation between sperm DNA fragmentation index and CMA3 positive spermatozoa in globozoospermic patients. *Andrology* 2015;3:526-31.

30. Fernandez JL, Gosalvez J, Goyanes V. DNA Breakage Detection Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH). *Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics* 2005:9.

31. Boushaba S, Belaaloui G. Sperm DNA Fragmentation and Standard Semen Parameters in Algerian Infertile Male Partners. *World Journal of Mens Health* 2015;33:1-7.

32. Hammadeh ME, AlHasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K et al. The effect of chromatin condensation (Anilin Mavisi Boyamasi) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Human Reproduction* 1996;11:2468-71.

33. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 1998;30:29-35.

34. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iulius GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology* 2014;16:31-8.

35. Griveau JF, Lelannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology* 1997;20:61-9.

36. Koksai IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian Journal of Andrology* 2003;5:95-9.

37. Zalata AA, Lammertijn N, Christophe A, Comhaire FH. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *International Journal of Andrology* 1998;21:289-94.

38. Mahmoud AMA, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertility and Sterility* 1997;68:340-5.

39. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male-fertility by acridine-turuncu (AO) fluorescence. *Fertility and Sterility* 1984;42:87-91.

40. De la Calle JFV, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jinez C, Wittemer C et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertility and Sterility* 2008;90:1792-9.

41. Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, Santos MJD et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 2006;85:371-83.

42. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 2002;78:1215-24.

43. Benjamin D, Sharma RK, Moazzam A, Agarwal A. *Methods for the Detection of ROS in Human Sperm Samples.* 1 ed. Springer Science+Business Media, LLC: Humana Press, 2012.

44. Mahmoud AM, Comhaire FH, Vermeulen L, Andreou E. Comparison of the resazurin test, adenosine-triphosphate in semen, and various sperm parameters. *Human Reproduction* 1994;9:1688-93.