

# SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİNDE PERCOLL YERİNE PURESperm KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ

## EVALUATION OF PURESperm AS A SUBSTITUTE FOR PERCOLL IN SPERM PREPARATION TECHNIQUES

KADIOĞLU, T.C., KÖKSAL, İ.T, TUNÇ, M., NANE, İ., TELLALOĞLU, S.

### ÖZET

Bu çalışmada intrauterin inseminasyon ve invitro fertilizasyon için sperm hazırlanmasında kullanılan Percoll ile yeni bir ürün olan PureSperm'in karşılaştırılması yapılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre 40 semen örneği analiz edilmiş ve Percoll ve PureSperm ile ayrı ayrı gradyan santrifüj yöntemi kullanarak hazırlanmışlardır. Bu semen örneklerinden 20'si infertilite dışı çeşitli nedenlerle spermiogram istenmiş olan ve Dünya Sağlık Örgütü semen analiz kriterlerine göre normal bulunan 20 erkeğe aittir. Diğer 20 örnek ise erkek faktör nedeni ile intrauterin inseminasyon programına alınarak Androloji Laboratuvarımızda değerlendirilen 20 hastaya aittir. Hareketli sperm elde etme oranı son yıkamadan sonra mevcut olan hareketli sperm sayısı kullanılarak hesaplanmıştır. İleri hareketlilik ve morfolojik olarak normal sperm yüzdeleri her iki hazırlama yöntemi için hesaplanmış, ortalamalar birbiri ile karşılaştırılmış ve Student's t testi ile tekrarlanan ölçümlerin eşik değerleri ile karşılaştırılarak istatistik anlamlılıkla farklılık aranmıştır.

Her iki grupta PureSperm ve Percoll kullanılarak yapılan sperm hazırlamada ileri hareketlilik oranları veya Kruger Strict Morfolojide istatistiki anlamlılık gösteren saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ). Bununla birlikte iki grubunda her iki kategorisinde PureSperm ile alınan neticeler istatistiki anlamlılık içermese de daha üstün çıkmıştır. Çalışmamız morfoloji ve hareketlilik açısından insan spermelerini ayırtmada PureSperm'in Percoll kadar başarı ile kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Androloji Laboratuvarımızın bu yeni ürünün kullanımına geçişinde aynı gradyan yayma ve santrifüj tekniklerinin kullanılması önemli kolaylık sağlayacaktır.

### ABSTRACT

Puresperm a new commercially available sperm preparation media is compared with Percoll for possible use in artificial insemination and IVF.

Forty semen samples were analyzed according to current World Health Organization guidelines and prepared using gradient centrifugation with Percoll and PureSperm. Twenty belonged to normal males which spermiograms were required for various reasons and were normal according to W.H.O. Criteria.

The remaining 20 semen samples belonged to males which were referred to our Andrology Laboratory for the intrauterine insemination program due to male factor. The recovery for each preparation method was calculated as the percentage of the number recovered after final wash. The mean ( $\pm$  SD ) vitality, progressive motility, percentage of morphologically normal spermatozoa were calculated for each of the two preparation methods. Means were compared with each other and the baseline values by means of a repeated measure paired Student's - t test for possible statistically significant differences.

**ANAHTAR KELİMELEER:** İnfertilite,  
PureSperm, Sperm hazırlama tekniği

**KEY WORDS:** Infertility, PureSperm,  
Sperm preparation techniques

Dergiye geliş tarihi: 28.02.1999

Yayına kabul tarihi: 18.05.1999

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı/İSTANBUL

In both IUI group and normal group there has been no significant difference noted between the sperm populations obtained by using PureSperm and Percoll in terms of either the percentage yield for progressively motile fraction or Kruger Strict Morphology (  $p>0.05$  ). Moreover, recovery rate with PureSperm as slightly better than Percoll in all categories of both groups even though statistical significance was not present (  $p>0.05$  ).

Our study proves that PureSperm can be used instead of Percoll as it also allows the preparation of highly motile sperm populations of human's spermatozoa which are also morphologically selected. The fact that the same gradient technique and centrifugation conditions can be used will make the transition to this new medium easy for an Andrology Laboratory.

## GİRİŞ

İnsan semeninden hareketli ve morfolojik olarak normal spermilerin seçilmesi için değişik invitro yöntemler kullanılmıştır<sup>1</sup>. Araştırma ve klinik amaçlar ile son 13 yıl içinde Percoll (Pharmacia, Biotek AB, Upsala-Sweden) dansite gradyanları sperm hazırlamada başarı ile ve sıklıkla tercih edilen yöntem olmuştur<sup>2</sup>. Üretici firma tarafından Percoll'ün tüm klinik kullanımlardan geri çekilmesi sonucu Androloji Laboratuvarımız intrauterin inseminasyon uygulamaları için alternatif bir sperm hazırlama tekniği bulmak zorunda kalmıştır. Bu nedenle Percoll ile silane kaplı kolloid silika partiküllerinin hepes tamponlu izotonik solusyonundan oluşan ve PureSperm (Nidaccon Lab. AB, Göteborg, Sweden) ticari adı ile temin edilebilen yeni bir dansite gradyan materyalini karşılaştırmayı amaçlayan bu çalışmayı hazırladık.

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre 40 semen örneği analiz edildi ve Percoll ve PureSperm ile ayrı ayrı gradyan santrifüj yöntemi kullanılarak hazırlandı. Bu semen örneklerinden 20'si infertilite dışı çeşitli nedenlerle spermiogram istenmiş olan ve Dünya Sağlık Örgütü semen analiz kriterlerine göre normal bulunan 20 kişiye aittir. Birbirine paralel olarak iki konik tüpte oluşturulan 1.5 ml.'lik Percoll ve PureSperm gradyanlarının üzerine aynı kişiden alınan likefiye semen örneğinin pipetlenerek homojenize edilen 1ml.'lik miktarı yayıldı.

Percoll gradyanları %45 ve 90'lık (v/v orijinal Percoll), PureSperm gradyanları %40 ve 80'liktir (v/v). Gradyanlar paralel olarak 300 g' de 20 dakika santrifüj edildi ve daha sonra oluşan pelletler PureWash sıvı ortamında (Hepes tam-

ponlu modifiye Earle's Balanced Salt Solution +%0.2 Human Serum Albumin; Nidaccon Lab. AB, Göteborg, Sweden) çözüldü ve 600 g' de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Daha sonra supernatantların atılması ile her iki pellet 0.5-1.0 ml'lik PureWash sıvı ortamında yeniden çözüldü<sup>2</sup>.

Bu çözeltinin mikroskopik incelenmesi ile her iki hazırlama yönteminden elde edilen sonuçlar başlangıçta gradyan üzerine konulan örneklerdeki ileri hareketli sperm yüzdesi ile son yıkama sonucu elde edilenin karşılaştırılması sonucu saptandı. Değerler saptanan ortalamaların standart deviasyon sapmalarıyla birlikte hesaplandı. Ortalamalar birbirleri ile ve eşik değerler ile muhtemel istatistiki farklılıkları saptamak için tekrarlanan çiftlenmiş Student's-t testi ile karşılaştırıldı. Tüm analizlerde  $< 0.05$  p değeri istatistiki anlamlılık olarak kullanıldı.

## SONUÇLAR

Hem intrauterin inseminasyon grubunda hem de normal kişilerden oluşan grupta PureSperm ve Percoll kullanılarak elde edilen sperm örneklerinde ileri hareketli yüzdesinde veya Kruger Strict Criteria Morfolojisinde farklılık saptanmadı (  $p>0.05$  ) (Tablo - 1 ve Tablo - 2). Buna ek olarak her iki grubun tüm kategorilerinde PureSperm ile elde edilen sonuçlar Percoll'den istatistiki anlamlılık içermese de daha üstün çıkmıştır (  $p>0.05$  ).

| Semen değerleri       | Ort. Değer | Percoll | PureSperm |
|-----------------------|------------|---------|-----------|
| İleri hareketlilik(%) | 65±14.2    | 92±17.3 | 96±16.6   |
| Canlılık(%)           | 71±16.1    | 84±14.5 | 92±13.8   |
| Normal morfoloji(%)   | 5.2±2.1    | 5.8±1.7 | 6.1±2.2   |

Tablo 1. Normal grup  
(Elde edilen toplam sperm yüzdesi: %59.4±18.7)

| Semen değerleri        | Ort. değer | Percoll | PureSperm  |
|------------------------|------------|---------|------------|
| İleri hareketlilik (%) | 26±10.6    | 84±19.1 | 89±18.6.2. |
| Canlılık(%)            | 54±17.5    | 73±13.2 | 80±10.2    |
| Normal morfoloji (%)   | 2.3±1.6    | 4.2±1.5 | 4.8±1.6    |

Tablo 2. IUI grubu

(Elde edilen toplam sperm yüzdesi: %42.5±21.3)

## TARTIŞMA

Percoll gradyan santrifüj yöntemi birçok Androloji Laboratuvarının yıllardır kullandığı standart sperm hazırlama yöntemidir<sup>3,4</sup>. Birçok çalışmada Percoll gradyanlarının güvenilir olarak motil spermeleri ayırdığı, debris uzaklaştırdığı, in vitro fertilizasyon ve intrauterin inseminasyon uygulamalarında fertilizasyon ve hamilelik oranlarını artırdığı saptanmıştır<sup>1,4-7</sup>. PureSperm insan ejakülatından santrifüj yöntemi ile sperm hücrelerini ayırtmak için kullanıma yeni sunulan bir dansite gradyan kolloid tuz solusyonunun tescilli ismidir. PureSperm izotonik tuz solusyonu içinde silane ile sıkıca kaplı silika partiküllerinin koloidal çözeltisinden oluşmaktadır. Oda sıcaklığında ve 37 C' de pH değeri 7.4 - 7.8 arasında olup 300 - 310 mO/kg izotonik yapıdadır. PureSperm hepes ile tamponlanmış olup glikoz içerir, son aşamada otoklav yöntemi ile sterilize edilmiş olup düşük endotoksin seviyeleri içermektedir. PureSperm'in Percoll ile formülasyonunda benzerlik olmasında organikten ziyade mineral yapıda bulunması ve düşük yoğunluk ve osmatik etkiye rağmen yüksek spesifik gravitesinin olması rol oynamaktadır. Yüksek oranda hareketli ve morfolojik olarak normal hücrelerin seçilmesini sağlaması nedeni ile çalışmamız PureSperm dansite gradyanının Percoll yerine kullanılabileceğini göstermiştir. Aynı gradyan ve santrifüj tekniklerinin uygulanabilmesi bu yeni medyuma geçişte Androloji Laboratuvarlarına önemli kolaylık sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- 1- Frydman N, Guthausen B, Conord C, et al: IVF and ICSI outcome after separation of motile spermatozoa by PureSperm and Percoll gradients. 14 th Annual Meeting, Göteborg, 21 - 24 June 1998. Hum Reprod. Vol 13, Abstract book 1, p- 126.
- 2- Kossakowski J, Morrison L and Mortimer D: Evaluation of PureSperm gradients instead of Percoll for Human spermatozoa. 13 th annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Edinburgh, 22 - 25 June 1997, Vol 12, abstract no: O - 179.
- 3- Menkweld R, Claassens OE, Harrison KL, et al: Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. 14 th Annual Meeting, Göteborg, 21-24 June 1998. Hum Reprod. Vol. 13, Abstract book 1, p- 020.
- 4- Carell DT, Peterson CM, and Thorp C: Comparison of motile sperm recovery, HOS reactivity, longevity, and penetration capability following gradient centrifugation with Percoll or two commercially available sperm preparation gradient solutions. 14 th Annual Meeting, Göteborg, 21-24 June 1998. Hum Reprod. Vol. 13, Abstract book 1, p-024.
- 5- Lundin K, Söderlund B, Forsberg AS, et al: A new gradient separation medium. 5 th international congress on ART, Rome, 16-19 September 1997, preliminary program.
- 6- Hossain A, Rizk B, Viyouth N, et al: Efficacy of sperm preparation column in eliminating spermatozoa possessing abnormal DNA. 16 th world congress on fertility and sterility and 54 th annual meeting of the American society for reproductive medicine, 4-9 October 1998, program supplement to Fertility and Sterility. Abstract no: p- 591.
- 7- Herruzo A, Molina J, Hortas ML, et al: Sperm preparation techniques and chromatin condensation. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Canada, 24-28 May 1997, Vol. 14, No 5, abstract no: p-17-385.