




# Swim-up Tekniği Uygulanan Normospermili Kişilerde Fosfatidilserin Membran Translokasyonu Olan Hücrelerin Motilite ile İlişkisi

## Relationship Between Motility of Cells with Phosphatidylserine Membrane Translocation in Normospermia Applied Swim-up Technique

 Seda ÇETİNKAYA,<sup>a</sup>  
 Burcu GÜLTEKİN,<sup>b</sup>  
 Aydan ÖZGÖRGÜLÜ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Histoloji-Embriyoloji AD,  
Karatay Üniversitesi,  
<sup>b</sup>Histoloji-Embriyoloji AD,  
Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Meram Tıp Fakültesi,  
Konya

Received: 04.07.2017  
 Received in revised form: 18.01.2018  
 Accepted: 20.01.2018  
 Available online: 09.04.2018

Correspondence:  
 Burcu GÜLTEKİN  
 Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi  
 Meram Tıp Fakültesi,  
 Histoloji-Embriyoloji AD, Konya,  
 TÜRKİYE/TURKEY  
 dilaygltekin@yahoo.com.tr

Bu çalışma, Histoloji-Embriyoloji Kongresi  
 (10-13 Mayıs 2018, Antalya)'nde poster olarak  
 sunulmuştur.

**ÖZET Amaç:** Günümüzde erkek faktörlü infertilite oranının %35'e ulaştığı bilinmektedir. Bu soruna çözüm bulmak için yardımcı üreme teknikleri çok hızla gelişmiştir, ancak beklenen yüksek başarı henüz tam anlamıyla elde edilememiştir. Üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinin hızla artan kullanımı çeşitli sperm hazırlama yöntemlerinin gelişimini sağlamıştır. İntrauterin inseminasyonda (İÜİ) sperm hazırlanması için en çok kullanılan yöntemlerden biri swim-up yöntemidir. Bu çalışmada, normospermi semen örneklerinde swim-up işlemi öncesi ve sonrasında erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz yüzdeleri ile mitokondriyal aktivitenin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışma, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesine Temmuz 2013-Kasım 2014 tarihleri arasında başvuran hastalarla gerçekleştirildi. Dünya Sağlık Örgütü 2010 kriterlerine göre belirlenmiş normospermik (n=40) semen örneklerine swim-up öncesi ve sonrası Annexin V kiti uygulanarak sperm hücrelerinin apoptoza gitme oranları ve MitoTracker Red 580 kiti uygulanması ile mitokondriyal aktiviteleri değerlendirildi. **Bulgular:** Değerlendirme sonucunda, swim-up tekniği sonrası nekroz yüzdelerinde önemli bir azalma görülürken, erken ve geç apoptozun swim-up işlemi sonrasındaki yüzdelerinin ise önemli derecede arttığı saptandı. Erken ve geç apoptoz yüzdelerindeki artışın sebebi olarak swim-up işlemi sırasında yapılan santrifüjün hücre membranına verdiği hasardan kaynaklanabileceği düşünüldü. Ayrıca, yardımcı üreme teknikleri (YÜT), rutin semen analizleriyle fosfatidilserin translokasyon (PST)'li spermleri belirleyemediği için bunları normal kabul etmekte, dolayısıyla PST'li spermler de İÜİ işleminde kullanılır. Ayrıca, swim-up sonrası mitokondriyal aktivite değerlendirme sonucunda çok ışığa yapan hücrelerin yüzdesinde önemli bir artış görülmüştür. **Sonuç:** İÜİ işleminde swim-up işlemi sonrası mitokondriyal aktiviteye bakıldığında hareketli spermler seçilmesine rağmen, gebe kalınmama sebeplerinden birinin de PST'li spermlerin artışından olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Annexin V reseptör; mitokondrium; mitotracker kırmızısı 580; swim up

**ABSTRACT Objective:** Today, the rate of infertility that results from male factors appear to be around 35%. Although assisted reproductive techniques have been developed rapidly in order to find a solution to this problem, the goal hasn't been fully achieved yet. The increasing use of fertility treatment methods has contributed to the development of various sperm preparation methods. The most commonly used method to prepare sperm in intrauterine insemination (IUI) is swim-up. In this study, it was aimed to evaluate mitochondrial activity with normospermic semen samples before and after swim-up technique with early apoptosis, late apoptosis and necrosis rates. **Material and Methods:** The study was conducted with group of patients who applied to the Assisted Reproduction Techniques Unit at Konya Necmettin Erbakan University Meram Tıp Medical Faculty between July 2013-November 2014. Annexin V kit was used with normospermic semen samples (n=40), which were specified according to the WHO 2010 criteria, to analyse the apoptosis rates of sperm cells and Mito Tracker Red 580 was used to analyse the mitochondrial activities before and after swim-up. **Results:** As a result of the evaluation, a significant decrease was observed in the necrosis percentages after the swim up technique, whereas the percentages after the swim up of the early and late apoptosis increased significantly. The increase in the percentages of early and late apoptosis may be due to the damage done to the cell membrane by centrifugation during swim up. In addition, assisted reproductive techniques (ARTs) can not determine the semen with phosphatidylserine translocation (PST) by routine analysis of semen and accept them as normal. Therefore, sperm with PST are used in the IUI procedure. There was also a significant increase in the percentage of highly radiated cells as a result of mitochondrial activity evaluation after swim up. **Conclusion:** Although the motile sperms are selected when the mitochondrial activity is determined after the swim up procedure in the IUI procedure, one of the reasons of nonpresence can be due to the increase of the sperm with PST.

**Keywords:** Annexin V receptor; mitochondria; mitotracker Red 580; swim up

**I**nfertilite, bir yılı aşkın süre ile korunma yöntemlerinden birini kullanmaksızın cinsel ilişkiye girilmesine karşın, çiftlerin çocuk sahibi olamaması durumunda kullanılan bir terimdir. Bu süre sonunda merkezlere başvuran çiftler bu konuda ayrı ayrı değerlendirilmekte ve uygun tedavi süreci başlatılmaktadır. Bu süreçte erkek hastadan semen örneği alınarak analiz edilmekte ve yardımcı üreme teknikleri (YÜT)'nden biri için uygun olup olmadığı değerlendirilmektedir.<sup>1</sup>

İnfertilite tedavisinde önemli bir yere sahip olan intrauterin inseminasyon (IUI), uygun fertil hastalarda uygulandığında hem sonuçları hem de maliyeti açısından oldukça başarılı bir tedavi yöntemidir.<sup>2</sup>

YÜT'de kullanılan sperm hazırlama yöntemleri de in vivo koşulları taklit ederek in vitro koşullarda kaliteli sperm seçimini, bir başka deyişle fertilizasyon kapasitesi düşük spermleri elemeyi amaçlamaktadır. Spermin fertilizasyon kapasitesini belirleyen en önemli iki parametre morfoloji ve hareketliliğidir. Sperm hazırlama protokolleri ile baş, boyun veya kuyruk anomalisi göstermeyen, ileri hızlı hareketli spermleri elde etmek mümkün olabilmektedir.<sup>3</sup>

İnfertilite nedenlerinin yaklaşık yarısından fazlasının erkek kaynaklı olduğunun saptanmasından sonra yeni yöntemlerin geliştirilmesi, sperm fonksiyonları hakkında bilgilerin artırılması gereğini doğurmuş, dolayısıyla spermlerdeki radikal oksijen türevlerinin varlığı, DNA fragmentasyonu, apoptoz ve mitokondriyal zar potansiyelinin önemini gösteren çalışmalar gündeme gelmiştir.<sup>3</sup>

Sperm hücrelerinde apoptotik süreci değerlendirme yöntemlerinden biri olan Anneksin V boyaması, hücre membran yapısının erken değişikliklerinin tespitinde kullanılan önemli bir testtir. Anneksin V, negatif yüklü fosfolipitlerden olan fosfatidilserin (PS) ile yakınlığı olan, yüksek kalsiyum bağımlı bir proteindir.<sup>4</sup> Anneksin V'in bir ligandı olan PS, normalde plazma membranının iç yaprağında bulunmakta ve apoptotik sürecin başlangıcında plazma membranının dış yaprağına transloke olmaktadır.<sup>5</sup> Translokasyon, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre

ölümünün erken dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir protein olduğundan, apoptoz için bir biyolojik işaretleyici olarak işlev görmektedir.<sup>6</sup> Bununla birlikte Anneksin V, hücre membran bütünlüğünü kaybettiği zaman geç apoptozu belirlemede yetersiz olmaktadır, çünkü bu durumda hücrenin durumu nekrotik hücrelere benzerdir. Son zamanlarda canlı bir vital boya olan propidiumiyodur (PI) ile konjuge Anneksin V testi, geç apoptoz veya nekroz ve erken apoptozun progresif basamağının saptanması hassas bir yöntem olarak geliştirilmiştir.<sup>7</sup> PI sadece ölü hücreleri boyarken, Anneksin V testi membran yapısındaki değişikliklere bağlı olarak erken ve geç apoptozlu hücreleri boyamaktadır.<sup>8</sup>

MitoTracke Red 580, kiti, sperm boyun bölgesindeki aktif mitokondriyum kütle birikimiyle doğru orantılı olarak ışığa yapmaktadır.

Bu çalışmada, IUI'da yaygın olarak kullanılan swim-up işlemi öncesi ve sonrası sperm hücresi membranındaki değişikliklerin fosfatidilserin translokasyonu [phosphatidylserine translocation (PST)] sonucu Anneksin V ile yüzdelerinin saptanarak, apoptotik sperm oranı ile sperm hareketliliği arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi YÜT Ünitesi'ne Temmuz 2013-Kasım 2014 tarihleri arasında başvuran hastaların semen örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü [World Health Organization (WHO)] 2010 kriterlerine göre, normospermik olan toplam 40 hasta 2013/355 no.lu etik kurul kararınca seçilmiştir (etik kurul kararı ektektir).

Bu hastaların 3 günlük cinsel perhiz sonrasında alınan semen örnekleri steril, toksik olmayan polipropilen bir kaba toplanmış ve ortalama 25 dk'lık likefaksiyon süresinin ardından semen analizleri yapılmıştır.

Semen analizlerinde ilk önce fiziksel muayene yapılarak koku, renk, volüm ve viskozite yönün-

den değerlendirilmiştir. Daha sonra mikroskopik incelemeleri yapmak için semenden alınan 10 µL örnek, derinliği 0,01 mm olan Makler sayım kamerasının (Sefi-Medical Instruments, Israel) ortasına damlatılarak üzerine grid camı kapatılmıştır. Nikon T1A Input AC ışık mikroskopunda toplamda 200X büyütme altında değerlendirme yapılmıştır. Gridin üzerinde iki satır bir sütun veya iki sütun bir satır içerisindeki spermatozoonlar sayılarak ortalaması alınmış ve böylece spermatozoa konsantrasyonu milyon/mL olarak saptanmıştır. Aynı zamanda Makler sayım kamerası kullanılarak motilite değerlendirmesi yapılmıştır. Motilite değerlendirmesi için 100 hücre sayılmıştır. Doğrusal hareket göstererek en az 3 kareyi kat eden spermatozoonların motilitesi +4; karenin dışına çıkan, ancak 1-2 kare sonra geri dönme hareketi gösteren spermatozoonların motilitesi +3, bir kare içerisinde yerinde baş veya kuyruk sallama şeklinde hareket eden spermatozoa motilitesi +2, hiç hareket göstermeyen spermatozoonların motilitesi +1 olarak değerlendirilmiştir (Makler 1980, WHO 2010).

Viabiliteyi değerlendirmek için lama bir damla likefiye olmuş semen üzerine bir damla %1 sulu Tripan mavisi boyası damlatılmış ve lamelle kapatılmıştır. 400X büyütmede en az 200 hücre sayıldıktan sonra, boya alan spermatozoonlar "nonviabl", boya almayan spermatozoonlar ise "viabl" olarak değerlendirilmiş ve viabilite oranı yüzde olarak kaydedilmiştir.

WHO 2010 kriterleri morfoloji değerlendirmesi için kullanılmıştır. 400X büyütmede morfolojisi sağlam ve normospermi sınıfına girenler çalışmaya dâhil edilmiştir. Bundan sonraki aşamada her bir hastadan alınan örneklerin semen parametreleri incelendikten sonra, semen örneği 4 ayrı steril konik tüpe her biri 0,5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüplerin ikisine swim-up uygulamadan pellet üzerine 1. ependorfa Anneksin V, 2. ependorfa MitoTracker kiti ilave edilip karışımdan her bir lama yaklaşık olarak 45-50 µL damlatılıp üzerleri lamelle kapatılmış ve oda sıcaklığında yaklaşık 10-15 dk inkübasyona bırakılmıştır. 3. ve 4. tüplerin semen örneğine swim-up uygulanıp, daha sonra yine Anneksin V ve MitoTracker Red 580 kiti ile muamele edip, Olympus BH-2 foto ataş-

manlı floresan mikroskop altında karanlık odada karanlık alanda incelenmiştir. Anneksin V kiti ile sperm hücrelerinin apoptoza gitme oranları, MitoTracker Red 580 kitiyle de mitokondriyal aktiviteleri değerlendirilmiştir.

Swim-up yöntemi ile alınan semen örneği toplam hacim 1 mL olacak şekilde 1:1 oranında medyum ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen karışım üzerine 100 µL sperm yüzdürme medyumuna eklenmiştir. Tüpler 37°C'de 20 dk süreyle %5 karbondioksitli ortamda 45° eğimli pozisyonda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üstteki 100 µL'lik kısım mikropipetle alınarak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası dibe çöken spermler MitoTracker Red 580 kiti ve Anneksin V ile boyanarak poly-lizini lama yayılmıştır.

MitoTracker Red 580 kiti sperm boyun bölgesindeki aktif mitokondriyum kütle birikimiyle doğru orantılı olarak ışığa yapmaktadır. Bizde çalışmamızda swim-up öncesi ve sonrası sperm mitokondriyal aktiviteleri bu kit ile değerlendirilmiştir.

MitoTracker Red 580 kiti canlı hücre seçenekleri için çok uygundur. Flakon açılmadan önce oda sıcaklığına ulaşabilmesi için 10-15 dk beklenmiştir. Stok solüsyonu hazırlamak için, yüksek kalite susuz DMSO'da liyofilize MitoTracker Product çözündürülmüştür. Son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde ayarlanmıştır (molekül ağırlığı 724,0'dan hesaplanarak). Çalışma solüsyonu 10X fosfat tamponlu tuz [phosphate buffered saline (PBS)] ile 5 kat sulandırılarak hazırlanmıştır.

Çalışmamızda, PI ile konjuge Anneksin V testi, geç apoptoz veya nekroz ve erken apoptozun progresif basamağının saptanması için kullanılmıştır. Anneksin V testi ile hücrelerin değerlendirmesi; erken apoptozlu hücreler yeşil ışığa, geç apoptozlu hücreler yeşil+kırmızı ışığa, nekrozlu hücreler ise sadece kırmızı renkte ışığa yapmasıyla değerlendirilmektedir. Semenden total hücre sayısı 1 milyon olacak şekilde örnek ependorfa aktarılmıştır. Daha sonra semen örneklerine PBS eklenip, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Pellete hazır kit Anneksin V ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler Graphpad prism 6 programında değerlendirilmiştir.

tir. İlişkili örneklemeler için bağımlı t-testi uygulanmış ve  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmamızda swim-up işlemi uygulama öncesi ve sonrası Annexin V kiti ile erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz yüzdeleri floresan mikroskop ile değerlendirildi. MitoTracker Red 580 kiti ile de mitokondriyal aktiviteleriyle doğru orantılı olarak ışımaya yapan sperm hücreleri, az ışımaya yapan ve çok ışımaya yapan sperm yüzdeleri değerlendirildi.

Annexin V kiti ile boyanmış semen örneklerinde, swim-up uygulaması öncesi ve sonrasındaki değerler karşılaştırıldığında swim-up uygulama sonrası erken apoptozlu ( $p=0,0387$ ) (Şekil 1) ve geç apoptozlu ( $p=0,0027^*$ ) (Şekil 2) hücrelerin yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı artma gözlemlendi. Ancak, swim-up uygulama sonrası nekrozlu hücrelerin yüzdesinde ( $p=0,0028^{**}$ ) istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3).

Annexin V kiti ile boyanmış semen örneklerinde erken apoptozlu, geç apoptozlu ve nekrozlu hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntüleri ve değerlendirme şekli Resim 1'de görülmektedir.

MitoTracker Red 580 kiti ile boyanmış semen örneklerinde, swim-up uygulaması öncesi ve sonrasındaki değerler karşılaştırıldığında, swim-up uygulama sonrası az ışımaya yapan hücrelerin yüzdesinde ( $p=0,0093^{***}$ ) (Şekil 4) istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir. Ancak çok ışımaya yapan hücrelerin yüzdesinde ( $p=0,0185^{****}$ ) istatistiksel olarak anlamlı artma gözlemlenmiştir (Şekil 5).

\* Annexin V ile boyanmış semen örneklerinde swim-up uygulaması öncesi ve sonrasındaki geç apoptozlu hücrelerin karşılaştırılması ve p değeri. Sonuç: swim-up uygulama sonrası geç apoptozlu hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı artma gözlemlenmiştir.

\*\* Annexin V ile boyanmış semen örneklerinde swim-up uygulaması öncesi ve sonrasındaki nekrozlu hücrelerin karşılaştırılması ve p değeri. Sonuç: swim-up uygulama sonrası nekrozlu hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir.

\*\*\* MitoTracker Red 580 kiti ile boyanmış semen örneklerinde, swim-up uygulaması öncesi ve sonrasındaki az ışımaya yapan hücrelerin karşılaştırılması ve p değeri. Sonuç: swim-up sonrası az ışımaya yapan hücrelerin istatistiksel anlamlı azalma gözlemlenmiştir.

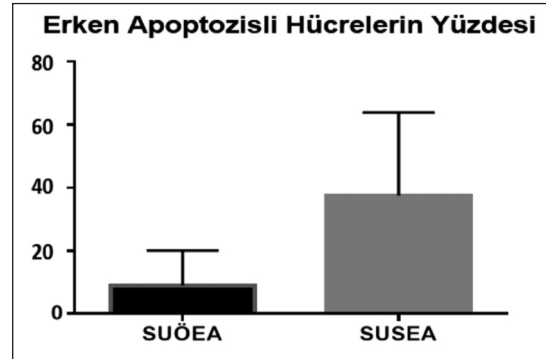
\*\*\*\* MitoTracker Red 580 kiti ile boyanmış semen örneklerinde, swim-up uygulaması öncesi ve sonrasındaki çok ışımaya yapan hücrelerin karşılaştırılması ve p değeri. Sonuç: swim-up sonrası çok ışımaya yapan hücrelerin istatistiksel anlamlı artma gözlemlenmiştir.

MitoTracker Red 580 kiti ile boyanmış semen örneklerinde az ışımaya yapan ve çok ışımaya yapan hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntüleri ve değerlendirme şekli Resim 2'de görülmektedir.

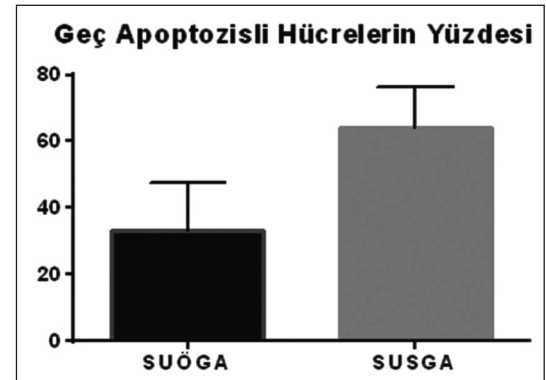
## TARTIŞMA

YÜT'de, özellikle artifisyel inseminasyon işlemi 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 antioksidan tedavi verilmesinin teorik olarak oksidatif hasarı azaltacağı kabul edilmektedir.<sup>9</sup>

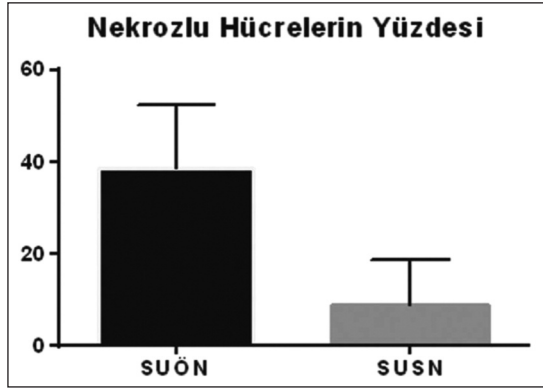
Serbest oksijen radikalleri sperm motilite, sağkalım ve fonksiyonlarını membran lipit, protein ve DNA yapısını bozarak etkilemektedir.<sup>10,11</sup> Normal şartlar altında in vivo antioksidan yollar oksidatif hasara karşı yeterli korumayı sağlar iken,



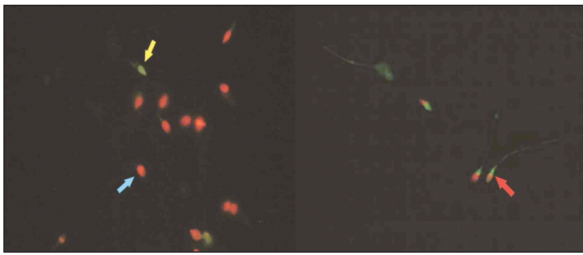
ŞEKİL 1: Swim-up öncesi erken apoptozlu hücrelerin (SUÖEA) ve swim-up sonrası erken apoptozlu hücrelerin (SUSEA) yüzdesi.



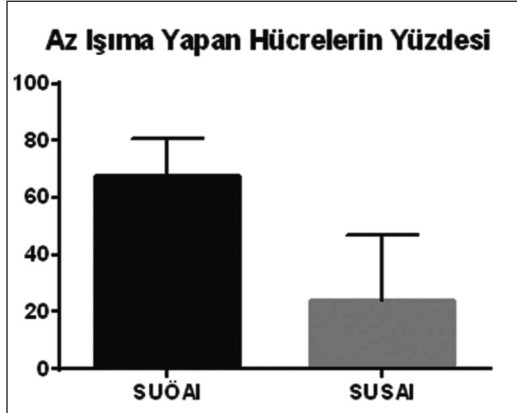
ŞEKİL 2: Swim-up öncesi geç apoptozlu hücrelerin (SUÖGA) ve swim-up sonrası geç apoptozlu hücrelerin (SUSGA) yüzdesi.



ŞEKİL 3: Swim-up öncesi nekrozlu hücrelerin (SUÖN) ve swim-up sonrası nekrozlu hücrelerin (SUSN) yüzdesi.



RESİM 1: Annexin V ile boyanmış erken apoptozlu (sarı ok), geç apoptozlu (kırmızı ok) ve nekrozlu (mavi ok) hücreler.



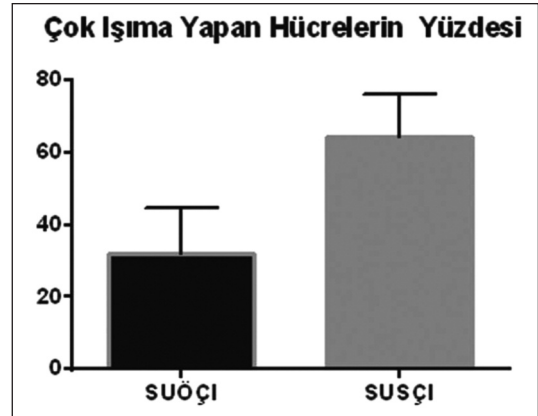
ŞEKİL 4: Swim-up öncesi nekrozlu hücrelerin (SUÖN) ve swim-up sonrası nekrozlu hücrelerin (SUSN) yüzdesi.

YÜT'de kullanılan medyumlara antioksidan eklenmesine rağmen sperm hasarının önüne geçilememektedir.<sup>12</sup> Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, sperm hücrelerinde DNA hasarı tarafından artırılmaktadır.<sup>13</sup> Apoptoz infertiliteye yol açmaktadır.<sup>14</sup> İnfertil hasta popülasyonunda da apoptoz, kontrollere göre daha yüksek oranda izlenmektedir.<sup>15</sup> Standart spermiyogram para-

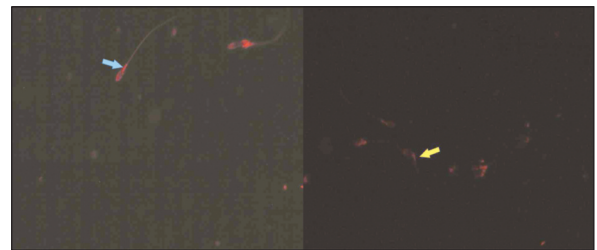
metreleri apoptoz düzeyini tam olarak yansıtmayabilmektedir, fakat apoptoz erkek infertilitesinde muhtemelen rol oynayan bağımsız bir fenomen olarak kabul edilmektedir.<sup>9</sup>

Gomez-Lopez ve ark.nın 2013 yılında yaptığı çalışmada, PST'li hücre membranının bozulması ve DNA fragmentasyonunun tanımlanması dâhil olmak üzere, ejakulat içindeki spermatozoada erken ve geç apoptotik sinyalleri tanımlanmıştır.<sup>16</sup> Aynı çalışmada, infertil erkeklerin spermatozoasının fertil erkeklere göre daha yüksek oranda DNA fragmentasyonu ve PST içerdiğini bulmuşlardır.

Grunewald ve Paasch, 2013 yılında yaptıkları çalışmada, insan spermünde mevcut sperm DNA fragmentasyonu gibi normal olmayan PS'nin çıkışı; kaspaz-3'ün aktivasyonu, mitokondriyal transmembran potansiyelinin bozulması gibi apoptoz sinyalini aktive eden temel özelliklerin fertilizasyon başarısızlığı üzerinde direkt etkisi olabileceğini bildirmişlerdir.<sup>17</sup>



ŞEKİL 5: Swim-up öncesi çok ışımaya yapan hücrelerin (SUÖÇİ) ve swim-up sonrası çok ışımaya yapan hücrelerin (SUSÇİ) yüzdesi.



RESİM 2: MitoTracker Red 580 ile boyanmış mitokondriyal aktiviteyle doğru orantılı olarak, çok ışımaya yapan hücre (mavi ok) ve az ışımaya yapan sperm hücreleri (sarı ok).

Boomsma ve ark., sperm hazırlık yöntemlerinin değerlendirildiği bir meta-analizde; gradient, swim-up ve yıkama-santrifügasyon yöntemlerinden herhangi birini tercih etmek için yeterli randomize kontrollü çalışma olmadığı sonucuna varmışlardır.<sup>18</sup> Semen parametrelerinin karşılaştırıldığı çalışmaların sonuçlarına göre; gradient yönteminin önerilebileceği, ancak bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu yorumu yapılmıştır. Ancak, swim-up yöntemi kliniklerde yoğun bir şekilde uygulanmakta ve oturmuş bir teknik olarak rutinde kullanılmaktadır.

Kotwicka ve ark., canlı sperm hücrelerinde PST'nin en sık görülen yerinin spermin boyun kısmı olduğunu ve boyun kısmında PST bulunan spermilerin ilerleyici hareket etme yeteneği olduğunu göstermişlerdir.<sup>19</sup> Hem boyun kısmında hem de akrozomal bölgede PST bulunan spermilerin ilerleyici hareket etme yeteneğini kaybettiğini, boyun kısmında PST bulunan ve çekirdekte PI birikimi bulunan spermilerin ise yavaş ilerleyici hareket yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Kotwicka ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre, mitokondriyonun olduğu bölgede PST meydana gelse de spermin ilerleyici hareket etme yeteneğine sahip olması, çalışmamızda bulduğumuz sonuçlarla uyum göstermektedir.<sup>19</sup>

Barroso ve ark., PST'li spermatozoa hareketlilik parametrelerindeki azalmanın mitokondriyal potansiyelin azalmasıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.<sup>20</sup> PST ve hareket parametrelerinde görülen bu değişiklikler adenozin trifosfat seviyelerindeki bir azalma ile ilişkili görülmektedir. Sadece boyun kısmında PST'li spermatozoanlar ileri hareket yeteneği göstermişlerdir. Bu yüzden, PST'nin ve hareketlilik parametrelerinin azalmasını etkileyen mekanizmaların doğrudan ilişkili olmadığı görülmektedir. Çalışmamızda da swim-up sonrası ileri hareketli spermelerde erken ve geç apoptozlu spermatozoa yüzdelerinde artış gözlenmesi, PST'nin ve hareketlilik mekanizmalarının doğrudan ilişkili olmadığını desteklemektedir.

Kotwicka ve ark., PST'nin hem morfolojik olarak normal hem de patolojik spermatozoada oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Translokasyon bölgesinin spermatozoa morfolojisine bağlı oldu-

ğunu belirtmişlerdir.<sup>21</sup> Bulguları çoğu zaman PST'nin morfolojik olarak anormal bir hücrenin bir bölümünde yer edindiğine dair kanıtlar sağlamaktadır. Baş defektli spermelerde başta, kuyruk defektli spermelerde kuyrukta yer almaktadırlar. PST'nin hem morfolojik olarak normal hem de anormal hücrelerde bulunmasından dolayı, anormal spermelerin fizyolojik mekanizmayla eliminasyonuna dâhil etmeyi şüpheli bulmuşlardır.

Ricci ve ark., erken apoptoz sürecinde sperm hareketliliğinin değişmeden kalabileceğini bildirmişlerdir.<sup>22</sup> Bu çalışmada, swim-up sonrası erken ve geç apoptoz yüzdelerinin artması her iki süreçte de hareketliliğin değişmeden kalabileceğini düşündürmektedir.

İnfertil hastaların testis biyopsilerinde yüksek oranlarda apoptoz olduğu TUNEL yöntemi ve morfolojik çalışmalarla ortaya konmuştur. Yeni yapılan çalışmalarda ise infertil hastaların ejakülat spermelerinde apoptozun tipik göstergeleri olan DNA parçalanması (TUNEL yöntemi) ve PST (Anneksin V/propidium iyodür yöntemi) saptanmıştır. Bu belirleyicileri rutin semen analizleri ile göstermek olası değildir ve bu spermeler normal olarak değerlendirilip, mikroenjeksiyon yöntemi ile oosite enjekte edilirse hasarlı genomdan dolayı ciddi sorunlara yol açabilmektedir.<sup>23</sup>

Sperm hazırlığında santrifüjlü ve santrifüzsüz iki yöntemin denendiği bir araştırmada, santrifüzsüz yöntemde daha fazla motil spermatozoa ve zamandan tasarruf elde edilmiştir. Ayrıca, santrifüjün oluşturduğu stresin sperm canlılığını etkilediği belirtilmiştir.<sup>24</sup> Tekrarlayan santrifüj yöntemlerinin spermatozoa hazırlamada kullanılmaya devam edilmesi hâlinde, stratejilerin DNA hasarını en aza indirmeye yönelik olması gerektiği önerilmektedir.<sup>25</sup>

Çalışmamızda da swim-up sonrası ileri derece hareketli spermatozoa erken ve geç apoptoz yüzdelerinin artmasının, swim-up işlemi sırasında yapılan santrifüjün hücre membranında oluşturduğu hasardan dolayı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, swim-up sonrası MitoTracker Red 580 kiti ile mitokondriyal aktivite değerlendirme sonucunda çok ışımaya yapan hücrelerin yüzdesinde önemli bir artış görülmüştür (Resim 2). Bu da reaktif oksijen

türlerinin artmasına bağlı olarak, mitokondriyon fisyonunun meydana geldiğini ve mitokondriyonlarda kütle birikiminin azalmasına bağlı olarak ışımanın azaldığı spermatozoonların swim-up yöntemi ile izole edildiğini düşündürmektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

İnfertilite nedenlerinin yaklaşık yarısından fazlasının erkek kaynaklı olduğunun saptanmasından sonra yeni yöntemlerin geliştirilmesi, sperm fonksiyonları hakkında bilgilerin artırılması gereğini doğurmuş ve erkek infertilitesinde klinik tanının önemi daha da artmıştır.<sup>26</sup> Dolayısıyla hızlı hareketli sperm oranları ve sperm apoptoz konusu da gündeme gelmiştir.

Çalışmamızda, normospermler için swim-up öncesi ve sonrası spermatozoa membranındaki PS translokasyonundan kaynaklanan apoptoz ve nekroza gitme oranları ve hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri araştırılmıştır. Swim-up sonrası erken ve geç apoptoz yüzdelerinde artış, nekroz yüzdelerinde ise önemli bir azalma görülmüştür. Mitokondriyal aktiviteleri değerlendirildiğinde, swim-up sonrası çok ışımaya yapan hücre yüzdesinde önemli bir artış görülmüştür.

Mevcut veriler, spermatozoada PST oluşumu ya da bu sürecin biyolojik etkilerinin varlığını net olarak açıklayamamaktadır. PST, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu sırasında ya da patolojik spermatozoanın eliminasyonu sırasında oluşan spermatozoa hücre membranındaki değişikliklerin bir ifadesi olarak kabul edilebilmektedir.<sup>19</sup>

Sonuç olarak, elde edilen bulgular ışığında mitokondriyi etkileyen mekanizmalar ile erken ve geç apoptoz mekanizmaları tam ilişkili değildir.

Bu çalışmanın, apoptoz ve mitokondri ile ilgili tartışmalı literatüre katkı sağlaması ve yeni bulgular elde etmek üzere, alanındaki bilgilere bir yarar sağlaması beklenmektedir.

### Finansal Kaynak

*Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.*

### Çıkar Çatışması

*Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.*

### Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Seda Çetinkaya; **Tasarım:** Seda Çetinkaya; **Denetleme/Danışmanlık:** Seda Çetinkaya Burcu Gültekin; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Seda Çetinkaya, Burcu Gültekin; **Analiz ve/veya Yorum:** Seda Çetinkaya, Burcu Gültekin, Aydan Özgörgülü; **Kaynak Taraması:** Seda Çetinkaya, Burcu Gültekin, Aydan Özgörgülü; **Makalenin Yazımı:** Seda Çetinkaya, Burcu Gültekin; **Eleştirel İnceleme:** Seda Çetinkaya, Burcu Gültekin, Aydan Özgörgülü; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Seda Çetinkaya, Burcu Gültekin, Aydan Özgörgülü; **Malzemeler:** Seda Çetinkaya, Burcu Gültekin.

## KAYNAKLAR

1. Reproductive endocrinology and infertility Lewis, Vivian, (Physician). Austin, Tex. : Landes Bioscience, c2007. NLM ID: 101297212 [Book].
2. Gezginç K, Çiçek MN, Çolakoğlu M, Çelik Ç, Çapar M, Akyürek C. [The number and timing of application of intrauterine insemination on pregnancy rate]. Kadın Doğum Dergisi 2004;2(4):253-7.
3. Özkavukçu S, Aras D. [Sperm preparation methods for IUI and IVF]. TJRMS 2017;1(2): 92-8.
4. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 1995;184(1): 39-51.
5. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod 2000;15(6):1338-44.
6. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Ziram induces apoptosis and necrosis in human immune cells. Arch Toxicol 2011;85(4):355-61.
7. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. Hum Reprod 2002;17(5):1266-73.
8. Peirouvi T, Farjah G, Rad JS, Novin MG. Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. Iran J Reprod Med 2007;5(3):117-20.

9. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004;25(1):5-18.
10. 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(2):459-69.
11. Amann RP, Shabanowitz RB, Huszar G, Broder SJ. In vitro sperm-binding assay to distinguish differences in populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation. *J Androl* 1999;20(5):648-54.
12. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in humans spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979;31(5):531-7.
13. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999;4(1):38-47.
14. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56(3):602-7.
15. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002;66(4):1061-7.
16. Gomez-Lopez N, Estrada-Gutierrez G, Colin A, Flores-Pliego A, Flores-Escobar X, Oehninger S, et al. The apoptotic pathway in fertile and subfertile men: a case-control and prospective study to examine the impact of merocyanine 540 bodies on ejaculated spermatozoa. *Fertil Steril* 2013;99(5):1242-8.
17. Grunewald S, Paasch U. Sperm selection for ICSI using annexin V. *Methods Mol Biol* 2013;927:257-62.
18. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(3):CD004507.
19. Kotwicka M, Jendraszak M, Skibinska I, Jedrzejczak P, Pawelczyk L. Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Hum Cell* 2013;26(1):28-34.
20. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006;85(1):149-54.
21. Kotwicka M, Jendraszak M, Jedrzejczak P. Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: topography in membrane domains and relation to cell vitality. *J Membr Biol* 2011;240(3):165-70.
22. Ricci G, Peticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod* 2002;17(10):2665-72.
23. Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8(11):984-91.
24. 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(2): 141-5.
25. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998;4(5):439-45.
26. Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR. Cell death in spermatogenesis. In: Potten CS, ed. *Perspective of Mammalia Cell Death*. 1<sup>st</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 1987. p.229-58.