

Kriyoprezervasyonun Sperm Malondialdehid Düzeyi ve Hareketine Etkisi

The Effect of Cryopreservation on Sperm Malondialdehyde Levels and Motility

A. Görkem Mungan

Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye
University of Nijmegen, St. Radboud Hospital IVF Laboratory, Nijmegen, Holland

ÖZET

Sperm kriyoprezervasyonu, çeşitli onkolojik ve /veya immünolojik hastalıklar ve bunların tedavilerinden kaynaklanabilecek fertilizasyon problemlerinde, hastanın spermlerinin canlılıklarını yitirmeden dondurularak saklanması işlemidir. Ancak, bu işlem sonrasında spermlerin hareketinde azalma, hücre hasarı ve serbest oksijen radikallerinde artış olduğu bildirilmektedir. Biz çalışmamızda kriyoprezervasyon sonrası sperm hareketine olumsuz etkinin muhtemel oluş mekanizmasını araştırdık.

Bu prospektif çalışmada, kriyoprezervasyon amacıyla sperm veren germ hücreli testis tümörü olan 30 hastada dondurma işlemi uygulanmadan önce ve dondurulduktan bir ay sonra çözülen örneklerde lipid peroksidasyonu son ürünü olan malondialdehid (MDA) düzeyleri Kobayashi metodu ile, sperm hareketi ise Makler kamera kullanılarak ölçüldü.

Kriyoprezervasyon sonrasında MDA düzeyi artarken ($p < 0.005$), sperm hareketleri ise azaldı ($p < 0.0001$). Spearman korelasyon analizine göre, MDA düzeylerindeki artışın sperm hareketinde azalmayla korele olduğu saptandı (kriyoprezervasyon öncesi $p = 0.03$, kriyoprezervasyon sonrası $p = 0.001$).

Kriyoprezervasyonun lipid peroksidasyonunu artırarak sperm hareketini azaltıcı bir etkiye yol açtığını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Kriyoprezervasyon, sperm, malondialdehid, hareket

ABSTRACT

Objective: Sperm cryopreservation is the procedure of freezing sperms without losing their liveliness in various oncological and/or immunological diseases and fertilization problems arising from the treatments of these diseases. However, a decrease in sperm motility, cell injury and an increase in free oxygen radicals have been reported after this procedure. In our study, we investigated the probable mechanism of negative effect in motility after cryopreservation.

Material and Methods: In this prospective study, we examined sperm motility, malondialdehyde (MDA) levels and the effects of MDA levels, which is the last product of lipid peroxidation, on motility in samples of 30 testis cancer patients who donated sperms for cryopreservation before freezing and melted after one month.

Bu çalışma, II. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Results: After cryopreservation, while the MDA levels increased ($p < 0.005$) sperm motility decreased ($p < 0.0001$). According to Spearman correlation analysis, there was a correlation between the increase in MDA levels and the decrease in the sperm motility (before cryopreservation $p = 0.03$, after cryopreservation $p = 0.001$).

Conclusion: We suggest that cryopreservation causes a decreasing effect in sperm motility by increasing lipid peroxidation.

Key Words: Cryopreservation, sperm, malondialdehyde, motility

GİRİŞ

Onkolojik ve /veya immünolojik hastalıklar ve tedavilerinden kaynaklanabilecek fertilitasyon problemlerinde, gelecekteki çocuk arzusu durumunda kullanılmak üzere hastanın spermlerinin saklanmasına gerek duyulur. Bu saklama işlemi ise kriyoprezervasyon yöntemi ile -196° C'de dondurularak yapılmaktadır (1). Kriyoprezervasyon amacıyla sıvı azot içine alınan spermlerde bazı hasarlar meydana gelebilir. Bu hasarın oluş mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır (2). Kriyoprezervasyon sonrası normal donörlerden alınan spermlerin sadece %65-70 kadarının artifisiyel inseminasyon için yeterli harekete sahip olduğu gösterilmiştir (3). Kriyoprezervasyon sırasında semendeki hücresel yapıların serbest oksijen radikali (SOR) ürettiği ve bunların sperm hareketi ile ovumla etkileşmeyi azalttığı ileri sürülmektedir (4,5).

Bu çalışmada kriyoprezervasyonun lipid peroksidasyon son ürünlerinden malondialdehid (MDA) düzeyi ve bunun sperm hareketi üzerine olası etkisi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya germ hücreli testis tümörü tanısı almış ve kriyoprezervasyon yapılması kararlaştırılmış 30 donör dahil edildi. Bu hastaların hepsine cerrahi olarak retroperitoneal lenf nodu diseksiyonu yapılması, radyoterapi veya kemoterapi verilmesi planlanmaktaydı. Hastaların ortalama yaşı 27.5 yıl (19-38 arası) idi.

Örneklerin Toplanması: Semen örnekleri 48-72 saatlik seksüel perhiz sonrası masturbasyonla elde edilerek steril, kapaklı polistren kaplara toplandı. Örnekler 37° C'de

30 dakikalık likefaksiyon süresini takiben rutin semen analizine alındı.

Hareket değerlendirilmesi: Olympus marka mikroskopla X20 büyütmede Makler Sperm sayım kamerası kullanıldı. Spermiler ileri hızlı, ileri yavaş, yerinde hareketli ve hareketsiz olarak 4 gruba ayrıldı.

Sperm zenginleştirilmesi: Seminal plazmaya Percoll (Pharmacia, Sweden) eklenerek, spermeler iki basamaklı gradiyent farkı (%40-80) uygulanması ile zenginleştirildi. Steril Pasteur pipeti ile alınan 2-3 ml %80'lik Percoll üzerine aynı hacimdeki %40'lık Percoll birbirine karıştırmadan dikkatlice yayıldı. Daha sonra 1-2 ml likefiye semen örneği tabakalar birbirine karışmayacak şekilde yayılarak oda ısısında 300 g'de 18 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant pelletle karıştırmamaya özen gösterilerek atıldı. Pellet kısmı 5 ml. Biggers Whitten Whittingham (BWW) ile resuspanse edildi. Daha sonra 300 g'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkandı. Pellet kısmı ayrılarak 0.3 ml. BWW ile sperm sayısı en fazla mililitrede 20 milyon olacak şekilde resuspanse edildi (5). Bu şekilde hazırlanan örneklerde sayı, hareketlilik ve MDA ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar kriyoprezervasyon öncesi olarak değerlendirildi. Kalan örneklerle kriyoprezervasyon işlemi uygulandı.

Spermlerde MDA ölçümü: Spermlerdeki lipid peroksidasyonunun ölçümünde Kobayashi metodu kullanıldı (6). Bu metoda göre, zenginleştirme sonrası 0.2 ml alınan sperm pelletleri 2 ml. buz ısısında 30 mM imidazol tamponlu salin (pH:7.3) ile resuspanse edildi. Her bir örnek üzerine 750 µl. tiyobarbitürik asit reaktifi (100 ml. distile suda 0.67 g TBA ve 0.5 g NaOH çözüldü ve üzerine 100 ml. glasiyal asetik asit eklendi.)

konuldu. Tüpler alüminyum folyo ile kaplanarak 100° C'de su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Soğuduktan sonra her bir tüpe 3 ml. n-butanol eklenerek MDA eklendi. Tüpler 10 sn. vortekslelendikten sonra 500 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı alınarak reaksiyon sonucu oluşan pembe rengin 535 nm.'de absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü (Shimadzu spectronic 200 UV, JP). MDA'nın spesifik absorbans koeffisienti ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) kullanılarak bulunan absorbanslara karşılık gelen değerler hesaplandı. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

Kriyoprezervasyon: Kriyoprezervatif olarak gliserol kullanıldı. Gliserol ile zenginleştirilen örnekler 1:1 oranda iyice karıştırıldı. Daha sonra 0.5 ml hacimli her hasta için farklı renk kombinasyonları içeren Strawlara alınan sperm karışımları ısı programlı bilgisayar kontrollü biyolojik dondurucuya yerleştirildi. Kriyoprezervasyon programı 24° C'den başlanarak -5° C/dk olacak şekilde kontrollü olarak ısı düşürülmesi (Cryotech, Kryo 10 series controller model 10-20, U.S.) yapılarak ısı -80° C'ye ulaşıldı. Daha sonra hazırlanan örnekler, sıvı azot tankında soğuk buhara tutularak aniden ısıları -120° C'ye düşürüldü ve hemen arkasından tanka daldırılarak saklama ısıları olan -196° C'ye indirilmeleri sağlandı. Bir ay süresince örnekler sıvı azot tankında saklandı.

Çalışmamızda Sigma marka ya da eş değeri kabul edilen kimyasallar kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS for Windows 10.0 istatistik paket programı kullanılarak değerlendirildi. Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası parametrelerin karşılaştırılmasında paired t-testi

ve hız ile MDA düzeyi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Spearman korelasyon analizleri kullanıldı. Sperm konsantrasyonunun olası etkisinin düzeltilmesinde parsiyel korelasyon analizi uygulandı. p değeri <0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların, kriyoprezervasyon öncesi sperm hareketi %61.3±22.5 iken; bu oran kriyoprezervasyon sonrası %19.8±17.5 olarak bulundu. Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası sperm hareketleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) idi (Tablo 1). Bu hastaların kriyoprezervasyon öncesi MDA düzeyleri ise 105.1±152.1 nmol/sperm iken; kriyoprezervasyon sonrası 186.6±129.33 nmol/sperm olarak saptandı (Tablo 1). Lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA düzeyleri karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.005$) fark bulundu. Kriyoprezervasyon öncesi ($\rho = -0.392$, $p = 0.03$) ve sonrasında ($\rho = -0.678$, $p = 0.001$) azalan hareket ile artan MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak negatif yönde anlamlı bir ilişki vardı. Sperm konsantrasyonunun olası etkisi düzeltildiğinde de, azalan hareket ile artan MDA düzeyleri arasında benzer bir korelasyonun olduğu izlendi. Her iki korelasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0.091$, $r = -0.452$).

TARTIŞMA

İnsanda, normal koşullar altında seminal plazmada lipid peroksidasyonu görülür ve süper oksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz / redüktaz gibi koruyucu enzim sistemleri ile bu zararlı etki önlenmeye çalışılır. Özellikle SOD, spermatozoaların lipid peroksidasyonundan korunmasında en önemli

Tablo 1. Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası hareket ile MDA düzeyleri (ortalama ± standart sapma).

Parametre	Kriyoprezervasyon öncesi (n:30)	Kriyoprezervasyon sonrası (n:30)	p değeri
İleri Hızlı Hareketli (% sayı)	61.3 ± 22.5	19.8 ± 17.5	< 0.0001
MDA (nmol/sperm)	105.1 ± 152.1	186.6 ± 129.33	<0.005

role sahiptir ve taze sperm örneklerinde en iyi yaşam ve hareket göstergesidir (7). Don-durulmuş semendeki spermatozoaların azalmış hareketlerinin fazla miktarda üretilen serbest oksijen radikalleri ile membran fosfolipidlerinin artan peroksidasyonuna bağlı olabileceğini ileri süren çalışmalar vardır (8,9). Kriyoprezervasyon sırasında -196° C'de canlı hücreler normal fizyolojik fonksiyonlarını yapamamaktadır ve koruyucu sistemleri çalışmamaktadır. Bu nedenle oluşabilecek hasarın DNA ve proteinler yoluyla tamiri de mümkün değildir. Hasarlanmış spermelerde MDA gibi lipid peroksidasyon son ürünleri artmaktadır. Yapılan çalışmalar; santrifüj, koruyucu ajanlar ve sperm zenginleştirme gibi ön hazırlıkta kullanılan yöntemlerin de MDA düzeylerinde bir artışa yol açabileceğini göstermektedir (10). Dolayısıyla, kriyoprezervasyon uygulanması sırasında lipid peroksidasyon son ürünlerinden biri olan MDA düzeyindeki artış, kriyoprezervasyonun kendisine bağlı olabileceği gibi ön hazırlık işlemlerine de bağlı olabilir. Griveau ve ark. sperm zenginleştirme tekniklerinden swim-up ile gradiyent farkından yararlanılarak yapılan tekniği karşılaştırdıklarında gradiyent farkı ile yapılan zenginleştirmede SOR daha az oluştuğunu ve hareketli spermatozoa sayısının daha çok olduğunu göstermişlerdir (11). Seçilen kriyoprotektanın da bizzat kendisi lipid peroksidasyonu yapabilir. Örneğin sık kullanılan Egg-yolk içeren dilüentlerde 100 g başına 147 mg demir (ferritinle bağlı veya serbest demir) bulunan ve askorbat eklenen koruyucular-da lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir (12). Spermelerin zenginleştirilmeden saklanması ise özellikle ölü spermelerin ve ejakulatta lökosit varlığının SOR üretimi için bir kaynak olması nedeniyle tavsiye edilmektedir (13,14). Öte yandan seminal plazmada antioksidan enzimler ve koruyucu proteinlerin varlığı lipid peroksidasyonu ve hareketin sürdürülmesi için olumlu faktörler olarak görünmektedir (15-17). Testisin germ hücreleri tümörünün semen parametreleri üzerine olumsuz etkisi muhtemeldir.

Yapılan çalışmalarda tek taraflı germ hücreli testis tümörü olan vakaların %25'inde spermatogenezde bozukluk saptanmaktadır ve özellikle sperm sayısında azalma izlenmektedir (18). Çalışmamıza dahil edilen hastaların sperm hareketliliği işlem öncesi 61.3 ± 22.5 olarak bulundu ve normal sınırlar içindeydi. Sperm sayısındaki farklılıkların MDA düzeylerine etkisi olabileceğinden bu muhtemel etkiyi kaldırmak için Percoll ile zenginleştirme yapılarak sperm sayısı en fazla mililitrede 20 milyon olacak şekilde resüspanse edildi. Böylece tümöre bağlı muhtemel spermatogenez bozukluğunun çalışma sonuçlarına olabilecek etkisi önlenmeye çalışıldı.

Yaşlanma MDA düzeylerini etkileyebilir. Ancak çalışmaya dahil edilen hastaların hepsinin reprodüktif çağda yani 2-3'üncü dekatta olması nedeniyle yaşın çalışmanın sonuçlarına olumsuz bir etkisinin olmadığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, hastaların kriyoprezervasyon öncesi MDA düzeyleri 105.1 ± 152.1 nmol/sperm iken; kriyoprezervasyon sonrası 186.6 ± 129.33 nmol/sperm olarak saptandı ($p < 0.05$). Kriyoprezervasyon öncesi sperm hareketi 61.3 ± 22.5 iken; bu oran kriyoprezervasyon sonrası 19.8 ± 17.5 olarak bulundu ($p < 0.0001$). Kriyoprezervasyon öncesi ($\rho = -0.392$, $p = 0.03$) ve sonrasında ($\rho = -0.678$, $p = 0.001$) azalan hareket ile artan MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak negatif yönde anlamlı bir ilişki izlendi. Hastaların germ hücreli testis tümörü olması nedeniyle tümöre bağlı MDA artışı olsa bile kriyoprezervasyon sonrası MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın görülmesi ve bu artışa paralel olarak hareketlilikte azalmanın görülmesi, bu korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olması burada esas etkenin işlemin kendisine bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda ön hazırlık sırasında oluşan MDA yüksekliklerini ve hareket bozukluklarını kriyoprezervasyonun kendisinden kaynaklanabilecek sebeplerden ayırt edebilmek için; ölçümler, santrifüj, sperm zenginleştirme,

kriyoprotektan ilavesi gibi ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra ve kriyoprezervasyon uygulandıktan bir ay sonra yapıldı. Ayrıca kriyoprezervasyon sırasında, spermlerin mililitredeki sayılarının 20 milyonu aşmaması için resüspanse edilmesi, işleme bağlı olarak spermlerin patlamasını önlemesi yönünden de önemlidir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, kriyoprezervasyon sonrası sperm hareketindeki azalmanın; dondurma işlemi sırasında artan MDA düzeyine bağlı olduğunu göstermektedir. Bununla beraber, kriyoprezervasyon sırasında hareket için gerekli enerji kaynakları ve/ veya lipid peroksidasyonunu önleyen sistemlerin çalışmamasının da hareketliliği olumsuz yönde etkileyebileceği akılda tutulmalıdır. Hareketteki azalmanın lipid peroksidasyonundan kaynaklandığını düşünen bazı araştırmacılar, kriyoprezervasyon işlemi için konulan kriyoprotektanlara E vitamini, askorbik asit gibi koruyucu ajanları eklediklerinde farklı sonuçlar almışlar ve bunu kişisel farklılık olarak açıklamışlardır (9).

Günümüzde erkek infertilitesinin etiolojisinde spermin plazma membranındaki oksidatif hasarın öneminin anlaşılması ile bu hücrelerin lipoperoksidatif durumlarının ve antioksidan kapasitelerinin saptanması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Dondurularak saklanan spermlerin mutlaka epitel, lökosit, eritrosit ve ölü hücrelerden arındırılması gerekmektedir. Fakat seminal plazmanın koruyucu etkisini devam ettirmek için mutlaka kriyoprotektanlara ilave antioksidan etkili ajanlara da gerek vardır. Bu amaçla seminal plazmanın, koruyucu sistem düzeyi dondurma programına alınmadan önce saptanmalı ve eksik olan ajanlar, kişisel kompozisyona uygun konsantrasyon ve çeşitte seminal plazmaya eklenmelidir. Ayrıca ileride yapılacak çalışmalarda kişiden alınan seminal plazmanın aynı diyaliz makinelerinde olduğu gibi atık ve artıklardan temizlenerek, hatta gerekirse ek ajanlarla desteklenerek kriyoprotektana eklenmesi de düşünülebilir. Böylece fertilizasyon programlarının

da daha başarılı ve iyi sonuçların alınması mümkün olabilecektir.

Teşekkür: Bu çalışmanın laboratuvarlarında gerçekleşmesinde, hastaların bulunması ve istatistiklerin yapılmasında başta sayın Alex M. M. Wetzels Ph.D., Bio. olmak üzere tüm Hollanda, University of Nijmegen, St. Radboud Hospital IVF laboratuvarı ve Jinekoloji Bölümü çalışanlarına çok teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Louglin KR. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 1997; 49: 921-925.
2. Brotherton J. Cryopreservation of human semen. *Arch Androl* 1990; 25: 181-95., Keel BA, Webster BW. Semen analysis data from fresh and cryopreserved donor ejaculates: comparison of cryoprotectants and pregnancy rates. *Fertil Steril* 1989; 52: 100-105.
3. Alfredsson JH, Gudmundsson SP, Snaedal G. Artificial insemination by donor with frozen semen. *Obstet Gynecol Surv* 1983; 38: 305.
4. 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.
5. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183-197.
6. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reprod* 1991; 7: 987-991.
7. 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.
8. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992; 13: 232-241.
9. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl* 1994; 33: 11-15.

10. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Rep Dev* 1993; 35: 302-315.
11. Griveau JF, Le Lannou D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int J Androl* 1994; 17: 225-231.
12. Vishwanath R, Shannon P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 321-331.
13. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 17-26.
14. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; 20: 61-69.
15. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979; 5: 531-537.
16. Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reprod* 1996; 8: 1655-1660.
17. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancıoğlu E, Özveri H, Yalcin S, Akdas A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 1997; 1: 140-143.
18. Berthelsen JG, Skakkebaek NE. Testicular cancer: abnormal structure and function of the contralateral testis. *Int J Androl* 1983; 6:209-211.

Yazışma adresi:

Dr. A. Görkem Mungan
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı,
67600 Kozlu, Zonguldak
Tel : 0.372 261 02 44 / 4425
Faks: 0.372 261 01 55
GSM: 0.533 264 76 58
E-posta: agmungan@yahoo.com
