



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2010; 24 (1): 41 - 43  
http://www.fusabil.org

### Dondurma İşlemi Öncesi Sperm Hazırlanmasının Çözme Sonrası Akım Sitometrisi Parametreleri Üzerine Etkileri

Niyazi TUĞ<sup>1</sup>  
Çetin ÇAM<sup>1</sup>  
Gülçin GAÇAR<sup>2</sup>  
Oya AKÇİN<sup>3</sup>  
Erdal KARAÖZ<sup>2</sup>  
Cem FIÇICIOĞLU<sup>3</sup>  
Ateş KARATEKE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zeynep Kamil Hastanesi,  
Kadın Hastalıkları ve Doğum  
Kliniği,  
İstanbul, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi, Kök  
Hücre ve Gen Tedavileri  
Araştırma ve Uygulama  
Merkezi,  
Kocaeli, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Yeditepe Üniversitesi,  
Üremeye Yardımcı  
Teknikler Merkezi,  
İstanbul, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 16.03.2010  
Kabul Tarihi : 27.03.2010

#### Yazışma Adresi Correspondence

Niyazi TUĞ  
Zeynep Kamil Hastanesi,  
Kadın Hastalıkları ve  
Doğum kliniği,  
İstanbul-TÜRKİYE

niyazitug@hotmail.com

Dondurma-çözme işlemi öncesi gradient yöntemiyle sperm hazırlanmasının işlem sonrası akım sitometrisi parametrelerine etkilerinin incelenmesi. 12 sağlıklı denekten alınan ejakülatlar dansite gradient yöntemiyle yıkanmış ve ham olmak üzere iki kısım halinde usulüne uygun olarak donduruldu. Çözülme sonrası örnekler akım sitometrisiyle değerlendirildi. Veriler paired t test ile değerlendirildi. Akım sitometrisi sonuçlarına göre dondurulmadan önce yıkanmış ve yıkanmamış örneklerin ölü hücre oranları arasında önemli fark saptanmadı ( $n=12$ ,  $t=-2.012$ ,  $p=0.072$ ). Dondurulmadan önce yıkanmış örneklerde diğer gruba kıyasla canlı hücre oranı daha yüksek ( $t=3.744$ ,  $p=0.004$ ), apoptotik hücre oranı ise daha düşük ( $t=-3.860$ ,  $p=0.003$ ) olarak izlendi. Sağlıklı örneklerde dondurma öncesi gradient yöntemiyle sperm hazırlanmasının çözme sonrası sperm parametrelerini olumlu etkilediği tespit edilmiştir. Bu yöntemin özellikle sperm konsantrasyonu düşük infertil hastalarda hem oksidatif stresi arttıran etkenlerden temizlenmesi hem de konsantrasyonun artırılması sayesinde daha etkili olacaktır. Sağlıklı örneklerde ise daha kolay ve ucuz bir yöntem olan yıkamasız dondurma tekniği tercih edilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Sperm, akım sitometrisi, sperm dondurma.

#### Effects of Sperm Preperation Methods Prior To Freezing on the Parameters of Flow Cytometry After Thawing

**Introduction:** Effects of prior sperm preperation methods on frozen-thawed sperm samples was aimed to be compared by flow cytometry. Ejaculates obtained from twelve healthy volunteers which were divided into two: either washed by density gradient centrifuge method or frozen as raw samples. After thawing at room temperature, samples were double washed and analysed by flow cytometry. Percentage of live, apoptotic and death cells were recorded and compared by paired t test. No significant difference was found between death cell rates of the pre-freezing prepared and unprepared samples on flow cytometry ( $n=12$ ,  $t=-2.012$ ,  $p=0.072$ ). Percentages of live cells was higher ( $t=3.744$ ,  $p=0.004$ ) and apoptotic cells was lower ( $t=-3.860$ ,  $p=0.003$ ) in the pre-freezing prepared samples compared to raw frozen samples. It was concluded that, sperm preperation by density gradient method prior to freeze-thaw procedure improved the parameters of sperm samples. This method would be especially effective in oligospermic patients by increasing the concentration of healthy sperm cells and in order to get rid of the agents that increase the oxidative stress. However, in healthy male, freezing of the raw sperm samples could be chosen as an easier and cheaper method.

**Key Words:** Sperm, flow cytometry, sperm freezing.

#### Giriş

Yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında genellikle taze alınmış ejakülatlardan yıkama suretiyle seçilmiş sperm hücreleri kullanılmaktadır. Dünya genelinde ise özellikle azospermi olgularında olmak üzere gamet donasyonu yasal olup sıklıkla dondurulmuş-çözülmüş sperm örnekleri kullanılmaktadır (1). Ülkemizde donasyon yasal olmadığından sperm dondurma uygulamaları sadece kanser, ağır azospermi gibi bazı hastalık durumlarıyla sınırlıdır.

Dondurma öncesi sperm hücrelerinin manipülasyonu veya dondurma-çözme işlemleri, hücrelerin zona pellüsida penetrasyon yeteneklerini etkilememektedir (2, 3). Aksine bu sayede gebelik başarısında önemli olan ileri doğru hareketli sperm hücreleri seçilerek örnekler optimize edilebilmektedir (4). Sperm yıkama işleminde sıklıkla dansite-gradient, swim-up ve yıkama-santrifüj teknikleri kullanılmakta olup her hangi birinin diğerlerine üstünlüğü henüz kanıtlanamamıştır (5).

Sperm hareketlilik ve canlılık oranları yardımcı üreme teknikleri tedavisinde gebelik oranlarını etkilemektedir (6, 7). Dondurma işlemi sonucu sperm hücrelerinin hareketlilik

ve canlılık oranları azalmaktadır (8). Dondurma-çözme sonrası elde edilen sperm örneklerinin kaliteleri değişkenlik göstermektedir (9).

Bu çalışmada ham halde ve dansite-gradient yöntemleriyle dondurulmuş sperm örneklerinin çözülme sonrası canlılık ve apoptozis oranlarının akım sitometrisi yöntemiyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma Zeynep Kamil Hastanesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Deneyler Yeditepe Üniversitesi Üremeye Yardımcı Teknikler Merkezi ve Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre Geliştirme Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılan 14 sağlıklı gönüllüden 2-6 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla alınan örnekler 37°C ısıda likefaksiyon sonrası WHO kriterlerine göre (10) makler sayacında sayılmış, normal kabul edilen 12 örnek çalışma kapsamına alınmıştır. Çalışmaya alınan örnekler ikişer kısma ayrılmış, ilk yarıları ham olarak 1:1 sperm dondurma solüsyonu (Quinn's Advantage® Sperm Freeze, Medek Medikal, İstanbul, Türkiye) eklenerek dondurulmuştur. Örneklerin kalan yarıları önce dansite gradient santrifüj (5) yöntemiyle yıkanmış, konsantre örnekler yine 1:1 oranında aynı sperm dondurma medyumuna ilave edilerek dondurulmuştur. Oda ısısında çözdürülen örnekler ikişer kez 2000 rpm 20 dakika, 1:1 yıkama solüsyonu kullanılarak (Pure Sperm Wash, Nidacn) santrifüj sonrası süpernatantlar atıldıktan sonra akım sitometrisi için ayrılmıştır. Annexin V boyaması "annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit" (BioVision, Palo Alto, CA) kullanılarak, üretici firma protokolüne uygun gerçekleştirilmiştir. Oluşan floresans FACS akım sitometri cihazıyla (Becton Dickinson, San Jose, CA) ölçülmüştür. İstatistiksel analiz SPSS 11.5 programında Paired t test kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiş,  $p=0.05$  önemli fark sınırı olarak kabul edilmiştir.

## Bulgular

Deneklerin yaşları  $31\pm 5.18$  yıl, ejakülat hacimleri  $3.46\pm 0.84$  ml, sperm konsantrasyonları  $83\pm 35$  ( $\times 10^6$ /ml) olarak hesaplandı. Hızlı, yavaş, yerinde hareketli ve hareketsiz sperm oranları sırasıyla %  $23\pm 11$ ,  $29\pm 9$ ,  $11\pm 3$  ve  $37\pm 16$  olarak ölçüldü ( $n=12$ ).

Akım sitometrisi sonuçlarına göre yıkanmadan dondurulan örneklerin canlı, apoptotik ve ölü hücre oranları sırasıyla %  $40.27\pm 10.91$ ,  $17.82\pm 15.45$  ve  $41.91\pm 19.76$  olarak hesaplandı. Dondurulmadan önce gradient yöntemiyle yıkanmış örneklerin akım sitometrisi sonuçları canlı %  $48.41\pm 14.64$ , apoptotik %  $2.31\pm 2.75$ , ölü %  $49.27\pm 15.71$  olarak ölçüldü.

Ölü hücre oranları arasında dondurulmadan önce yıkanmış ve yıkanmamış örnekler arasında önemli fark saptanmadı ( $n=12$ ,  $t=-2.012$ ,  $p=0.072$ ). Dondurulmadan önce yıkanmış örneklerde diğer gruba kıyasla canlı hücre oranı daha yüksek ( $t=3.744$ ,  $p=0.004$ ), apoptotik hücre oranı ise daha düşük ( $t=-3.860$ ,  $p=0.003$ ) olarak hesaplandı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Sperm dondurma çözme işlemi öncesi 12 sağlıklı gönüllüden alınan örneklerin dansite gradient yöntemiyle yıkanmış ve yıkanmamış kısımlarının, çözme işlemi sonrası akım sitometrisi analizi sonuçlarının karşılaştırılması ( $n=12$ , paired t test, veriler ortalama standart sapma olarak verilmiştir).

n=12, %	Yıkanmamış	Yıkanmış	t	p
Canlı	40.27 $\pm$ 10.91	48.41 $\pm$ 14.64	3.744	0.004*
Apoptotik	17.82 $\pm$ 15.45	2.31 $\pm$ 2.75	-3.860	0.003*
Ölü	41.91 $\pm$ 19.76	49.27 $\pm$ 15.71	-2.012	0.072*

\*  $p<0.05$

## Tartışma

Bu çalışmada 12 sağlıklı denekten alınan ham ve dondurulmadan önce dansite gradient yöntemiyle yıkanmış dondurulmuş-çözülmüş sperm örnekleri, akım sitometrisi yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Grupların ölü hücre oranları arasında fark bulunamamıştır ( $n=12$ , paired t test,  $p>0.05$ ). Dondurulmadan önce yıkanmış örneklerde diğer gruba kıyasla canlı hücre oranı daha yüksek ( $t=3.744$ ,  $p=0.004$ ), apoptotik hücre oranı ise daha düşük ( $t=-3.860$ ,  $p=0.003$ ) olarak tespit edilmiştir (Tablo 1).

Yardımcı üreme tekniklerinde, özellikle artifisiel inseminasyon işleminde infertil erkeklerde düşük oranda olan hızlı hareketli sperm oranlarının artırılması hedeflenmektedir. Bu hastaların seminal plazmalarında normalden daha yüksek oranlarda serbest oksijen radikalleri bulunmakta olup, bu hastalara anti-oksidan tedavi verilmesinin teorik olarak oksidatif hasarı azaltacağı kabul edilmektedir (11). Serbest oksijen radikalleri sperm motilite, sağ kalım ve fonksiyonlarını membran lipid, protein ve DNA yapısını bozarak etkilemektedir (12-16). Normal şartlar altında *in vivo* anti-oksidan yollar oksidatif hasara karşı yeterli korumayı sağlarken (17) yardımcı üreme tekniklerinde kullanılan medyumlara anti-oksidan eklenmesine rağmen sperm hasarının önüne geçilememektedir. Bu çalışmada da sağlıklı deneklerden alınan dondurma-çözme işlemi sonrasında canlı hücre oranları on yıkama yapılmış ve yapılmamış örneklerde % 48.81 ve 40.27 olarak ölçülmüştür.

Programlı hücre olumu olarak bilinen apoptozis, sperm hücrelerinde DNA hasarı tarafından artırılmaktadır (18). Apoptozis infertiliteye yol açmaktadır (19). İnfertil hasta populasyonunda da apoptozis kontrollere göre daha yüksek oranda izlenmektedir (20). Standart spermogram parametreleri apoptozis düzeyini tam olarak yansıtmayabilir fakat apoptozis erkek infertilitesinde muhtemelen rol oynayan bağımsız bir fenomen olarak kabul edilmektedir (11). Bu çalışmada on yıkama yapılan örneklerde apoptotik hücre oranı % 2.31, yıkanmamış örneklerde % 17.82 olarak ölçülmüştür. Bu sonuca ilk grupta yıkama işlemiyle sağlıklı hücrelerin seçilmiş olması yol açmış olabilir.

Erkek infertilitesinde immatür germ hücreleri, bakteriyel kontaminasyon ve enfeksiyon gibi sebepler seminal plazmada oksidatif stresi arttırmaktadır (11). Yıkama işlemi sonrasında bu etkenler uzaklaştırılmakta ve seçilmiş hücreler konsantrasyon edilebilmektedir fakat santrifuj işleminin yarattığı hasar önlenememektedir. Sperm dondurma-çözme işlemleri de membran ve DNA hasarını arttırmaktadır. Dondurma işlemi esnasında seminal plazmanın kriyoprotektan etkisi sperm dondurma medyumlarında albumin ve antioksidan katkılarıyla

kısmen sağlanmaktadır (11). Bu çalışmada sağlıklı örneklerde dondurma öncesi gradient yöntemiyle sperm hazırlanmasının çözme sonrası sperm parametrelerini olumlu etkilediği tespit edilmiştir. Bu yöntemin özellikle sperm konsantrasyonu düşük infertil hastalarda hem oksidatif stresi arttıran etkenlerden temizlenmesi hem de konsantrasyonun artırılması sayesinde daha etkili olacaktır. Sağlıklı örneklerde ise daha kolay ve ucuz bir yöntem olan yıkamasız dondurma tekniği tercih edilebilir.

## Kaynaklar

1. Yogev L, Kleiman S, Shabtai E, *et al.* Seasonal variations in pre- and post-thaw donor sperm quality. *Hum Reprod* 2004; 19: 880-885.
2. Gamzu R, Yogev L, Yavetz H, *et al.* Fresh and frozen-thawed human sperm bind in a similar pattern to the zona pellucida in the hemizona assay. *Fertil Steril* 1992; 58: 1254-1256.
3. Yogev L, Gamzu R, Paz G, *et al.* Pre-freezing sperm preparation does not impair thawed spermatozoa binding to the zona pellucida. *Hum Reprod* 1999; 14: 114-117.
4. Tomlinson ML, Kessopoulou E, Barratt CLR. The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters. *J Androl* 1999; 20: 588-593.
5. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 17: CD004507.
6. Mahadevan MM, Tounson AO, Milne BJ, Leeton JF. Influence of semen and donor factors on the success rate of artificial insemination with frozen semen. *Clin Reprod Fertil* 1982; 1: 185-193.
7. Johnston RC, Kovacs GT, Lording DH, Baker HWG. Correlation of semen variables and pregnancy rates for donor insemination: A 15-year retrospective. *Fertil Steril* 1994; 61: 355-359.
8. Sharma RK, Vemulapalli S, Kohn S, Agarwal A. Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. *Arch Androl* 1997; 39: 33-38.
9. Kolon TF, Philips KA, Buch JP. Custom cryopreservation of human semen. *Fertil Steril* 1992; 58: 1020-1023.
10. Kliesch S, Cooper TG. Semen analysis: spermogram according to WHO criteria. *Urologe A*. 2008; 47: 1548-1554.
11. Sicca SC. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology 2004; 25: 5-17.
12. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 459-469.
13. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8: 338-348.
14. Gagnon C, Iwasaki A, de Lamirande E, Kovalski N. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 637: 436-444.
15. Hellstrom WJG, Bell M, Wang R, Sikka SC. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertil Steril* 1994; 61: 1117-1122.
16. Aman RP, Shabanowitz RB, Huszar G, Broder SJ. Populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation. *Journal of Andrology* 1999; 20: 649-654.
17. Jones R, Mann T, Sherins RJ. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*. 1979; 31: 531-537.
18. Sinha-Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germcell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; 4: 38-47.
19. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-607.
20. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi G, *et al.* Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061-1067.