

ORJİNAL YAZI

## Farklı Fiksasyon Protokolleri ile Sperm Kromatin Kondansasyon Anomalisinin Değerlendirilmesi

**Berrin AVCI**

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

### ÖZET

Sperm kromatininin bütünlüğü, özellikle ICSI uygulamalarında, fertilizasyon başarısında önemli rol oynar. Nükleer kromatin kondansasyonundaki azalış aniline blue, acridine orange, chromamycine A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) gibi boya ve fluorokromlarla değerlendirilir. Aniline blue, kondansasyon anomalisi ile birlikte morfolojisini de değerlendiren bir boyadır. Fluorokromlar fertilizasyon başarı hızı ile kondansasyon anomalisi arasındaki korelasyonu saptamada en güvenilir boyalar olarak bildirilmiştir. Kısıtlı miktarda olan ICSI materyaline uygulanan bu boyalarda farklı fiksasyon protokolleri uygulanır. Bu çalışmada kromatin kondansasyonunu değerlendirmede uygulanan boyama metodlarında kullanılan en kısa ve pratik fiksasyon protokolünü bulmak amaçlandı. Toplam 5 hastanın swim-up yöntemi ile hazırlanan semen örnekleri Carnoy'un solüsyonunda 4°C'de 5 dk, oda sıcaklığında 2 saat ve % 3'lük glutaraldehitte 20 dk fikse edildi. Farklı protokollerle fikse edilen preparatlara aniline blue, acridine orange ve CMA<sub>3</sub> boyamaları uygulandı. Boyanma kalitesi açısından gruplarda fark görülmedi. Her üç boyamada da Carnoy'un solüsyonunda 4°C'de 5 dk fiksasyonun yeterli olduğu görüşüne varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Sperm kondansasyon anomalisi. Aniline blue. Acridine orange. Chromamycine A<sub>3</sub>.

### Evaluation of Sperm Decondensation Anomalies with Different Fixation Protocols

#### SUMMARY

The integrity of sperm chromatin may play an important role for fertilization success, particularly in ICSI applications. Decreased nuclear chromatin condensation is assessed by using stain and fluorochroms such as aniline blue, acridine orange and chromamycine A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>). Aniline blue is a stain that evaluates sperm morphology together with chromatin condensation anomalies. Fluorochroms are suggested that they are the most reliable stain for assessment of correlation between condensation anomalies and fertilization success. There are used different fixation protocols for these staining methods. In this study, it is aimed to find the most practical and brief fixation protocol for evaluation of chromatin condensation. A total of 5 semen samples prepared by swim-up technic were fixed with Carnoy's solution for 5 minutes at 4°C or 2 hours at room temperature or 3% glutaraldehyde for 20 minutes at room temperature. Aniline blue, acridine orange and CMA<sub>3</sub> were applied on slides fixed with different fixatives. No staining quality difference was observed between groups. Our results showed that fixation with Carnoy's solution for 5 minutes at 4°C is satisfactory for all of the staining methods.

**Key Words:** Sperm condensation anomalies. Aniline blue. Acridine orange. Chromamycine A<sub>3</sub>.

Spermioyogenezisde, mayozun tamamlanması ile oluşan immatür spermatidler olgunlaşarak testiküler ya da olgun sperm formunu alırlar. Bu süreçte spermatid çekirdeğindeki histonların yerini protaminler alır. Pozitif yüklü protamin ve negatif yüklü DNA iskeleti arasında, moleküller arası kuvvetli etkileşim DNA'nın bazik karakterli protamine bağlanmasını kolaylaştırarak kromatin yoğunlaşmasına neden olur<sup>1</sup>. Protaminlerdeki disülfid çapraz bağlar sağlam bir yapı kazanarak kromatinin dirençli

olmasını, stabilizasyonunu sağlar. Kondanse kromatinde bulunan bu insolubl, inaktif kromatin genetik olarak aktif somatik nükleusda bulunandan çok farklıdır. Kromatinin kondanse olarak sperm çekirdeği içine yerleşmesi, spermilerin oosit çevresindeki hareketini kolaylaştırıcı bir özellik olarak kabul edilir. Diğer olumlu etkisi de DNA'yı mutajenlerden korumaktır. Pronükleer gelişim için kondanse formda olan kromatin sitoplazmada dağılır (decondansasyon) ve erkek pronükleus membranı yeniden oluşur. Kondanse sperm kromatininin erkek pronükleuslarındaki yaygın forma geçişi çok hızlı bir değişimdir. Kromatin dağılımı erkek pronükleusunun oluşumunda anahtar rol oynar.

Sperm kromatin kondansasyonunun gelişimi (nükleusun stabilizasyonu) her zaman tamamlanamaz. Bu gelişim anomalisi sonuçta sperm fertilizasyon yeteneğini olumsuz yönde etkiler. Dolayısıyla sperm nükleusunun stabilitesi IVF uygulamalarında, doğal seleksiyonun gerçekleşmediği ICSI işlemlerinde

Geliş Tarih: 08.08.2006  
Kabul Tarihi: 20.09.2006

Dr. Berrin AVCI  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
16059 Görükle /BURSA  
Tif. 0.224.4428200/21062  
Fax: 0.224.44428723

başarı oranını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Sperm anormalliklerinin olduğu erkeklerde, spermde gevşek paketlenmiş (dekondanse) kromatin ve endojen sarmal kıvrımları daha çoktur<sup>2-4</sup>. Genetik olarak hasarlı sperm, ICSI sonrasında fertilizasyon sağlayabilse de, erkek pronükleusunun ilk klivaj bölünmesi ve sonrasındaki gelişim potansiyeli belirsizdir<sup>5</sup>.

In vitro fertilizasyon ve ICSI sonuçlarında, kromatin defektlerindeki artış ile fertilizasyon hızındaki azalışı birbirine bağlayan birçok çalışma rapor edilmiştir<sup>6-9</sup>. Spermiumda nükleer kromatin kondansasyonunun değerlendirilmesi aniline blue, methyl blue, Giemsa, ethidium bromide, acridine orange ve chromomycine A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) gibi boya ve fluorokromlar kullanılarak yapılabilir<sup>8, 10-13</sup>. Olgun sperm kromatini bu boyalara değişken bağlanma kapasitesi gösterir. Bu farklılığın, spermiyogenesis esnasında gerçekleşen nükleoprotein komponentlerinin modifikasyonundan dolayı paketlenme kalitesindeki anomalilerin yansması olduğuna inanılır.

Bu metotlarda aniline blue lizinden zengin histonlara bağlanarak histon fazlalığını gösterir<sup>12</sup>. CMA<sub>3</sub> bir fluorokromdur. Gevşek olarak paketlenmiş kromatinde protamin eksikliğini gösterir ve DNA kırıklarının uzunluğu ile ilişkilidir<sup>11, 12</sup>. Acridine orange, kromatin denaturasyona kromatin rezistansını gösterir. Literatürde CMA<sub>3</sub> ve acridine orange için farklı protokollerde iritan özellikte Carnoy'un solüsyonu, aniline blue için %3'lük glutaraldehit gibi toksik fiksatifler önerilmektedir<sup>8-13</sup>.

Bu çalışmada, kromatin kondansasyon anomalisini saptamada kullanılan ve literatürde birbirleriyle korelasyonu konusunda ortak bir görüşün bulunmadığı CMA<sub>3</sub>, acridine orange ve aniline blue boyamalarında, halen bu metotlarda kullanılan fiksatifler arasından, her üç boya için de kullanılabilir ve kısa sürede uygulanan ortak bir fiksasyon protokolü oluşturmak ve üç boya arasındaki korelasyonu değerlendirmek amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Toplam 5 hastanın semen örneği 3-5 gün cinsel perhizin ardından mastürbasyon yoluyla toplandı. Semen örnekleri oda sıcaklığında 15-20 dk likefiye olması için bekletildi. Her bir hastadan alınan örnekler swim-up tekniği ile hazırlandı. Örnekler 3 farklı tüpe, her tüpe 0.5 ml olacak şekilde bölündü. Fiksasyon aşamasında 1. tüpe Carnoy'un solüsyonu (metanol/asetik asit, 3/1) 1 ml eklendi ve 4°C'de 5 dk bekletildi. 2. tüpe aynı fiksatiftan 1 ml konarak oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. 3. tüpe içine 1 ml %3'lük glutaraldehit eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Fiksasyon süreleri tamamlanınca örnekler santrifüj edildi, supernatant atılarak elde edilen pelletlerden yayma preparat hazırlandı. Sırasıyla 1. tüpten 3 (CMA<sub>3</sub>, acridine orange ve aniline blue

boyaması için), 2. tüpten 2 (acridine orange ve aniline blue boyaması için), 3. tüpten 1 adet (aniline blue boyaması için) yayma preparat hazırlandı ve havada kurutuldu.

### Aniline Blue Boyaması

Her hastanın farklı fiksasyon protokolü uygulanan (Carnoy'un solüsyonu 4°C'de 5 dk, Carnoy'un solüsyonu oda sıcaklığında 2 saat, %3'lük glutaraldehit, oda sıcaklığında 30 dk) muamele edilen üç preparatı 5 dk süreyle %5 aköz aniline blue solüsyonu (pH=3.5) ile boyandı. Preparatlar havada kurutulduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskopunda x100 büyütmede değerlendirildi. Koyu mavi boyanmış sperm nükleusları aniline blue (+), boya almamış spermier aniline blue (-) olarak değerlendirildi.

### Acridine Orange Boyaması

Her hastanın farklı iki fiksasyon protokolü uygulanan (Carnoy'un solüsyonu 4°C'de 5 dk, Carnoy'un solüsyonu oda sıcaklığında 2 saat) iki preparatı taze hazırlanmış 0.19mg/ ml<sup>-1</sup> acridine orange (10 ml %1'lik acridine orange solüsyonu, 40 ml 0.1 M sitrik asit, 2.5 ml 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O karışımı, pH 2.5) ile karanlıkta 5 dk süreyle boyandı. Distile suyla yıkanan preparatlar kurumadan lamelle kapatılarak epifluoresan mikroskop (Nikon E600) ile triple incelendi ve Quips Imaging System ve filtre seti (triple; dapi/red/green, dual color; red/green, single red, single green, single aqua, and single gold. Vysis) kullanılarak fotograflandı. Yeşil floresan veren spermier normal DNA'lı sperm, sarı-oranj-kırmızı floresan verenler hasarlı DNA'ya sahip spermier olarak değerlendirildi.

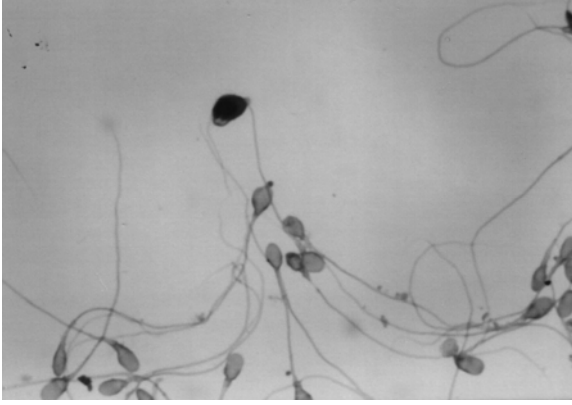
### Chromomycine A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) Boyaması

Her hastanın Carnoy'un solüsyonunda 4°C'de 5 dk fikse edilen preparatı 20 dk süreyle karanlıkta 200µl CMA<sub>3</sub> (10 mM MgCl<sub>2</sub> içeren 0.25 mg/ml<sup>-1</sup> Mc Ilvaine tamponu içinde, pH 7.0) ile boyandı. Tamponda yıkandıktan sonra preparat havada kurutuldu. Tamponlu gliserol ile kapatıldıktan sonra epifluoresan mikroskop (Nikon E600) ile triple incelendi ve Quips Imaging System ve filtre seti (triple; dapi/red/green, dual color; red/green, single red, single green, single aqua, and single gold. Vysis) kullanılarak fotograflandı. Parlak sarı floresan veren spermier dekondanse, soluk-mat sarı boyananlar kondanse spermier olarak değerlendirildi.

## Bulgular

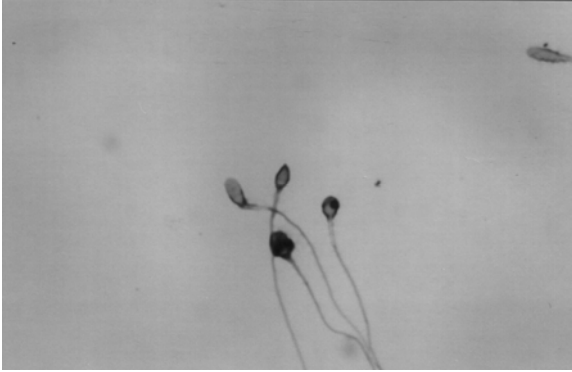
Aniline blue ile boyanan farklı 3 fiksatifin kullanıldığı preparatlarda boyanma gerçekleşti (Şekil 1, 2, 3). Koyu mavi boyanan spermier kondansasyon anomalisi pozitif olarak değerlendirildi. Spermierin morfolojileri üç grupta da net olarak değerlendirilebiliyordu.

## Sperm Kromatin Kondansasyonu



Şekil 1:

Carnoy'un solüsyonunda 4°C'de 5 dk fikse edilen semen örneğine uygulanan aniline blue boyamasında normal (aniline blue -, boya almamış) ve kondansasyon anomalisi olan (aniline blue +, koyu mavi) spermeler, x100.



Şekil 2:

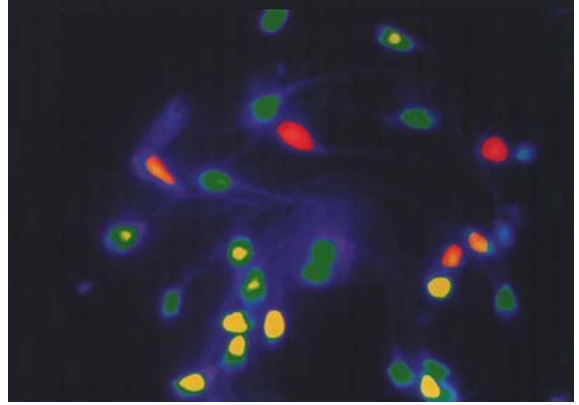
Carnoy'un solüsyonunda oda sıcaklığında 2 saat fikse edilen semen örneğine uygulanan aniline blue boyamasında normal (aniline blue -, boya almamış) ve kondansasyon anomalisi olan (aniline blue +, koyu mavi) spermeler, x100.



Şekil 3:

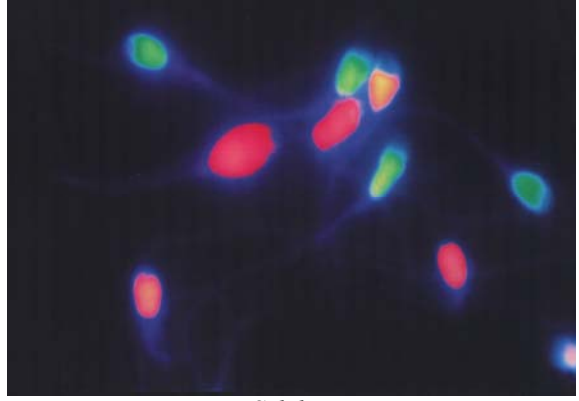
%3'lük glutataldehitte oda sıcaklığında 20 dk fikse edilen semen örneğine uygulanan aniline blue boyamasında normal (aniline blue -, boya almamış) ve kondansasyon anomalisi olan (aniline blue +, koyu mavi) spermeler, x100.

Acridine orange ile boyanan farklı iki fiksatifin kullanıldığı preparatlarda sperm başlarında yeşil, sarı, oranj ve kırmızı boyanmalar elde edildi (Şekil 4, 5).



Şekil 4:

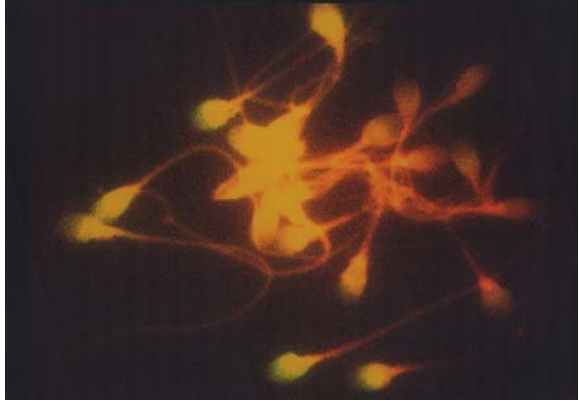
Carnoy'un solüsyonunda 4°C'de 5 dk fikse edilen semen örneğine uygulanan acridine orange boyamasında normal (yeşil), ve kondansasyon anomalisi olan (sarı, oranj ve kırmızı) spermeler, x100.



Şekil 5:

Carnoy'un solüsyonunda oda sıcaklığında 2 saat fikse edilen semen örneğine uygulanan acridine orange boyamasında normal (yeşil), ve kondansasyon anomalisi olan (sarı, oranj ve kırmızı) spermeler, x100.

CMA<sub>3</sub> boyaması uygulanan preparatlarda anormal kromatinli spermelerde parlak sarı ve normal kromatinli spermelerde mat sarı boyanmalar görüldü (Şekil 6).



Şekil 6:

Carnoy'un solüsyonunda 4°C'de 5 dk fikse edilen semen örneğine uygulanan CMA<sub>3</sub> boyamasında normal (mat sarı), ve kondansasyon anomalisi olan (parlak sarı) spermeler, x100.

## Tartışma

IVF ve ICSI uygulamalarında sperm kromatin anomalileri ve fertilizasyon başarı oranı arasındaki ters korelasyona ait sonuçların bildirildiği birçok çalışma vardır<sup>6,7,9</sup>. Zayıf kromatin paketlenmesi ve muhtemel DNA hasarı, ICSI sonrası sperm dekondansasyon yetersizliği ile ilişkilidir ve fertilizasyon başarısızlığı ile sonuçlanır<sup>9</sup>.

Nükleer kromatin kondansasyonunun azalışı aniline blue<sup>14</sup>, acridine orange<sup>11,13,15</sup> ve chromamycine A<sub>3</sub><sup>10-13</sup> gibi boya ve fluorokromlarla değerlendirilebilir. Yapılan çalışmalarda kromatin kondansasyonu ve fertilizasyon başarı hızı ile ters korelasyonun değerlendirilmesinde en güvenilir sonuçların CMA<sub>3</sub> boyaması ile elde edildiği bildirilmiştir<sup>10-13</sup>. Uygulanabilirliği açısından aniline blue boyaması daha pratik bir yöntemdir. Morfoloji ve kromatin kondansasyonunun değerlendirilmesi beraber yapılabilmektedir<sup>14</sup>. Henüz yayınlanmamış bir çalışmamızda 96 adet fertil ve subfertil hastanın semen örneklerinde anilin blue ile detaylı morfoloji ve kromatin kondansasyon anomalisinin korelasyonu değerlendirilmiştir. Bazı morfolojik formlarla (sitoplazmik droplet, küçük akrozomlu ve akrozomsuz sperm, immatür sperm) kondansasyon anomalisinin pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. ICSI'nin kullanılmasıyla şiddetli erkek infertilitesi faktörü olan olgularda başka seçenek kalmadığında aberran ve immatür spermatozoa türleri enjekte edilebilmektedir. Bu, güvenli embriyo oluşumu açısından tartışmalı bir durumdur. Cebesoy ve ark.'nın<sup>16</sup> çalışmasında acridine orange boyaması uyguladıkları ICSI sperm örneklerinde sperm morfolojisi ile kromozom yapısı arasında net bir ilişki olduğu bildirilmiştir.

Aniline blue, acridine orange ve CMA<sub>3</sub> boyama protokollerinde farklı fiksatifler uygulanmaktadır. Aynı metot için farklı fiksatifleri değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Sperm DNA'sına kriyopreservasyonun etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, % 2 glutaraldehit, % 4 paraformaldehit, Diff Quik çözümü ve Carnoy'un çözümü kullanılarak acridine orange boyamasının sonuçları karşılaştırılmıştır<sup>15</sup>. Carnoy'un fiksatifinin DNA hasarının değerlendirilmesinde daha kaliteli, tanı koydurucu değerler verdiği rapor edilmiştir. Kromatin kondansasyon anomalisinin değerlendirilmesinde kullanılan metotların aynı örnekte uygulanabilirliği, ICSI materyalinin kısıtlılığı nedeniyle problem oluşturmaktadır. Tek bir fiksasyon metodunun ardından farklı boyama protokollerini uygulamak, hem materyalin daha az kullanılması, hem de zaman kazancı ve pratik olması açısından tercih edilebilir bir yaklaşımdır. Bu çalışmada, CMA<sub>3</sub> için uygulanan fiksasyon protokolü (Carnoy'un çözümü, 4°C'de 5 dk) en kısa protokol olduğu için diğer metotlarda uygulanabilirliğini de-

ğerlendirmeyi amaçladık. Carnoy'un çözümünde 4°C'de 5 dk süreyle fikse edilen preparatlara uygulanan acridine orange ve aniline blue boyamalarında literatürde önerilen fiksatiflerle aynı boyanma kalitesinde preparatlar elde edilmiştir.

Bulgularımız doğrultusunda; sperm kromatin kondansasyonunu değerlendirmek amacıyla uygulanan aniline blue, acridine orange boyamalarında Carnoy'un çözümünde 5 dk süreyle fiksasyonun yeterli olduğu ve bu amaçla kullanılabileceği sonucuna varıldı.

## Kaynaklar

1. 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.
2. 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.
3. Larson KL, De Jonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000, 15 (8): 1717-22.
4. 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.
5. De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003, 79(1):42-8.
6. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertility and Sterility* 1996, 66: 634-39.
7. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1996, 11:837-43.
8. Sun J, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* 1997, 56: 602-7.
9. Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E: Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* 2001, 46(2): 99-104.
10. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorescence staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1993, 49: 1083-88.
11. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2001, 18(4): 219-25.
12. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 2003, 35: 238-43.

## Sperm Kromatin Kondansasyonu

13. Pina-Guzman B, Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B: Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005, 202: 189-98.
14. Hammadeh ME, Nkemayim DC, Geog T, Rosenbaum P, Schmidt: Sperm morphology and chromatin condensation before and after semen processing. *Archive of Andrology* 2000, 44:221-6.
15. Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia* 2004, 36: 321-6.
16. Cebesoy FB, Ünlü C, Aydos K, Baltacı V. Sperm morfolojisi ve acridine orange boyamasının ICSI'deki fertilizasyon oranları ve embriyo kalitesi ile ilişkisi. *Journal of Turkish-German Gynecological Association* 2006, 7(2):110-4.