

SPERM KREATİN KİNAZ AKTİVİTESİ: SPERM FERTİLİZASYON POTANSİYELİNİN GÖSTERGESİ Mİ?

SPERM CREATINE KINASE ACTIVITY: IS IT A CRITERIA FOR FERTILIZATION POTENTIAL OF SPERM?

ALICI, B., ÖCAL,* P., GÜMÜŞTAŞ,** K., AKKUŞ, E., YENCİLEK, F., HATTAT, H.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı sperm kreatin kinaz aktivitesinin sperm fertilizasyon potansiyelini ölçmekte değerinin olup olmayacağını tesbitidir.

İnfertilite nedeni ile Tüp Bebek Merkezinde İVF uygulamasına alınan 32 hasta (13 erkek infertilitesi/19 kadın faktörü) çalışmaya dahil edilmiştir. Tam likefiye semen örneklerinden santrifüjle ayrılan pelletleri hücre içi enzimler serbestleştirilerek kreatin fosfokinaz-MB (CPK-MB) izoform ölçümünde kullanıldı. Ölçüm 340 nm'de CPK-MB enzim aktivitesi sonucu oluşan NADPH absorpsiyonuna dayanan kinetik spektrofotometrik Diasis Diagnostik kiti yöntemiyle yapıldı. CPK-MB seviyesi protein başına aktivite cinsinden ölçüldü (Ü/L/mg prot.).

İVF'da ovum fertilizasyonu gerçekleşen 18 hastanın CPK-MB seviyeleri (ort. 18.71 ± 4.62 Ü/L/mg prot.) fertilizasyon gerçekleşmeyen 14 hastaninkine (ort. 30.32 ± 4.32 Ü/L/mg prot.) göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu. Erkek infertilitesi olan 13 hastadan fertilizasyon gerçekleşen 4 hastanın CPK-MB değerleri (ort. 24.23 ± 2.37 Ü/L/mg prot.) ile gerçekleşmeyen 9 hastanın CPK-MB değerleri (ort. 30.98 ± 3.44 Ü/L/mg prot.) arasında fark anlamlı bulunmuştur. Normospermik 19 hastanın ortalama CPK-MB değerleri (20.29 ± 6.89 Ü/L/mg prot.) oligospermik erkeklerinkinden (28.91 ± 4.45 Ü/L/mg prot.) anlamlı biçimde düşüktü ($p < 0.05$). Sperm morfolojisi bakımından oligozoospermik ve normozoospermik hastalarda fertilizasyon olan ve olmayan gruplar arasında istatistiksel olarak belirgin fark mevcuttu ($p < 0.05$).

Sperm fertilizasyon potansiyelini ölçmekte CPK-MB aktivite ölçümü yardımcı üreme tekniklerinden en iyi yararlanacak erkek infertilite hastalarının tesbitine yardımcı olabilir. Ancak, sperm morfolojisine üstünlüğü klinik çalışmalarla araştırılmalıdır.

ABSTRACT

The aim of this study is to examine the value of sperm creatine kinase to predict fertilizing potential of sperm.

32 patients (13 male factor/19 female factor) who attended to IVF Center were entered in this study. Pellets which were obtained by centrifugation of liquefied semen samples were used for creatine phosphokinase MB (CPK-MB) isoform determination after intracellular enzymes were extracted. CPK-MB enzyme activity was determined using a kinetic spectrophotometric Diasis Diagnostic kit which works on basis of NADPH absorption at 340 nm. CPK-MB levels were given as activity per mg of protein (Ü/L/mg prot.).

Levels of CPK-MB were statistically lower in 18 patients (mean 18.71 ± 4.62 Ü/L/mg prot.) with positive in vitro fertilization than in 14 patients (mean 30.32 ± 4.32 Ü/L/mg prot.) without fertilization. In 4 of 13 patients with male infertility, fertilization was obtained and mean CPK-MB level was 24.23 ± 2.37 Ü/L/mg prot., while it was 30.98 ± 3.44 Ü/L/mg prot. in the other 9 patients. The difference was significant. CPK-MB levels were significantly lower in 19 normozoospermic patients (mean 20.29 ± 6.89 Ü/L/mg prot.) ($p < 0.05$). With respect to sperm morphology, there was also statistically significant difference between groups with fertilization positive and negative in both normozoospermic and oligozoospermic patients ($p < 0.05$).

Determination of sperm CPK-MB activity may be helpful to choose the patients with male infertility who may benefit from artificial insemination techniques. But, studies are needed to determine if it is superior to sperm morphology.

ANAHTAR KELİMELEER: Sperm kreatin kinaz, infertilite, invitro fertilizasyon

KEY WORDS: Sperm creatine kinase, infertility, invitro fertilization.

Dergiye geliş tarihi: 8.1.1999

Yayına kabul tarihi: 6.4.1999

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji ABD, Cinsel Fonksiyon Bozuklukları Merkezi, Kadın Doğum ABD* ve Biokimya ABD**.

GİRİŞ

Spermin dölleme potansiyelini tahmin etmek için güvenilir metodların olmayışı erkek infertilite tedavisinde uzun yıllardan beri problem olmuştur. Sperm sayısı, motilite ve morfolojisi erkeklerin fertilizasyon potansiyelini tahmin etmek için en sık kullanılan parametrelerdir. Ancak, semen parametrelerinin yanı sıra membran bütünlüğü, akrozom reaksiyonu, servikal mukus penetrasyon testi, zona-free hamster oosit penetrasyon testi gibi belirli sperm fonksiyonlarını gösteren testlerin hepsi de fertilizasyon potansiyelini önceden tahmin etmekte yetersiz kalmışlardır.^{1,2,3,4} Dolayısıyla, sperm kalite ve fertilizasyon yeteneğini gösterebilecek başka testlere ihtiyaç vardır. Son yıllarda sperm kreatin fosfokinaz'ın (CPK) sperm kalitesini gösteren bir biokimyasal marker olduğu belirtilmektedir.^{5, 6, 7}

Spermatozoa'nın mitokondri içeren orta parçası sperm motilitesi için gerekli adenozin trifosfat (ATP) üretir. Üretilen ATP sperm kuyruğuna kreatin-kreatin fosfat döngüsü ile kanallıze edilmektedir.⁸ Mitokondride ATP, kreatini kreatin fosfat haline dönüştürmekte ve kreatin fosfat sperm kuyruğuna enerji taşıyıcı olarak geçmektedir. Kreatin fosfat ise kreatin haline gelerek tekrar mitokondriye dönmektedir. Hem mitokondride hem de sperm kuyruğunda fosfat transferi kreatin kinaz ile gerçekleştirilmektedir. Böylece kreatin kinaz sperm enerjisinin oluşmasında, aktarılmasında ve kullanımında anahtar enzim olarak kabul edilebilir.⁹

Bu çalışmanın amacı sperm kreatin kinaz aktivitesinin sperm fertilizasyon potansiyelini ölçmede bir kriter olup olamayacağının tesbitidir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

İnfertilite nedeni ile Tüp Bebek Merkezinde invitro fertilizasyon (İVF) uygulamasına alınan 32 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. İVF uygulamasına alınan hastaların 13'ü oligospermik idi ve oligospermi haricinde bir kriter göz önüne alınmamıştı. Hastaların 19'u ise normospermik olup, kadın faktörü nedeni ile İVF uygulamasına alınmışlardı. Sperm kreatin kinaz aktiviteleri

santrifüj sonrası semen pelletlerinde bakıldı. Sperm kreatin kinaz aktiviteleri ile hastaların anamnezleri ve İVF fertilizasyon sonuçları aynı hekimler tarafından birbirinden habersiz olarak değerlendirildi.

Semen parametreleri manuel olarak ve sperm morfolojisi hariç, WHO kriterlerine göre değerlendirildi.¹⁰ Sperm morfolojisi ise Kruger kriterlerine göre değerlendirilmiştir. **Sperm kreatin kinaz ölçümü:** Tam likefiye olmuş semen örneklerinden yeterli bir kısmına swim-up işlemi uygulanarak spermatozoon elde edildi. Kalan tam likefiye semen örneklerinin santrifüjle plazması ve pellet kısmı ayrıldı. Pellet örnekleri pH 6.7'deki imidazol tampon ortamında 4 C°de sonikiye (ses dalgası ile parçalama) edilerek hücre içi enzimler serbestleştirildi ve sperm kreatin kinaz MB izoform (CPK-MB) enzim aktivitesi ölçümünde kullanıldı. Ölçüm 340 nm de CPK-MB enzim aktivitesi sonucu oluşan NADPH absorpsiyonuna dayanan kinetik spektrofotometrik Diasis Diagnostik kiti yöntemine göre yapıldı.¹¹ Protein tayini Lowry'nin spektrofotometrik yöntemi-ne göre yapıldı.¹² CPK-MB seviyesi protein başına aktivite cinsinden ölçüldü (Ü/L/mg protein).

İstatistik değerlendirme student t-test kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

İVF uygulamasına alınan ve fertilizasyon gerçekleşen 18 hastanın CPK-MB seviyeleri 18.71 ± 4.62 Ü/L/mg prot, fertilizasyon gerçekleşmeyen 14 hastanın ise 30.32 ± 4.32 Ü/L/mg prot. bulundu. İkisi arasında fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($r = -0.7981$, $p < 0.001$). Normospermik 19 hastanın CPK-MB değerleri 20.29 ± 6.89 Ü/L/mg prot. ve oligospermik 13 hastanın ise 28.91 ± 4.45 Ü/L/mg prot. bulunmuştur. Normospermik ve oligospermik erkeklerin CPK-MB değerleri arasında belirgin istatistiksel fark mevcuttu ve bu fertilizasyon ile ters pozitif ilişki gösteriyordu ($p < 0.05$, t-test).

Oligospermik ve normospermik hastaların ovum fertilizasyonu olan ve olmayan gruplara göre sperm sayısı, motilite ve CPK-MB ortalama-

ları Tablo 1'de görülmektedir. Erkek infertilitesi olan 13 hastanın ovum fertilizasyonu gerçekleşen

Tablo 1. Oligospermik ve normospermik erkeklerde fertilizasyon olan ve olmayan gruplarda sperm sayısı, motilite, morfoloji ve CPK-MB ortalamaları.

	Sperm sayısı (mil/ml)	Motilite (%)	Morfoloji (%)	CPK-MB (Ü/L/mg prot)
Oligospermik İnfertil (n:9)	11.5±2.2	28.7±5.9	5.1±1.9	30.98±3.44
Oligospermik Fertil (n:4)	15.5±1.7	38.2±5.3	10.2±0.9	24.23±2.37
Normospermik İnfertil (n:5)	35.6±13.4	40.4±2.9	9.2±0.8	29.14±5.83
Normospermik Fertil (n:14)	68.9±18.5	45.6±8.6	14.1±3.9	17.13±3.67

4 hastanın ortalama CPK-MB değerleri (24.23±2.37 Ü/L/mg prot.) ve fertilizasyon gerçekleşmeyen 9 hastanın ortalama CPK-MB değerleri (30.98±3.44 Ü/L/mg prot.) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Normospermik 19 hastadan ovum fertilizasyonu gerçekleşen 14 hastanın CPK-MB ortalaması 17.13±3.67 Ü/L/mg prot. iken, ovum fertilizasyonu gerçekleşmeyen 5 hastada 29.14±5.83 Ü/L/mg prot. bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$, t-test). Sperm morfolojisi bakımından oligospermik ve normospermik hastalarda fertilizasyon olan ve olmayan gruplar arasında istatistiksel olarak belirgin fark mevcut ($p<0.05$, t-test).

Tablo 2'de İVF sonuçları gösterilmiştir. Oosit fertilizasyon oranı normospermiklerde % 78.9 iken, oligospermik erkeklerde bu % 30.7 bulunmuştur. Normospermik grupta 5 hasta (% 26.3) hamile kalırken, oligospermik grupta 1 hasta (%7.7) hamile kalabilmiştir.

Tablo 2. İVF sonuçları

	Normospermik (n:19)	Oligospermik (n:13)
Oosit fertilizasyonu	15/19 (%78.9)	4/13 (%30.7)
Hamilelik	5 (%26.3)	1 (%7.7)
Oosit fertilizasyon olanlarda hamilelik	5/15 (%33.3)	1/4 (%25)

TARTIŞMA

Literatürde sperm CPK aktivitesinin matür ve immatür spermleri ayırmak için kullanılabilecek iyi bir biokimyasal gösterge olduğu belirtilmektedir.^{5, 6} Çalışmamızda normospermik ve oligospermik erkeklerin sperm CPK-MB değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Oligospermik erkeklerde normospermik erkeklere göre daha yüksek CPK-MB değerleri mevcuttu. Bu durumu izah edecek bir kanıt olmamasına rağmen bu konuda yapılmış bir çalışmada radyoaktif bir prob kullanılarak sperm CPK aktivitesinin ölçümü, otoradyografi ve direkt immun boyama yapılmış ve yüksek aktivite gösteren spermlerin inkomplet matürasyon gösteren spermler olduğu saptanmıştır.¹³ Aynı çalışmada normal spermde CPK boyanması kuyruk ve mitokondride bulunurken özellikle baş morfolojisi bozuk olanlarda baş kısmı tamamen veya kısmen boyalı olduğu saptanmıştır. Boyanmanın artışı ile enzim aktivite artışı doğru orantılı bulunmuştur. Dolayısıyla, enzim aktivitesi yüksek semen örneklerinde morfolojik bozukluğun da yüksek olması beklenebilir.

Sperm CPK aktivitesinin sperm kalitesinin bir göstergesi olduğu ve spermatozoa'da rezidüel sitoplazmanın varlığını gösterdiği çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir.^{5,6} Rezidüel sitoplazmanın bir göstergesi olarak kullanılan glukoz-6 fosfat ile CPK birbirleri ile çok iyi korelasyon göstermişlerdir.⁵ Bir başka çalışmada a spermatogenezin erken ve geç dönemlerinin biokimyasal göstergesi olan laktat dehidrogenaz (LDH) ile CPK kıyaslanmasında, CPK'ın sperm kalitesini LDH'dan daha iyi gösterdiği belirtilmiştir.⁶ Bizim çalışmamızda da CPK-MB aktivitesi düşük olan grupta daha iyi olduğunun bir göstergesidir. Bunu destekleyen bir başka çalışmada ise insan sperm-hemizoma komplekslerinde CPK immuno-sitokimyasal boyama yapılmış ve CPK aktivitesi düşük matür spermlerin selektif olarak zona'ya bağlandıkları tesbit edilmiştir.⁷

Sperm morfoloji bozukluğu ile düşük İVF sonuçları arasında bağlantı olduğu bilinmektedir.¹⁴ Bizim çalışmamızda da ovum fertilizasyonu gerçekleşen oligospermik veya normospermik hastaların sperm morfolojileri ile fertilizasyon gerçekleşmeyen oligospermik veya normosper-

mik hastaların sperm morfolojileri arasında istatistiksel fark bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ovum fertilizasyon yeteneğini belirlemede hem oligospermiklerde hem de normospermiklerde sperm CPK-MB aktivitesinin sperm morfolojisine üstünlüğü gösterilememiştir. Türkiye'de sperm CPK-MB aktivitesi konusunda yapılmış bir çalışma bilginiz dahilinde yoktur. Literatürde ise bu konuda yapılmış çalışmalar çok sınırlı sayıdadır ve sperm CPK-MB aktivitesinin ölçümünün özellikle normospermik olup izah edilemeyen infertilite vakaların fertilizasyon potansiyelini ölçmekte kullanılabileceği belirtilmektedir.^{8,15} CPK-MB aktivitesinin ölçümü ile sperm morfolojisinin spermin fertilizasyon yeteneğini ölçmedeki prediktif değerleri çeşitli klinik çalışmalarla kıyaslanmalıdır.

İVF uygulaması sırasında fertilizasyon gerçekleşen 18 hastanın CPK-MB seviyeleri fertilizasyon gerçekleşmeyen 14 hastaya göre anlamlı olarak düşük oluşu sperm fertilizasyon yeteneği ile CPK-MB aktivitesi arasında bir ters pozitif bir ilişki olabileceğini göstermektedir. Erkek infertilitesi olan 13 hastanın ovum fertilizasyonu gerçekleşen dördünde CPK-MB seviyeleri fertilizasyon gerçekleşmeyen dokuz hastaya göre belirgin biçimde düşüktü. Fertil ve infertil gruplarda yapılan bir başka çalışmada intrauterin inseminasyonda başarılı olunan fertil oligospermik ve başarısız olunan infertil oligospermik gruplar arasında CPK aktivite farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.¹⁵ Bu fark fertil oligospermik ve fertil normospermik erkekler arasında bulunmamıştır. Ancak, bizim çalışmamızda swin-up sonrası sperm fraksiyonlarının CPK-MB değerleri örneklerin çok az oluşu nedeni ile ölçülemediğinden böyle bir kıyaslama yapamadık.

Sonuç olarak çalışmamızda sperm CPK-MB aktivite ölçümünün İVF'de ovum fertilizasyon şansını belirlemede değeri olduğu gösterilebilmiş, ancak sperm morfolojisinden daha üstün olduğu gösterilememiştir. Günümüzde mikroenjeksiyon tekniğinin yaygınlaşması ve daha fazla hamilelik şansının olması nedeni ile erkek infertilitesinde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sıklıkla önerilmektedir. Yöntemin pahalı oluşu bir dezavantajdır. Dolayısıyla daha ucuz olan İVF yönteminin önerilmesi, fertilizasyon şansının da-

ha net olarak belirlenebilmesi ile mümkündür. Bu amaçla spermde CPK-MB aktivitesi ile morfolojinin prediktif değerlerinin kıyaslanması için daha geniş serilerde de klinik çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1- Overstreet JW: Evaluation of sperm-cervical mucus interaction. *Fertil Steril* 45: 324-326, 1986.
- 2- Kennedy WP, Kaminski JM, Van Der Ven HH et al.: A simple clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J Androl* 10: 221-231, 1989.
- 3- Rogers BJ: The sperm penetration assay: its usefulness re-evaluated. *Fertil Steril* 43: 821-840, 1985.
- 4- Oehninger S, Coddington CC, Scott R et al.: Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 51: 665-670, 1989.
- 5- Aitken J, Krausz C, Buckingham D: Relationship between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leucocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* 39: 268-79, 1994.
- 6- Lalwani S, Sayme N, Vigue L, Corrales M, Huszar G: Biochemical markers of early and late spermatogenesis: relationship between the lactate dehydrogenase-X and creatine kinase-M isoform concentrations in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 43: 495-502, 1996.
- 7- Huszar G, Vigue L, Oehninger S: Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertil Steril* 61: 136-42, 1994.
- 8- Huszar G: Sperm creatine kinase: a bridge among sperm maturity, morphology, lipid peroxidation and fertility. *Biochemist* 16(2): 15-22, 1994.
- 9- Tombes RM, Shapiro BM: Metabolite channeling: A phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell* 41: 325-334, 1985.
- 10- WHO: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Third edition. Cambridge University Press, 3-21, 1992.
- 11- Würzburg V, Hennrich N et. al: A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase. *J Clin Chem Clin Biochem* 15: 131, 1997.

- 12- Lowry OH, Rosebrough NJ et al: Protein measurements with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265, 1951.
- 13- Huszar G, Vigue L: Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. Mol. Reprod. Dev. 34: 292-208, 1993.
- 14- Mankveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger T et al.: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to strict criteria. Hum. Reprod. 5: 586-592, 1990.
- 15- Huzsar G, Vigue L, Corrales M: Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile men. J Androl. 11: 40-46, 1990.