

Normozoospermik ve Oligozoospermik Erkeklerde Dondurma Çözdürme İşleminin Sperm DNA Kondensasyonuna Etkisi

Emine Aksoy¹, Alanur Menekşe Güven¹, Müşerref Sultan Mermer¹,
Gökhan Cüce², Hasan Ali İnal¹

¹Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi, Konya

²Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Konya

ÖZET:

Amaç: Sperm kriyoprezervasyonu yardımcı üreme tedavilerinde sık kullanılan bir yöntemdir. Dondurma çözme sonrası spermilerin en az zarar görmesi hedefidir. Çalışmamızda; sperm dondurma çözme işlemi sonrası sperm DNA kondensasyonunda değişim olup olmadığını incelemek, varsa bu değişimin azalan motilite ile korelasyonu olup olmadığını belirlemek, ayrıca semeni raw hali veya yıkama sonrası dondurmanın motilite, morfoloji ve DNA kondensasyonu üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Hastanemiz Tüp Bebek Ünitesine başvuran hastalardan 15 normozoospermili ve 15 oligozoospermili hasta çalışma kapsamına alınmıştır. Hastaların semeninde hem raw haline, hem de gradient metodu ile yıkanmış numuneye motilite, morfoloji ve DNA kondensasyon değerlendirmeleri yapılmıştır. Daha sonra Sperm Cryoprotect II solusyonu ile örneklerimize dondurma işlemi yapılmıştır. 15 gün sonra spermier çözündürölüp aynı parametrelerde tekrar çalışılmıştır.

Bulgular: Normozoospermik ve oligozoospermik gruplarda yıkama işlemi raw spermilere göre anlamlı derecede progresif motiliteyi arttırmıştır. Kondensasyon ve morfoloji değerleri açısından normozoospermik ve oligozoospermik gruplarda herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Dondurma işlemi; raw spermierde ve yıkama sonrası spermierde, hem normozoospermik hem de oligozoospermik gruplarda progresif motiliteyi anlamlı derecede azaltmış, kondensasyon ve morfolojiye anlamlı bir etkisi olmamıştır.

İletişim Bilgileri:

Sorumlu Yazar: Uzm.Dr. Emine Aksoy

Yazışma Adresi: Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi, Konya – Türkiye

Tel: 0 216 3910680

Email: emineaksoydr@yahoo.com.tr

Makalenin Geliş Tarihi: 15.04.2013

Makalenin Kabul Tarihi: 30.08.2013

Yorum: Sperm dondurma çözme sonrası motiliteyi daha iyi koruyabilmek için yıkanmış spermier dondurulmalıdır. Dondurma çözme sonrası sperm DNA kondensasyonunda literatürdeki tersine değişim olmaması bizce anlamlıdır.

Anahtar Kelimeler: Sperm, Dondurma, Kondensasyon

The effects of freezing and thawing process on sperm DNA condensation in oligozoospermic men and normal controls

ABSTRACT

Objective: Sperm cryopreservation is a commonly used method in assisted reproductive treatments. In this process, during freezing and thawing, handling of specimens is crucial to preserve the viability. In this study, we aimed to evaluate the changes in the sperm concentration and to determine the correlation between motility, morphology, and DNA condensation parameters and decreased motility during freezing and thawing. Our secondary aim was to reveal the potential effects of freezing on the semen parameters in raw or washed state.

Methods: 15 oligozoospermic patients with 15 controls with normal sperm parameters were recruited to study in Konya Education and Research Hospital IVF Clinic, Turkey. Motility, morphology, and DNA condensation were analyzed in both raw and washed sperm samples by gradient method. Sperm cryoprotect II solution was used to freeze the samples. After 15 days all samples were thawed and the same parameters were studied afterwards.

Results: Compared with raw samples, washing increased the progressive motility in both groups. Condensation and morphologic parameters were not significantly different. Freezing process in raw specimens decreases the progressive motility

in both groups. However, no significant effect was observed on condensation and morphology.

Conclusion: *To protect the motility after thawing, washed sperms could be a better option during freezing process. Interestingly, in our study group, we failed to demonstrate any significant effect on DNA condensation in both groups.*

Keywords: *Sperm, freeze, condensation*

GİRİŞ

Sperm dondurma-çözdürme (kriyoprezervasyon) işlemi yardımcı üreme tedavilerinde sık kullanılan bir yöntemdir. Radyoterapi sonrası, kemoterapi sonrası, bazı kanserlere bağlı ve invaziv cerrahi sonucu ejakulatuar fonksiyon bozukluğu ile testiküler yetmezlik oluşabilir. Bu gibi durumlar sonrası çiftlere çocuk sahibi olma konusunda yardımcı olabilecek tek ispatlanmış metot semen kriyoprezervasyonudur (1). Kriyoprezervasyon işleminde spermier kriyoprotektan kullanılarak dondurulup, -196 °C sıvı azot içinde yıllarca saklanabilir. Daha sonra çözdürme işlemi sonrası spermier intrauterin inseminasyon (IUI), invitro fertilizasyon (IVF) ya da intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) işlemi için kullanılabilir. Kriyoprezervasyon sırasında oluşan fiziksel ve kimyasal stres; spermierin membran lipid yapısını, sperm hareketliliğini, canlılığını ve akrozom durumunu olumsuz etkiler. Tüm bu değişimlerin sonucunda spermierin fertilizasyon kabiliyeti azalır. İnsan spermier için dondurma hasar mekanizmaları birçok etkene bağlıdır. Dondurma ve çözme sırasında birçok hasar oluşabilir: termal şok, hücre içi buz kristalleri oluşumu, hücresel dehidrasyon oluşumu, tuzların yoğunluğunda artış, oksidatif stres ve ozmotik şok (2). Kriyoprezervasyon işleminde öncelikli hedef spermierleri dondurma ve çözmenin zararlı etkilerinden korumaktır. Sperm kriyoprezervasyonu sonrasında çözölen örnek ile taze örnek arasındaki en belirgin farklılık kriyoprezervasyon sonrasında motilitenin azalmasıdır. Özellikle şiddetli oligospermier olgularında bu durum daha da belirgindir. Bu nedenle kriyoprezervasyon tekniklerindeki çalışmalar motilite ve canlılık oranlarını arttırmaya yöneliktir. Dondurma ve çözdürme sonrası

sperm motilite oranı en az % 50 üzeri korunmalıdır. Dondurma çözdürme sonrası spermde şiddetli morfolojik anomalierin daha yüksek olduğu görölmüştür. Fertil bireylerde semen kriyoprezervasyonu ve çözölmeleri sonrasında normal yapılarda azalma olduğu, büyük başlı spermierin oranının arttığı ancak boyun bölgesi hasarlarında ise düşüş olduğu belirtilmiştir. Sperm yıkama işlemi sonrası dondurulan örneklerde ise normal yapıların azaldığı, amorf baş ve büyük başlı yapıların arttığı boyun bölgesi kusurlarında ise azalma olduğu tespit edilmiştir. İnfertil erkeklerde ise hem semen hem de hazırlanan spermierin kriyoprezervasyonu sonrasında, fertil erkeklerle oranla normal morfolojiye sahip sperm yüzdesinde daha yüksek oranlarda düşüş olmuştur. (3,4,5)

Spermatozoa nükleer kondansasyonu oluşurken DNA yapısındaki histonlar yerini protaminlere bırakır. Böylece kromatin yoğunlaşır, spermatozoa DNA'sı daha sağlam olur ve sabitliği sağlanarak mutajenlerden korunur. Sperm DNA kondensasyondaki bozulma IVF uygulamalarında, ICSI işlemlerinde başarıyı olumsuz etkiler (6,7,8). Bazı çalışmalar kriyoprezervasyonun sperm DNA hasarına yol açtığını belirtmektedir. (1) DNA hasarının temelinde oksidatif stres pozitif bir etken olarak görölmüş, reaktif oksijen radikalleri ise düşük semen kalitesi ile ilişkili olarak bulunmuştur. Bazı çalışmalar ise sperm DNA'sının dondurma çözdürme işleminden etkilenmediğini yönündedir. (9,10) Sperm DNA kromatinini araştıran birçok yöntem vardır. Tüm bu testler histon ile bağlanan anilin blue veya nükleik asit ile bağlanan acridin orange, cromomycin boyalarını kullanırlar. Daha sonra flow sitometrisi ile histolojik olarak değerlendirilirler. (11) Bu çalışmanın amacı semen ve hazırlanmış spermier için; dondurma çözme işlemi sonrası sperm DNA kondensasyonunda değişim olup olmadığını incelemek, varsa bu değişimin azalan motilite ile ilişkisi olup olmadığını belirlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

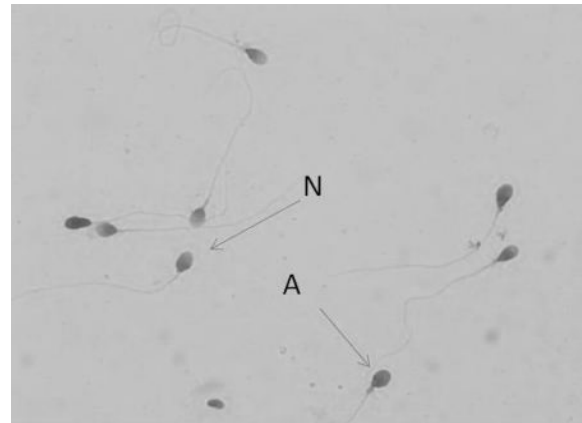
Bu çalışmada Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezine başvuran hastalardan 15 normozoospermili ve 15 oligozoospermili hasta çalışma kapsamına

alınmıştır. Çalışmanın etik kurul onayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır. Hastaların 3 günlük cinsel perhiz süresini takiben masturbasyonla steril kaba alınan semenleri likefaksiyon süresini takiben semen analizi için değerlendirmeye alındı. Volüm, renk, vizkosite değerlendirmesi yapıldıktan sonra makler kamerasına damlatılan numune ışık mikroskobunda sperm sayımı ve motilite için değerlendirildi. Morfoloji değerlendirmesi için hazır diff-quick boyası; DNA kondensasyon değerlendirmesi için hazırladığımız anilin blue boyası kullanıldı. Hazırladığımız preperatlar metil alkolde 15 dakika fiske edildikten sonra 35 dakika anilin blue boyası ile boyanıp birkaç kez % 95'lik etil alkole batırılıp kurumaya bırakıldı. Hazırladığımız preperatta 200 sperm hücresi değerlendirildi. Daha sonra numuneye; % 0,5 human serum albumin ilave edilmiş sperm hazırlama medyumunu Sil-Select Plus (FertiPro, Belgium) ile gradient metodu işlemi yapılarak, HEPES bazlı Fercult Flushing (FertiPro, Belgium) medyumunu ile yıkandı. Hazırlanmış spermle- re motilite, morfoloji ve DNA kondensasyon değerlendirmesi yapıldı. Motilite değeri- nde için spermle- r; progresif motil (PM), nonprogresif motil (NPM) ve İmmotil (IM) sperm olmak üzere üç grupta değerlendirildi. Değerlendirmeler WHO 2010 ilkelerine göre yapıldı. Daha sonra taze semene ve hazırlanmış spermle- re sıvı azot içinde saklanmak üzere hızlı dondurma (freezing) işlemi yapıldı. Çalışmamızda dondurma için optimize edilmiş düşük konsantrasyonda gliserol içeren Sperm Cryoprotect II (Biocare-Nidacon, Italy) solusyonu kullanıldı. Dondurma işlemi için hazırlanmış spermle- r az miktarda yıkama medyumunu içinde süspanse edildi. 3/1 oranında sperm cryo protec II ilave edilip karıştırıldı. Straw sperm süspansiyonu ile doldurulup kapatıldı. 1 saat buzdolabında bekletilen strawlar yatay bir şekilde 30 dakika sıvı nitrojenin yaklaşık 1 cm üzerinde nitrojen gazında tutuldu ve daha sonra strawlar hızlı bir şekilde sıvı nitrojene bırakılıp depolandı. 15 gün sonra numuneler çözündürüldü. Çözme yönteminde straw tanktan çıkarıp 30 saniye 37 derecede bekletildi. Strawı kurulayıp üst ucunu keserek 5 ml yıkama medyumunu içinde karıştırıp 10 dak. 500 g'de santrifüj edip

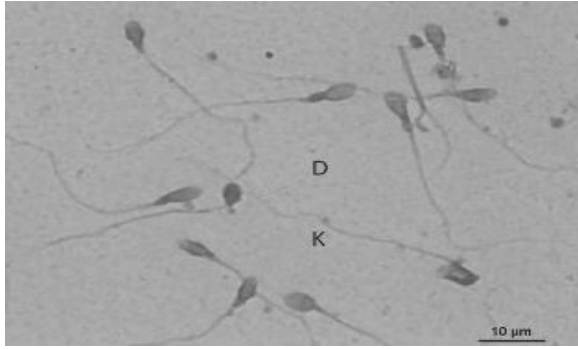
pelleti alındı. Daha sonra sperm motilitesi, morfolojisi ve DNA kondensasyonu için değerlendirme yapıldı. Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS for Windows 15.0 programında yapıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için One Way Anova Testi kullanıldı. Hangi gruplar arasındaki fark olduğunu bulmak içinse Tukey Testi ile değerlendirildi. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu

BULGULAR

WHO 2010 sperm değerlendirme kriterlerine göre motilite değerlendirmesi yapıldı. Her bir grup için sperm progresif motilite ortalaması tablo 1'de gösterilmiştir. Çalışmamızın sonucuna göre normozoospermik (Grup 1, Grup 2) ve oligozoospermik gruplarda (Grup 5, Grup 6) yıkama işlemi taze spermle- re göre anlamlı derecede progresif motiliteyi arttırmıştır. Dondurma işlemi; taze spermle- rde (Grup 3, Grup 7) ve yıkama sonrası spermle- rde (Grup 4, Grup 8), hem normozoospermik hem de oligozoospermik gruplarda progresif motiliteyi anlamlı derecede azaltmıştır. Bu istatistiksel olarak anlamlıdır. Diff-quick boyası ile boyanmış spermle- rde net bir şekilde sperm morfoloji değeri- nde değerlendirme yapıldı. WHO 2010 sperm değerlendirme kriterlerine göre 200 sperm hücresinde % 5 ve üzeri olanlar normal morfolojili, %5 altı olanlar anormal morfolojili sperm kabul edildi. (Şekil 1) Hem normozoospermi hem de oligozoospermi gruplarında dondurup çöz- dürme sonrası sperm normal morfolojisinde hafif bir azalma görülmüş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 1: Diffquick boyası ile boyanmış spermle- r (N: normal morfoloji, A: anormal morfoloji) FMBx 330



Şekil 2: Diffquick boyası ile boyanmış sperm (N: normal morfoloji, A: anormal morfoloji) FMBx 330

Anilin blue ile boyanmış preparatlarda sperm başında akrozom çekirdek oranı 2/3 oranında ve net bir şekilde (açık-koyu renk) değerlendirilebiliyorsa sperm DNA'sının kondanese olduğu söylenebilir. Dekondanese DNA'ya sahip spermde ise baş tamamen boyayı almıştır ya da 2/3 akrozom çekirdek oranı görülemiyordur (Şekil 2). Buna göre 200 sperm hücresinde yaptığımız değerlendirmede normozoospermik grupta sperm DNA kondensasyonu % 22,2 ve üzeri iken oligozoospermik grupta sperm DNA kondensasyonu % 14,2 ve altı değerde çıkmıştır. Dondurma sonrası DNA kondensasyonunda tüm gruplar için istatistiksel olarak fark bulunamamıştır (Tablo 1).

Tablo 1: Semen Kalite Değerleri

	PM	K	M
	Ortalama +SE	Ortalama +SE	Ortalama +SE
Grup1 (n=15)	40,5 ± 4,04 -b	23,7± 2,82-a	4,86± 0,55-a
Grup2 (n=15)	64,6 ± 7,63 -a	24,0± 2,75-a	4,33± 0,72-a
Grup3 (n=15)	6,93 ± 2,01 -c	22,4± 2,64-ab	3,80± 0,47-ab
Grup4 (n=15)	7,93 ± 1,46 -c	22,2± 2,55-ab	3,80± 0,55-ab
Grup5 (n=15)	28,8 ± 4,25 -b	13,0± 1,38-c	2,13± 0,29-bc
Grup6 (n=15)	37,7 ± 8,80 -b	14,2± 1,88-bc	2,13± 0,42-bc
Grup7 (n=15)	6,00 ± 0,37 -c	12,2± 1,44-c	1,66± 0,23c
Grup8 (n=15)	2,73 ± 1,56 -c	12,4± 1,72-c	1,86± 0,29-bc

Aynı sütunda farklı harfler birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farkı $P < 0,05$, 2 harf taşıyan sütunlarda ise birbirine benzer grupları ifade etmektedir ($P > 0,05$). PM: Progressif Motilite, K: Kondensasyon, M: Morfoloji, SE: Standart Hata

Grup 1: Normozoospermik taze numune
Grup 2: Normozoospermik yıkanmış numune

Grup 3: Normozoospermik dondurma sonrası taze numune
Grup 4: Normozoospermik dondurma sonrası yıkanmış numune
Grup 5: Oligozoospermik taze numune
Grup 6: Oligozoospermik yıkanmış numune
Grup 7: Oligozoospermik dondurma sonrası taze numune
Grup 8: Oligozoospermik dondurma sonrası yıkanmış numune

TARTIŞMA

Sperm kriyoprezervasyonu yardımıyla üreme alanında erkek fertilesinin korunmasında önemli bir yere sahiptir. Dondurma çözme işlemi sırasında oluşan dondurma hasarını en aza indirmek için optimalizasyon gereklidir. Bunlar; dondurmada önce sperm kalitesini geliştirme, sperm seçimi, optimal kriyoprotektanların kullanılması ve uygun çözme tekniklerinin uygulanması şeklinde sıralanabilir (12). Taze ve yıkanmış spermelerin kriyoprezervasyonu sırasında katalaz ilavesi ile sperm hareketliliği, canlılığı ve DNA bütünlüğü artırılabilir (13). Yıldız ve ekibi yaptıkları bir çalışmada fare spermlerinin dondurulmasının nükleer DNA bütünlüğüne, IVF ve invitro embriyo gelişimine etkilerini incelemişler. Gliserol içeriği yüksek kriyoprotektanla yaptıkları dondurmada sperm DNA bütünlüğünün korunduğunu görmüşler (9). Gliserol içerikli kriyoprotektan kullandığımız çalışmamız, literatür bilgisiyle uyumludur. Ozkavukcu ve ekibinin yaptıkları bir çalışmada kriyoprezervasyonun insan sperminin ultrastrüktürel morfolojisi ve sperm parametrelerine etkisini araştırmışlar. Dondurma çözme sonrası sperm motilitesinde ve morfolojisinde önemli azalma görmüşler. Özellikle zararlı etkilerin spermin plasmalemma, akrozom ve kuyruk kısmında olduğunu görmüşler (14). Nallella ve ekibinin farklı kriyoprezervasyon tekniklerini ve kriyoprotektanları karşılaştırdığı bir çalışmada çözme işlemi sonrasında tüm gruplarda % 50'ye yakın motilite kaybı olduğunu gözlemiştir (15). Sperm kromatin yapısının bütünlüğü fertilizasyon için çok önemlidir. Fortunato ve ekibi dondurulmuş çözündürülmüş spermelerde anilin blue boyası ile nükleer DNA yapısını incelediklerinde oligospermili hastalarda sperm DNA hasarının ve şiddetli morfolojik anomalilerin daha yüksek olduğunu görmüşler. Özellikle 90 gün ve üzeri dondurma süresinde, kromatin dekonde-

yonunun daha çok arttığı sonucunu bulmuşlar (4). Oligoastenoteratospermili hastalarda DFI (DNA fragmentasyon indeksi) oranı fertil erkeklerle göre daha yüksek olup, fertilizasyon oranı anlamlı oranda düşüktür (16). Kalthur ve ekibi teratospermili 44 hastada DNA integritesi üzerine kriyonun etkisini incelemişler. Teratospermili hastalarda dondurma çözme sonrası DNA hasarının üç kat daha fazla olduğunu ve anormal morfolojili spermilerin kriyo hasarına daha yatkın olduklarını görmüşler (17). Ahmad ve ekibi fertil ve infertil hastalarda dondurmanın sperm DNA bütünlüğü üzerine etkilerini araştırmak için bütün örnekleri swim-up ve percoll dansite gradient metodu ile hazırlayıp dondurmuşlar. Çözdürme işlemi sonrası bütün örneklerde alkalın comet assay kullanılarak sperm DNA integritesini belirlemişler. Fertil hasta grubunda DNA bütünlüğü nonfertil gruba göre daha yüksek bulunmuş.

Percoll dansite gradient metodu ile hazırlanan spermelerde swim-up metodu ile hazırlanan spermelere oranla sperm kromozom hasarı daha az görülmüş (5). Nassira ve ekibinin yaptıkları bir çalışmada infertilite kliniğine başvuran 29-47 yaş arası 15 erkek hastadan alınan semen örneğinde kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası gerçekleştirilen TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) ve Oxy-DNA analizleri ile DNA fragmentasyonu ve DNA oksidasyonu incelenerek, insan semeninin sıvı nitrojen ile kriyoprezervasyonunun sperm motilitesi, canlılığı ve DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerini araştırmışlar. Azoospermi ve ciddi oligozoospermili hastalar çalışma dışında bırakılmış. Likefiye semen örnekleri %15 gliserol içeren Sperm Freeze'in kullanıldığı standart protokol ile dondurulmuş. Minimum kriyoprezervasyon süresi 7 gün olarak belirlenmiş. Kriyoprezervasyon sonrası semen örnekleri 15 dakika oda sıcaklığında çözdürülmüş ve hızlıca örnekler motilite, canlılık ve DNA fragmentasyonu ve oksidasyonu açısından analiz edilmiş. Çalışma grubunda 5 olguda normal semen analizi elde edilirken 10 olguda anormal semen analizi elde edilmiş. Kriyoprezervasyon sonrası sperm motilite ve canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmış. DNA fragmentasyonu bakımından kriyop-

rezervasyon öncesi anormal grupta normal gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yükseklik izlenirken, çözünme sonrası bu anlamlı fark ortadan kaybolmuş. Çalışma grubunda kriyoprezervasyon sonrası fragmente DNA'ya sahip hücre oranı artmış. Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası 8-oksoguanin değerleri açısından her iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiş. Çalışma grubunda DNA oksidasyonu gösteren sperm oranı kriyoprezervasyon sonrası istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş. Bu çalışma kriyoprezervasyonun sperm DNA'sı üzerinde DNA fragmentasyonu ve oksidasyonuna yol açtığını göstermekle birlikte, kriyoprezervasyon sonrası, çalışma grubunda hem DNA fragmentasyonunda hem de oksidasyonunda anlamlı artış izlenirken, normal ve anormal semen grupları arasında sadece DNA fragmentasyonu, anlamlı fark göstermiştir. Kriyoprezervasyon, yardımcı üreme tekniklerinde faydalı bir araç olmasına rağmen sperm kompetansı üzerinde olumsuz etkilere sahiptir sonucunu bulmuşlar (1). Ngamwuttiwong ve ekibi sperm kromatini üzerine kriyo hasarını göstermek için yaptıkları çalışmada; sperm motilitesi, viabilitesi, morfolojisi ve kromatin integritesini incelemişler. Çözme sonrası bu parametrelerde anlamlı azalma olmuş. Sadece normal morfolojili sperm sayısında farklılık görülmemiş (18).

Somsin ve ekibi spermleri dondurup sperm DNA integritesi üzerine dondurmanın etkisini sıvı nitrojen ve bilgisayar programlı dondurma yöntemi ile araştırmışlar. Her iki yöntemde de dondurma çözme sonrası sperm vitalitesi, morfolojisi, motilitesi ve DNA integritesi anlamlı olarak azalmış (169).

Eilish ve arkadaşları 40 hasta üzerinde comet assay ve tek hücreli gel elektroforezi kullanarak yaptıkları bir çalışmada, semen kriyoprezervasyonu ve sperm hazırlamasının motilite parametreleri ve DNA integritesine etkisini araştırmışlar. Dondurma öncesi ve sonrası taze spermlerle hazırlanmış spermleri incelediklerinde taze spermlerin dondurmanın zararlarına karşı daha dirençli olduğunu göstermişler (20). Yine Eilish ve arkadaşları fertil ve infertil erkeklerin ejakülat sperminde kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası sperm morfolojisini, DNA bütünlüğünü değerlendirmişler. 17 fertil ve 40 infertil

erkek semeninde yaptıkları çalışmada fertil erkeklerde semende ve yıkanmış spermelerde dondurup çözme sonrası DNA bütünlüğünün etkilenmediğini görmüşler. İnfertil erkeklerin sperm DNA'sında ise dondurma-çözme sonrası anlamlı hasar olduğunu görmüşler. Ayrıca kriyoprezervasyonun fertil ve infertil erkeklerin semeninde ve hazırlanmış numunesinde sperm morfolojisi üzerinde zararlı etkisi olduğunu görmüşler (21).

Kromatin kondensasyonu dondurma hasarını değerlendirmede önemli bir parametredir. Hammadeh ve arkadaşları 20 fertil, 72 subfertil hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada; dondurma çözme işleminin sperm DNA kromatin stabilitesi, sperm morfolojik değişiklikleri ve membran bütünlüğü üzerine etkilerini araştırmışlar. Anilin blue boyası ile kromatin kondensasyonunu ve sperm morfolojisini incelemişler. Dondurma çözme işleminin sperm morfolojisini ve kromatin yapısını anlamlı olarak azalttığını bulmuşlar. Buna bağlı olarak fertilizasyon oranının düştüğünü görmüşler (22). İnsan sperminde dondurup çözme sonrası kromatin değişimleri olmaktadır. Royere ve ekibi dondurma çözme sonrası sperm fertilizasyon kabiliyetinde ciddi kayıp ile kromatin değişimleri arasındaki ilişkiyi araştırmak için yaptıkları bir çalışmada akridin orange boyası ve Feulgen-DNA boyası ile kantitatif mikrospektrofotometreyi kullanarak sperm nükleer değişimlerini incelemişler. Dondurup çözme sonrası sperm DNA hasarı ve buna bağlı olarak fertilizasyon yeteneğinde azalma olduğunu görmüşler (23). Çalışmamızda literatür bilgisiyle uyumlu olarak hem normozoospermili hemde oligozoospermili grupta yıkama sonrası progresif motilitenin arttığı görülmüştür. Dondurma işlemi hareketli sperm oranını azaltmaktadır. Ayrıca literatür bilgisinin tersi olarak dondurma çözme işlemi sonrası tüm gruplarda sperm morfolojisi ve DNA kondensasyonunda anlamlı bir değişim görülmemiştir.

SONUÇ

Yıkanmış spermelerde motilite artmaktadır. Dondurma işleminin motiliteye olan azaltıcı etkisini hafifletmek için, taze semen yerine yıkanmış spermelerin dondurulması ile moti-

lite daha iyi korunabilir. Dondurmadan önce sperm hazırlama metotları ile en iyi spermeleri elde edip, en ideal dondurma şartlarını sağlayıp uygun çözme tekniklerinin uygulanması sperm motilitesi, morfolojisi ve sperm DNA bütünlüğünün dondurma çözme işleminden en az zarar görmesine sebep olacaktır. Önerimiz, farklı dondurma teknikleri ve kriyoprotektanlar kullanarak, çok merkezli daha çok hasta katılımlı bir çalışma ile sperm DNA bütünlüğüne dondurmanın etkilerinin araştırılması yönündedir.

KAYNAKLAR

1. Nassira Zribi, B.Sc., Nozha Feki Chakroun, M.D., Henda El Euch, M.D., Jalel Gargouri, M.D., Ali Bahloul, M.D., and Leila Ammar Keskes, M.D. *Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. Fertility and Sterility* 93(1), 2010;159-166
2. J.C. Martínez-Soto et al, *Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. Cryobiology Model 5G* Page:1-6, 2011.
3. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. *Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. Hum Reprod.* 2001 Jun;16(6):1191-9.
4. Fortunato A, Leo R, Liguori F. *Effects of cryostorage on human sperm chromatin integrity. Zygote.* 2012 Mar 8:1-7.
5. Ahmad L, Jalali S, Shami SA, Akram Z, Batoon S, Kalsoom O. *Effects of cryopreservation on sperm DNA integrity in normospermic and four categories of infertile males. Syst Biol Reprod Med.* 2010 Feb;56(1):74-83.
6. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. *Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Reviews of Reproduction* 1999, 4:31-7.
7. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi U, Shoukir Y, Campana A: *Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod* 1998, 13:11-9.

8. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001; 16 (10): 2160-5
9. Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L and McKerlie C. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the Mouse. *Reproduction*, March 1, 2007; 133 pg585-595 .
10. Marlea DS, Tarozzi N, Nadalini M, and Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances Urology* 2012;Pg 12.
11. Gülekli R. Üreme Endokrinolojisi Teknikleri ve Cerrahisi, Üreme Tıbbi Derneği, 2008, Sayfa377.
12. Chen Y, Liu RZ. Cryopreservation of spermatozoa. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2007 Aug; 13(8):734- 8.
13. Moubasher AE, El Din AM, Ali ME, El-Sherif WT, Gaber HD. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia*. 2012 May 16. doi: 10.1111/j.1439-0272.
14. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, and Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008 August; 25(8): 403–411.
15. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril*. 2004 Oct; 82(4):913-8.
16. Chi HJ, Chung DY, Choi SY, Kim JH, Kim GY, Lee JS, Lee HS, Kim MH, Roh SI. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clin Exp Reprod Med*. 2011 Mar; 38(1):10-7.
17. Kalthur G, Adiga SK, Upadhya D, Rao S, Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril*. 2008 Jun; 89(6):1723-7. Epub 2007 Oct 22.
18. Ngamwuttiwong T, Kunathikom S. Evaluation of cryoinjury of sperm chromatin according to liquid nitrogen vapour method. *J Med Assoc Thai* 2007; 90 (2): 224-8
19. Somsin Petyim M.D, Rounsins Chavaratana M.D, Somboon Kunathikom M.D, Pitak Laokirkkiat M.D, Japarath Prechapanich, M.D. Freezing Effect on Post-Thawed Sperm Characteristics Especially Sperm DNA Integrity Comparing between Liquid Nitrogen Vapour and Computerized Program Freezer. *Siriraj Medical Journal* vol: 59, NO:6, 2007
20. Eilish T Donnelly, Ph D, Neil McClure, MD, Sheena E.M Lewis, PhD. Cryopreservation of human semen and prepared sperm effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*. Nov; 76 (5) :892 -900. 2001
21. Eilish T Donnelly, E Kristine Steele, Neil McClure and Sheena EM Lewis. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction*, Volume 16, No: 6 .Pp. 1191-1199, 2001.
22. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Biol Reprod. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl*. 1999 Jun; 22(3):155-62.
23. Royere D, Hamamah S, Nicolle JC and Lansac J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *International Journal of Andrology*, 1991.14: 328–332.