

Sperm Hazırlama Tekniklerinin Fertilizasyon Sonuçları Üzerine Etkileri

Effect of Sperm Preparation Techniques on Fertilization

Tahsin Murad Aktan¹, Gökhan Cüce¹, Selçuk Duman¹, Emine Aksoy², Hüseyin Görkemli³

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.¹, Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.², Konya Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi³, Konya

Özet

Mikroenjeksiyon sonuçları manipülasyon ve işlem aşamalarından etkilenmektedir. Sperm hazırlamasında santrifüjün etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Sperm hazırlamak için 2 grup oluşturuldu. Grup 1'de (G1, n:28) likefaksiyondan sonra 2 aşamalı santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Grup 2'de (G2, n:31) likefaksiyondan sonra bire bir medyum eklendi ve yüzdürülme uygulandı. Oosit sperm mikroenjeksiyonu (ICSI) uygulandıktan 18-20 saat sonra pronukleer gelişme kaydedildi. Sonuçlar bağımsız t-Testi ile değerlendirildi. Toplanan metafaz 2 oosit sayısı; Grup 1 için $7,5 \pm 2,1$ ve Grup 2 için $7,2 \pm 2,1$ oldu, bu iki değer istatistiksel olarak farklı yorumlanmadı. Fertilizasyon yüzdesi ise Grup 1 için $52,5 \pm 15,4$ ve Grup 2 için $66,6 \pm 19,0$ olarak hesaplandı ve p değeri 0,03 bulunarak istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Androloji laboratuvarlarında ICSC için sperm hazırlama santrifüj süresi genellikle 10-15 dakika sürmektedir (1200-1800 rpm). Yüksek santrifüj işlemi yüksek sperm kondenzasyonuna ve serbest radikallerin oluşmasına sebep olmaktadır. Dekondanse sperm enjeksiyonu düşük fertilizasyon ve gebelik oranlarına sebep olmaktadır. Direk swim up ile hazırlanan sperm, in vivo ortamdaki spermere daha yakın ve daha düşük dekonanzasyon oranına sahip olmaktadır. Laboratuvar manipulasyonları için avantajı daha az zaman almasıdır.

Anahatar kelimeler: Sperm, metod, fertilizasyon

Abstract

The manipulation and process stages effect microinjection results. Evaluation of zygote forming by the effect of centrifugation on sperm preparation was aimed. Two groups were prepared for sperm processing. In Group1 (G1, n:28) after liquefaction, two steps of centrifugation were done. While in Group 2 (G2, n: 31) after liquefaction, medium was added as 1:1 volume and layering was performed. After oocyte retrieval, intracytoplasmic sperm microinjection (ICSI) was done, 18-20 hours later pronuclear development was recorded. Results were evaluated by independent sample's t-Test. Collected metaphase 2 oocytes were $7,5 \pm 2,1$ and $7,2 \pm 2,1$ respectively for G1 and G2 which is statistically no meaningful. Fertilized oocytes number were $52,5 \pm 15,4$ and $66,6 \pm 19,0$ respectively for G1 and G2 which is statistically meaningful (p value, 0,03). In andrology laboratory, ICSI sperm preparation centrifugation process usually takes 10-15 minutes (for 1200-1800 rpm). Higher centrifugation rates cause higher sperm condensation and free radical problems. Decondensated sperm injection is a cause for lower fertilization and implantation rate. Direct swim up prepared sperm can be more close to in vivo sperm, with lower decondensation rates, and as an advantage needs less time for laboratory manipulation.

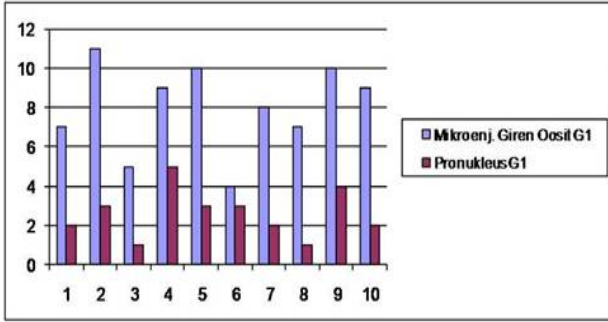
Key words: Sperm, method, fertilization.

GİRİŞ

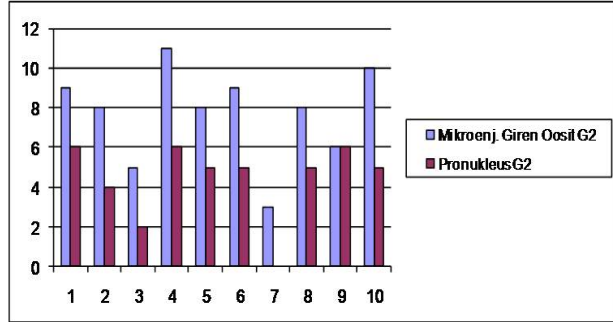
Döllenme sperm ve yumurtanın doğrudan etkileşimi sonucu hücre membranlarının füzyonuyla beraber dişi ve erkek gametlerin birleşmesi ile gerçekleşir. Bu sürecin tamamlanması ve bunu takiben embriyo gelişimi sperm DNA bütünlüğüne bağlıdır (1). Kondanse sperm DNA'sı hatasız bir şekilde genetik materyalin geçişi için gereklidir. Problemlerli DNA fertilizasyon oluşmasını engelleyebilir veya oluşursa embriyolarda konjenital anomalilere yol açabilir (2). Yardımcı üreme teknikleri(YÜT), sperm, yumurta veya embriyonun in vitro manüplasyonunu gerektiren işlemlere verilen genel bir terimdir (3).

Spermin hazırlanması aşamaları mikroenjeksiyon sonuçları üzerinde etki etmektedir. İnsan spermatozoası hazırlamadaki geleneksel tekniklerden birisi de basit bir kültür ortamında tekrarlayan santrifüj aşamalarını kullanmaktır. Bu prosedür spermi seminal plazmadan ayırmada kullanılır. Yüksek hareket kapasitesine sahip sperm

santrifüj sonucu oluşan pelletten kültür vasatına doğru yüzmesi ile ayrılır (4). Santrifüj sonucu ortaya çıkan etkilerinden birisi de semendeki alt populasyon hücreleri tarafından serbest oksijen radikallerinin (ROS) üretilmesidir (4,5). Santrifüjle artarak oluşan ROS'un kalıcı DNA hasarlarına yol açtığı bildirilmiştir (5). İnfertil erkeklerin %25'nin semeninde yüksek seviyelerde bulunmuştur. Bununla beraber normal sperm fonksiyonu için düşük seviyede ROS'a ihtiyaç duyulur. Yüksek oranlar hatalı sperma ve semen lökositleri tarafından üretilmektedir ve bu da sperm disfonksiyonu ile sonuçlanmaktadır. Doğal ortamda DNA hasarlı sperm yumurtayı dölemede başarısız olacaktır. Bu bize doğal olarak normal fertilizasyonda sağlam DNA bütünlüğüne sahip spermatozoanın başarılı olduğunu gösteriyor. Bununla birlikte YÜT'de bu seleksiyon işlemi pas geçiliyor ve bu da yanlışlıkla DNA hasarlı spermatozoa kullanımıyla sonuçlanabilir. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda DNA hasarı zayıf gebelik ve embriyo gelişimine neden



Şekil 1. Santrifüjlü yöntemde Pronukleus oluşma dağılımı.



Şekil 2. Santrifüzsüz yöntemde Pronukleus oluşma dağılımı

olmaktadır (6). Bu çalışmada da sperm hazırlığında santrifüjlü ve santrifüzsüz iki yöntemin zigot gelişimine olan etkisi değerlendirildi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Seminal plazmadan mikroenjeksiyon için sperm hazırlanırken orta dereceli oligospermia'lı iki grup oluşturuldu. Grup 1'de (n:28) likefaksiyon sonrası yıkama amaçlı iki santrifüj uygulandı (1500rpm,1300rpm ve 15dk,10dk), 20-30 dakika swim up sonrası elde edilen sperm toplandı. Grup 2'de (n:31) likefaksiyondan sonra ejakulat mediumla 1/1 oranında karıştırıldıktan sonra karışımın üzerine taze medium ilavesi karışımı bozmayacak şekilde (layering) yapıldı, 20-30 dakika beklenildi ve sperm toplandı. Oosit toplama ve mikroenjeksiyon öncesi rutin işlemlerden sonra ICSI (intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu) uygulandı ve 18-20 saat sonra pronukleuslarının sayısı ve 48 saat ilerlemelerinin gelişim verileri karşılaştırmalı independent sample's t-testi istatistiksel metoduna göre yapıldı.

BULGULAR

Toplanan metafaz 2 oosit sayısı; Grup 1 için $7,5 \pm 2,1$ ve Grup 2 için $7,2 \pm 2,1$ oldu, bu iki değer istatistiksel olarak farklı yorumlanmadı. Fertilizasyon yüzdesi ise Grup 1 için $52,5 \pm 15,4$ ve Grup 2 için $66,6 \pm 19,0$ olarak hesaplandı ve p değeri 0,03 bulunarak istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Santrifüjlü yöntemde 80 adet oositten 26 adet pronukleus oluştu, pronukleus oluşma oranı %32,5 iken (Şekil

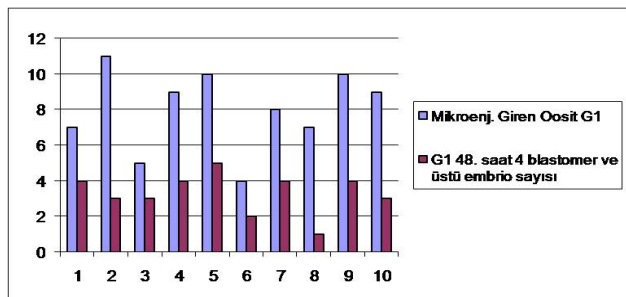
1), santrifüzsüz yöntemde 77 adet oositten 44 adet pronukleus oluştu, oran % 57'ye çıkmıştır (Şekil 2). Santrifüjlü yöntemde 80 oositten 33 adet 4 blastomer ve üstü embriyo oluştu, oran %41,25 iken (Şekil 3), santrifüzsüz yöntemde 77 oositten 48 adet 4 blastomer ve üstü embriyo oluştu, oranı %62,33'ye çıkmıştır (Şekil 4).

TARTIŞMA

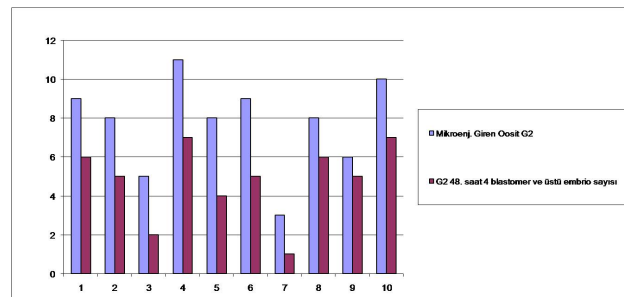
Yardımcı üreme tekniklerinde sperm dondurma ve sonraki çözündürme prosedürlerinde sperm motilitesi azalmaktadır (7,8). Kriyoprotektan media uzaklaştırıldığında ve santrifüj yapıldığında motilite daha da düşmektedir (8). Sperm DNA bütünlüğü fertilizasyon için en fazla önem taşıyan kriterlerden biridir (9). IVF ve ICSI'da kromatin defektlerindeki artış ile fertilizasyon oranında ters orantı bulunmaktadır. Dekondanse sperm yumurtaya enjeksiyonu düşük fertilizasyon ve implantasyon oranları ile sonuçlanmaktadır (10).

100 g, 300 g ve 500 g'de 10'ar dakika yapılan santrifüj denemeleri sonucu 100 g ve 300 g'de motil spermelerin sayısının belirgin şekilde fazla olduğu belirtilmiştir. Santrifüj işlemini elimine edebilen daha etkili kriyopreservation teknikleri ve hazırlama metotlarına ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (8). Percoll gradient ve swim up tekniğinin karşılaştırıldığı çalışmalarda swim up metodunun normal semeni hazırlamak için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır (11).

Sperm hazırlığında santrifüjlü ve santrifüzsüz iki yöntem denenen bir araştırmada, santrifüzsüz yöntemde daha fazla motil spermatozoa



Şekil 3. Santrifüjlü yöntemde 4 blastomer ve üstü embriyo dağılımı



Şekil 4. Santrifüzsüz yöntemde 4 blastomer ve üstü embriyo dağılımı

ve zamandan tasarruf elde edilmiştir. Ayrıca santrifüjün oluşturduğu stresin sperm canlılığını etkilediği belirtilmiştir (12). Tekrarlayan santrifüj yöntemlerinin spermatozoa hazırlamada kullanılmaya devam edilmesi halinde stratejilerin DNA hasarını en aza indirmeye yönelik olması gerektiği önerilmektedir (13).

İdeal sperm hazırlama metodu maliyet açısından en uygun ve geniş hacimde ejakülat toplama işlemine izin vermelidir ve elde edilebilir spermatozoa oranını en yüksek seviyeye çıkarmalıdır. Çalışmamızda santrifüzsüz yöntemle hazırlanan spermlele fertilizasyon ve 4 blastomer ve üstü embriyo oluşum sayısı oranında artış olduğu ortaya çıkmıştır. Çalışmamızın sonucunda santrifüj işlemini tamamen egale edecek prosedürlerin geliştirilmesi ve uygulanmasının gerektiği düşünülmektedir.

Direkt swim-up yönteminin in-vivo sperm seleksiyonuna benzerlik göstermesi, düşük decondanse oranlarına sahip olması, daha az zaman alması ve laboratuvar yükünü hafifletme gibi avantajlara sahiptir.

KAYNAKLAR

1. Björndahl L, Mohammadieh M, Pourien M, Söderlund I, Kvist U. Sperm DNA damage; clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*. 2006;175:495-500.
2. Baker AM, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa; methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:67.
3. Funke S, Flach E, Kiss I, Sándor J, Vida G, Bódis J et al. Male reproductive tract abnormalities: more common after assisted reproduction? *Early Hum Dev*. 2010;86:547-50.
4. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*. 1988;9:367-76.
5. A.Russo, N.Troncosa, F.Sanchez, J.A. Garbarino, A.Vanella. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzopyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life Sciences*. 2006;78:1401-1406.
6. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage; clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*. 2006;175:495-500.
7. Georgiou I, Syrrou M, Stefanidis K, Konstantelli M, Lolis D. Effect of Percoll gradient and swim-up preparation on the chromomycin A3 staining of normal and abnormal semen samples. *Andrologia*. 1998;30:101-4.
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(1):33-8.
9. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*. 2000;15:61-8.
10. Sakkas D, Umer F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1996;11:837-43.
11. Erel CT, Senturk LM, Irez T, Ercan L, Elter K, Colgar U et al. Sperm-preparation techniques for men with normal and abnormal semen analysis. A comparison. *J Reprod Med*. 2000;45:917-22.
12. Sills E, Wittkowski KM, Tucker MJ, Perloe M, Kaplan CR, Palermo GD. Comparison of centrifugation and noncentrifugation-based techniques for recovery of motile human sperm in assisted reproduction. *Arc Androl*. 2002;48:141-5.
13. J Twigg, DS Irvine, P Houston, N Fulton, L Michael, RJ Aitken. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod*. 1998;4:439-45.