

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Kısa Abstinens Süresiyle Ardışık Ejakülasyonun Sperm Kromatin Bütünlüğü ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi*

Seda IŞIKLAR¹, Cihan ÇAKIR¹, Işıl KASAPOĞLU², Göktan KUŞPINAR¹, Kiper ASLAN², Gürkan UNCU², Berrin AVCI¹

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

² Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında tercih edilen tedavi yaklaşımına göre semen parametrelerinin embriyoloji laboratuvarı sonuçlarına ve klinik başarıya etkisi değişmektedir. Semen parametreleri abstinens süresine ve androloji laboratuvarında uygulanan yıkama protokollerine göre değişmekte ve insemine edilecek sperm materyalinin kalitesini etkilemektedir. Bu çalışmada normozoospermik erkeklerde kısa abstinens süresinin rutin semen parametrelerine, sperm kromatin ve DNA bütünlüğüne, oksidatif strese karşı gelişen antioksidan kapasiteye etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. Aynı hastadan ardışık ejakülasyonla 2-5 günlük abstinens süresi sonrası (n=36) ve 1 saat abstinens süresi sonrası (n=36) alınan numuneler yıkama öncesi ve yıkama sonrası değerlendirildi. Yıkama öncesinde sperm volümünün ve total motil sperm sayısının kısa abstinens grubunda anlamlı olarak azaldığı bulundu. Yıkama sonrasında gruplar arasında motilitenin değişmediği, konsantrasyonun kısa abstinens grubunda anlamlı olarak azaldığı görüldü. Abstinens süresi kısa tutulduğunda sperm kromatin hasarının ve DNA fragmentasyon oranının azaldığı, antioksidan kapasitede bir değişiklik oluşturmadığı saptandı. Sonuç olarak normozoospermik olgularda, abstinens süresinin kısa tutulması sperm konsantrasyonunu ve total progressif motil sperm sayısını azaltmakla birlikte, uygulanacak üremeye yardımcı tedavi yaklaşımına göre inseminasyonda kromatin ve DNA bütünlüğü açısından daha kaliteli sperm kullanılmasına imkan sağlayacaktır. Ardışık ejakülasyon ve abstinens süresindeki kısalma antioksidan kapasitede olumlu ya da olumsuz bir etki oluşturmamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Semen analizi. Sperm DNA fragmentasyonu. Sperm morfolojisi. Anilin mavisi. Total antioksidan kapasitesi.

Effect of Sequential Ejaculation with Short Abstinence Time on Sperm Chromatin Integrity and Antioxidant Activity

ABSTRACT

The effects of semen parameters on embryology laboratory results and clinical success vary according to the preferred treatment approach in assisted reproductive technology. Semen parameters vary according to the duration of abstinence and the washing protocols applied in the andrology laboratory and effect the quality of the sperm material to be inseminated. This study aimed to evaluate the effect of a short abstinence period on routine semen parameters, sperm chromatin, DNA integrity, and antioxidant capacity against oxidative stress in normozoospermic men. Samples taken from the same patient after 2-5 days of abstinence with consecutive ejaculation (n=36) and after 1 hour of abstinence (n=36) were evaluated before and after washing. It was found that sperm volume and total motile sperm count were significantly decreased in the short abstinence group before washing. It was observed that motility did not change between the groups after washing, and the concentration decreased significantly in the short abstinence group. It was determined that sperm chromatin damage and DNA fragmentation rate decreased when the abstinence period was kept short, and there was no change in antioxidant capacity. As a result, in normozoospermic cases, keeping the abstinence period short will decrease sperm concentration and total progressive motile sperm count and allow the use of higher quality sperm in terms of chromatin and DNA integrity in insemination compared to the assisted approach reproductive treatment. Sequential ejaculation and shortening of the abstinence time do not have a positive or negative effect on the antioxidant capacity.

Key Words: Semen analysis. Sperm DNA fragmentation. Sperm morphology. Aniline blue. Total antioxidant capacity.

Geliş Tarihi: 28.Haziran.2022

Kabul Tarihi: 20.Temmuz.2022

* 16. Uludağ Jinekoloji ve Obstetrik Kış Kongresinde (10 – 13 Mart 2022, Bursa) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Dr. Berrin AVCI
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Bursa.
Tel:0532 564 99 07
E-posta: berrin@uludag.edu.tr

Yazarların ORCID Bilgileri:

Seda IŞIKLAR: 0000-0003-3922-2009
Cihan ÇAKIR: 0000-0002-8332-7353
Işıl KASAPOĞLU: 0000-0002-1953-2475
Göktan KUSPINAR: 0000-0002-0338-8368
Kiper ASLAN: 0000-0002-9277-7735
Gürkan UNCU: 0000-0001-7660-8344
Berrin AVCI: 0000-0001-8135-5468

Rutin semen analizinde değerlendirilen sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi erkek infertilitesini tanımlamada önemli parametrelerdir¹⁻². Semen numunelerinin güvenilir yorumu için 2-7 günlük abstinens süresi önerilir. Çünkü semen hacmi, sperm konsantrasyonu ve ejakülatındaki toplam sperm sayısı, ilk 24 saatte belirgin olacak şekilde, 4-10 güne kadar artan abstinens süresine bağlı olarak geçici şekilde artar. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda 24 saatlik abstinens süresi sonrası verilen ejakülatta sperm motilite ve morfolojisinde iyileşme sağlandığı görülmüştür³⁻⁴. Normozoospermik ve oligozoospermik erkeklerde, 24 saatten daha az abstinens süresinde, ortalama olarak ileri hareketli sperm yüzdesinde ve normal sperm morfolojisinde artış olduğu görülmüştür⁵. Bahadır ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada normozoospermik olgularda semen parametrelerinin artan abstinens süresi ile birlikte iyileştiği, bununla birlikte oligozoospermik olgularda konsantrasyon, motilite ve morfolojinin abstinens süresi azaldıkça artış gösterdiği vurgulanmıştır⁶. Uzun abstinens süresi epididimiste depolanma sürecinde anormal spermatozoa sayısının ve granülositler tarafından üretilen reaktif oksijen radikallerinin (ROS) artışına sebep olur. ROS artışı sperm kromatin kondansasyon anomalilerine ve sperm DNA kırıklarına neden olur⁷⁻⁸. Bu nedenle sperm DNA fragmentasyonu ve abstinens süresi arasında anlamlı pozitif ilişki olduğu düşünülmektedir⁹⁻¹⁰. Ejakülat hücrenin reaktif oksijen türleriyle uyarılmasını sağlayan lipid peroksidasyonundan koruyan antioksidanlar mevcuttur¹¹. İdiyopatik infertil erkek popülasyonunda antioksidan kapasitenin fertil olgulardan daha düşük olduğu gösterilmiştir¹².

Bu çalışmada 'abstinens süresinin kısa tutulması semen parametrelerini, sperm kromatin ve DNA bütünlüğünü ve antioksidan kapasiteyi iyileştirici etki gösterir' hipotezinden yola çıkarak, normozoospermik erkeklerde ardışık olarak alınan ejakülat örneklerinde kısa abstinens süresinin rutin semen parametrelerine, sperm kromatin ve DNA bütünlüğüne, oksidatif strese karşı gelişen antioksidan kapasiteye etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hasta Seçimi

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarına Kasım 2020 ve Nisan 2021 tarihleri arasında spermioyogram analizi için başvuran hastaların rutin analiz sonrası imha edilen semen örnekleri çalışma kapsamında değerlendirmeye alındı.

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Uygulamalar Etik Kurulu'nun 14.10.2020 tarih 2020-18/18no'lu izni ile çalışma gerçekleştirildi.

Çalışmaya katılan her hastadan bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ile izinleri alındı.

Semen Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması

Spermioyogram analizi için başvuran 36 adet normozoospermik (≥ 15 mil/ml sperm) olgu çalışmaya dahil edildi. Her hastadan aynı gün birer saat arayla 2 kez ejakülat örneği alındı. Aynı hastalara ait örnekler;

Kontrol grubu; 2-5 günlük abstinens süresi sonrası alınan numuneler (n=36).

Çalışma grubu; Aynı hasta grubundan 1 saat abstinens süresi sonrası alınan numuneler olacak şekilde gruplandı (n=36).

Semen analizi öncesinde numuneler likefaksiyon için %5 CO₂, %99 nem ve 37°C sıcaklıkta inkübatörde 15-60 dakika bekletildi. Ardından ejakülat örneği homojen dağılım için pastör pipeti yardımıyla karıştırıldı ve 15 ml'lik konik santrifüj tüpüne alınarak semen volümü kaydedildi. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre standart semen analizi yapıldı¹³. Likefiye olmuş numuneden 10 µl makler kamaraya damlatıldı, Olympus CX31 faz kontrast mikroskopunda x20 büyütme altında sperm konsantrasyonu ve motilitesi değerlendirildi. Semen volümü dikkate alınarak total motil sperm sayısı hesaplandı¹³. Yıkama öncesi detaylı morfolojik değerlendirme (Diff Quick boyaması), viabilite değerlendirmesi (Eosin-Y testi) ve kromatin hasarının değerlendirilmesi (Anilin mavisi boyaması) için kontrol ve çalışma gruplarını oluşturan tüm ejakülat örneklerinden 3'er adet yayma preparat hazırlandı.

Rutin spermioyogram analizi sonrası basit yıkama işlemi yapıldı. Semen örneği ve üzerine yavaşça eklenen yıkama mediumu (G-IVF Plus, VITROLIFE, Sweden) 1/1 oranında 15 ml hacimli konik falkon tüpü içerisine koyuldu ve x300g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve dipte kalan 0,5 ml pellet 5 ml'lik tüp içerisinde alındı. Swim-up işlemi için üzerine 1 ml yıkama mediumundan yavaşça (G-IVF Plus, VITROLIFE, Sweden) eklendi. Tüp 45 derece eğimli olarak 37°C'de yaklaşık 1 saat inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası tüpün içindeki kültür medyumunun en üstteki 1 ml'lik kısmı ayrı bir tüpe aktarıldı.

Swim-up sonrası kaliteli ve motil spermilerin bulunduğu 1 ml'lik kısımdan 10µl makler kamaraya damlatılarak sperm konsantrasyonu, motilitesi, total motil sperm sayısı hesaplandı.

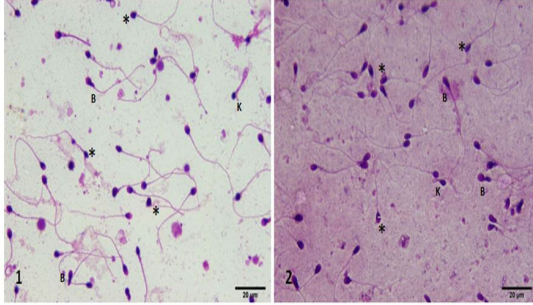
Swim-up yöntemi ile elde edilen sperm solüsyonundan 0,5 ml'lik numune endorf tüpüne alındı ve -20°C'de muhafaza edildi. Dondurulan semen örneklerinde daha sonra ticari kit kullanılarak enzime bağlı immünosorbent tahlil (ELİSA) yöntemiyle total antioksidan kapasitesine bakıldı. Tüm işlemler kontrol ve çalışma grubu olarak ayrılan semen numunelerine uygulandı.

Ardışık Ejakülasyonun Semen Parametrelerine Etkisi

Yıkama sonrası oluşturulan yayma preparatlarda DNA fragmentasyon indeksi TUNEL metodu kullanılarak analiz edildi. Çalışmanın sonunda normozoospermik hasta grubunda, ardışık olarak alınan semen örneklerinde abstinens sürelerindeki farklılığa bağlı olarak ileri semen parametrelerine bakılarak kromatin bütünlüğü ve antioksidan aktiviteye etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Morfolojik Değerlendirme

Yayma preparatlar fiksasyon sonrası DIFF-3 Rapid Differential Stain Kit For Haematology & Microbiology kiti ile boyandı, faz-kontrast mikroskopunda (OLYMPUS CX31) x100'lik büyütmede incelendi. Sperm morfolojik analizinde en az 200 sperm hücresinin Kruger kesin kriterlerine göre değerlendirmesi yapıldı¹⁴. Tespit edilen anormal ve normal morfolojiye sahip olan sperm oranları yüzde olarak ifade edildi ve kaydedildi (Şekil 1).



Şekil 1.

Farklı Abstinens Sürelerine Göre (1.1. 2-5 Günlük Abstinens Süresi, 1.2. 1 Saatlik Abstinens Süresi) Diff-Quick boyaması *: Baş Anomalisi, B: Boyun Anomalisi, K: Kuyruk Anomalisi

Vitalite Değerlendirilmesi

Yıkama öncesi lam üzerine alınan 10µl'lik semen drobunun üzerine 10 µl'lik eozin eklendi ve lamelle kapatıldı. Preparatlar faz-kontrast mikroskopta (OLYMPUS CX31) x20 büyütmede incelendi. Membran bütünlüğünü koruyan canlı hücreler soluk renkte, membran harabiyeti nedeniyle boyayı hücre içine alan ölü hücreler pembe renkte boyandı. Her preparatta canlılık durumuna göre 200 sperm sayımı gerçekleştirildi. Her numune için vitalite yüzde değeri hesaplandı ve kaydedildi.

Sperm Kromatin Bütünlüğü Değerlendirmesi

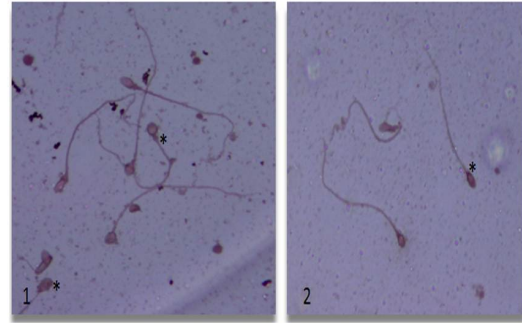
Yayma preparatlar oda sıcaklığında %90'lık metanol içinde 30 dakika fikse edilip, kurutuldu. Distile su ile yıkama sonrası preparatlar %4 asetik asit (pH 3.5) çözeltisi içinde %5 anilin mavisi ile 10 dakika boyandı. Yıkama sonrası preparatlar havada kurutulup

entellan ile kapatıldı. Faz kontrast mikroskopunda immersiyon yağı ile x100 büyütmede incelendi.

Pozitif (mavi) ve negatif (soluk mavi) boyanan hücreler sayıldı. Her preparatta 100 sperm hücresi sayıldı ve sayılan total sperm sayısına pozitif boyanan hücreler orantılandı ve yüzde değer olarak sonuçlar kaydedildi.

Sperm DNA Fragmentasyonu Değerlendirmesi

TUNEL metodu ile sperm DNA kırıklarını değerlendirmek amacıyla ApopTag Peroxidase InSitu Apoptosis Kit Detection kullanıldı. Boyama protokolü üreticinin talimatları dikkate alınarak gerçekleştirildi. Yıkama sonrası sperm DNA kırıklarının TUNEL tekniği ile analizinde DAB kromojen ile koyu kahverengi boyanan çekirdeğe sahip sperm DNA fragmentasyonu pozitif (TUNEL pozitif-T (+)) olarak, açık kahverengi boyanan çekirdeğe sahip sperm DNA normal DNA'ya sahip (TUNEL negatif-T (-)) sperm hücreleri olarak kaydedildi (Şekil 2). Her preparatta 100 sperm hücresi sayıldı, TUNEL pozitif ve TUNEL negatif sperm hücrelerinin yüzdeleri belirlendi.



Şekil 2.

Farklı Abstinens Sürelerine Göre (2.1. 2-5 Günlük Abstinens Süresi, 2.2. 1 Saatlik Abstinens Süresi) TUNEL boyaması *: Sperm DNA Hasarına Sahip Hücreler

Total Antioksidan Aktivitenin Değerlendirmesi

Total antioksidan aktivite, ELISA yöntemi ile Human Total Antioxidant Status Elisa KİT kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda ölçüldü. Biyotinlenmiş antikor ve Streptavidin-HRP arasındaki etkileşim sayesinde 450 nm'de renk oluşumunun total antioksidan konsantrasyona bağlı olarak optik yoğunluk (OD) değerleri belirlendi. Standart bir eğri kullanılarak total antioksidan kapasitesi hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Verinin istatistiksel analizi SPSS 23.0 istatistik paket programında yapıldı. Verinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler medyan, minimum, maksimum (nonparametrik dağılım) olarak belirtildi.

Normal dağılım gösteren veri için gruplar arası karşılaştırmada Paired Samples Test kullanılırken, normal dağılım göstermeyen veri için gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hasta karakteristik özellikleri ile implantasyon arasındaki ilişkiyi araştırmak için Sperman Korelasyon testi yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak belirlendi.

Bulgular

Ejakülât örneği alınan 36 hastanın yaş ortalaması $33,79 \pm 4,32$ yıl, vücut kitle indeksi (BMI) ortalaması $26,48 \pm 2,29 \text{ kg/m}^2$ olarak belirlendi. Hasta gruplarında kronik hastalıkları, cerrahi öyküleri ile sigara ve alkol kullanımları benzerdi.

Rutin Semen Parametreleri Sonuçları

2-5 günlük abstinens ve 1 saatlik abstinens sonrası ortalama semen volümü sırasıyla 3,5 ml (2.6-5.0) ve 2 ml (1.1-2.5) olarak bulundu. Semen volümünün abstinens süresindeki kısalma ile birlikte anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p=0.0001$) (Tablo I, Şekil 3.A). Yıkama öncesi total motil sperm sayısında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanırken ($p=0.0001$), konsantrasyon, motilite, morfoloji ve vitalitede gruplar arası anlamlı fark görülmedi (sırasıyla $p=0.161$, $p=0.851$ ve $p=0.807$) (Tablo I).

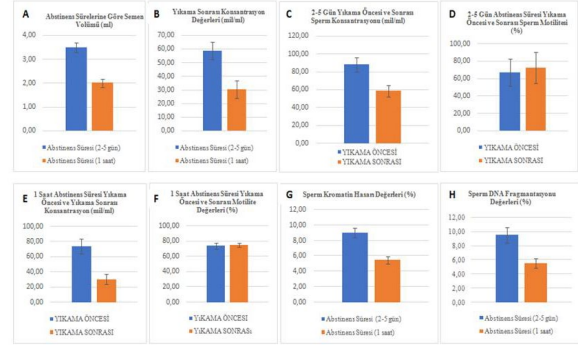
Tablo I. Farklı Abstinens Sürelerine Göre Yıkama Öncesi ve Yıkama Sonrası Semen Parametreleri

Değişkenler (Yıkama Öncesi / Yıkama Sonrası)	Kontrol Grubu (2-5 gün abstinens) (Median %25-%75 Percentiles)	Deney Grubu (1 saat abstinens) (Median %25-%75 Percentiles)	p değeri
Yıkama Öncesi Volüm (ml)	3,5 (2,6-5,0)	2 (1,1-2,5)	0,0001*
Yıkama Öncesi Konsantrasyon (mil/ml)	88 (49,2-133,7)	73,5 (32-121,7)	0,161
Yıkama Öncesi Motilite (%)	67 (53,2-80)	73,5 (49-83,3)	0,851
Yıkama Öncesi TPMS** (mil.)	191 (91,7-307,8)	98 (36,2-151,5)	0,0001*
Yıkama Öncesi Morfoloji (%)	2 (1-3)	2 (1-3)	0,244
Yıkama Öncesi Vitalite(%)	80 (72-85)	80 (72,2-85,7)	0,807
Yıkama Sonrası Konsantrasyon (mil/ml)	58,5 (49,2-133,7)	30,5 (35,2-84)	0,0001*
Yıkama Sonrası Motilite (%)	72,5 (60-87)	74,5 (64-83,7)	0,804

*Wilcoxon Signed Ranks Test $p < 0.05$

**TPMS: Total Progressif Motil Sperm Sayısı

Yıkama sonrası rutin sperm parametreleri değerlendirildiğinde; sperm konsantrasyonu uzun abstinens süresi lehine anlamlı farklılık gösterirken ($p=0.0001$), motilite yüzdesinde gruplar arasında fark saptanmadı ($p=0.804$) (Tablo I, Şekil 3.B).



Şekil 3.

(A) Farklı Abstinens Sürelerine Göre Yıkama öncesi Semen Volümündeki Değişiklik (B) Yıkama Sonrası Abstinens Sürelerine Bağlı Olarak Konsantrasyon Değerleri (C) 2-5 Günlük Abstinens Süresinin Yıkama Öncesi- Yıkama Sonrası Sperm Konsantrasyonları (D) 2-5 Günlük Abstinens Süresinin Yıkama Öncesi- Yıkama Sonrası Sperm Motiliteyi (E) 1 saat Abstinens Süresinin Yıkama Öncesi- Yıkama Sonrası Sperm Konsantrasyonları (F) 1 saat Abstinens Süresinin Yıkama Öncesi- Yıkama Sonrası Sperm Motilitesi (G) Farklı Cinsel Perhis Sürelerine Göre Sperm Kromatin Hasarı Yüzdeleri (H) Farklı Abstinens Sürelerine Göre Sperm DNA Fragmantasyonu Yüzdeleri

Kontrol grubu (2-5 günlük abstinens) yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm parametreleri sperm konsantrasyonu ve motilitesi açısından karşılaştırıldığında; sperm konsantrasyonu yıkama öncesi grup lehine anlamlı artış gösterirken, motilite yüzdesi yıkama sonrasında anlamlı oranda daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.002$) (Tablo II, Şekil 3.C-D). Çalışma grubunda da (1 saat abstinens) sperm konsantrasyonu yıkama öncesi değerler lehine anlamlı iken ($p=0.0001$), motilite yüzdesinin yıkama sonrasında anlamlı oranda daha yüksek olduğu görüldü. ($p=0.007$) (Tablo II, Şekil 3.E-F).

Sperm morfolojileri baş, boyun kuyruk anomalileri dikkate alınarak yapıldı (Şekil 1). Normal morfolojili sperm oranında kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.244$). Sperm viabilite analizinde her iki grupta da ortalama %80 viabilite saptandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0.807$).

Ardışık Ejakülasyonun Semen Parametrelerine Etkisi

Tablo II. Farklı Abstinens Sürelerine Göre Yıkama öncesi ve Yıkama Sonrası Konsantrasyon ve Motilite Değerleri

Değişkenler (Yıkama Öncesi / Yıkama Sonrası)	Kontrol Grubu 2-5 Günlük Abstinens Süresi		Deney Grubu 1 saatlik Abstinens Süresi	
	Median (Median %25- %75 Percentiles)	<i>p</i> değeri	Median (Median %25- %75 Percentiles)	<i>p</i> değeri
Yıkama Öncesi Konsantrasyon (mil/ml)	88 (49,2-133,7)	0,001*	73,5 (32,0-121,7)	0,0001*
Yıkama Sonrası Konsantrasyon (mil/ml)	58,5(35,2-84)		30,5 (17,2-77,7)	
Yıkama Öncesi Motilite (%)	67 (53,2-80)	0,002**	73,5 (49-83,3)	0,007*
Yıkama Sonrası Motilite (%)	72,5 (60-87)		74,5 (64-83,7)	

*Wilcoxon Signed Ranks Test $p<0.05$

**Paired Samples Test $p<0.05$

Sperm Kromatin Bütünlüğü, DNA Fragmentasyonu ve Antioksidan Aktivite Analizi Sonuçları

Kromatin bütünlüğünü değerlendirme amacıyla anilin mavisi ile boyanan yayma preparatlarda, kontrol ve deney gruplarında kromatin kondansasyon anomalisi sırasıyla %9 (7-11,7) ve %5,5 (4-8,5) oranında saptandı. Kısa abstinens süresinin kromatin hasarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı görüldü ($p=0.0001$) (Tablo III, Şekil 3.G).

Kontrol ve deney gruplarında DNA fragmentasyon yüzdesi sırasıyla %9,5 (5,5-12,2) ve %5,5 (4,2-7,7) oranında saptandı. Kısa abstinens süresinin sperm DNA fragmentasyon oranını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı görüldü ($p=0.002$) (Tablo III, Şekil 2, Şekil 3.H.).

Tablo III. Sperm Kromatin Hasarı, DNA Fragmentasyon Yüzdesi ve Total Antioksidan Kapasite Değerleri

Değişkenler	Abstinens Süresi (2-5 gün) (Median %25- %75 Percentiles)	Abstinens Süresi (1 saat) (Median %25- %75 Percentiles)	<i>p</i> değeri
Anilin Blue (%)	9 (7-11,7)	5,5 (4-8,5)	0,0001*
TUNEL (%)	9,5 (5,5-12,2)	5,5 (4,2-7,7)	0,002**
TAC (IU/ml)	3,1 (1,0-4,1)	2,9 (1,1-4,5)	0,984

*Wilcoxon Signed Ranks Test $p<0.05$

**Paired Samples Test $p<0.05$

TAC: Total Antioksidan Kapasite

Yıkama öncesi korelasyon analizlerine bakıldığında, her iki abstinens süresine sahip grupta da semen volümü artışına sperm konsantrasyon artışının eşlik

ettiği, aralarında pozitif korelasyon olduğu tespit edildi ($p=0,0001$). Yıkama öncesi sperm DNA fragmentasyonu ve sperm morfolojisi arasında ise korelasyon saptanmadı ($p=0,554$) (Tablo IV)

Tablo IV. Farklı Abstinens Süresine Göre Korelasyon Analizi Sonuçları

Değişkenler (Yıkama Öncesi / Yıkama Sonrası)	Abstinens Süresi (2-5 gün) <i>r</i> değeri	Abstinens Süresi (2-5 gün) <i>p</i> değeri	Abstinens Süresi (1 saat) <i>r</i> değeri	Abstinens Süresi (1 saat) <i>p</i> değeri
Yıkama Öncesi Volüm / Konsantrasyon	0,679	0,0001*	0,619	0,0001*
Yıkama Sonrası Sperm DNA Fragmentasyonu / Sperm Morfolojisi	0,190	0,554	-----	-----
Yıkama Sonrası Konsantrasyon/ Motilite	0,220	0,197	0,448	0,006**

*Pearson Test $p<0.05$

**Spearman Test $p<0.05$

Yıkama sonrası korelasyon analizlerinde; konsantrasyon ve motilite değerleri arasında 2-5 günlük cinsel perhiz süresinde korelasyon görülmedi ($p=0,197$). 1 saatlik cinsel perhiz süresinde ise, konsantrasyon azalışına motilite artışının eşlik ettiği ve aralarında anlamlı negatif korelasyon olduğu tespit edildi ($p=0,006$) (Tablo IV).

Tartışma ve Sonuç

Bu prospektif çalışmada, ardışık ejakülasyonla elde edilen semen örneklerinde farklı abstinens sürelerinin rutin sperm parametreleri, sperm kromatin bütünlüğü, DNA hasarı ve antioksidan aktiviteye etkisi araştırılmıştır. Kısa abstinens süresi sperm konsantrasyonunu ve total motil sperm sayısını azaltmış olmakla birlikte, antioksidan aktiviteyi değiştirmemiş, ardışık ejakülasyon sperm kromatin hasarı ve DNA bütünlüğünü iyileştirici etki göstermiştir.

Abstinens süresine bağlı olarak değişen sperm parametrelerinin başında semen volümü gelmektedir. Literatürde abstinens süresindeki kısılmanın semen volümünü azalttığını raporlayan retrospektif ve prospektif çalışmalar mevcuttur¹⁵⁻¹⁷. Bu çalışmada da literatürü destekler nitelikte, semen hacmi abstinens süresi kısaldıkça anlamlı ölçüde azalmıştır. Kısa abstinens süresi nedeniyle semen volümünde oluşan azalmanın, seminal veziküller ve prostat gibi seminal sıvının kaynağı olan yardımcı genital bezlerin yeterli

salgı yapamamasına bağlı olduğu bilinmektedir. Semen kalitesini belirleyen faktörler arasında olan sperm konsantrasyonu fertilitate potansiyeli için prognostik bir faktördür. Literatürde abstinens süresi ile sperm konsantrasyonunun doğrusal bir ilişki içinde olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur¹⁸⁻²⁰. Buna karşılık iki çalışmada, uzun abstinens süresi sonrası sperm konsantrasyonunda hafif bir artış tespit edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı raporlanmıştır²¹⁻²². Bu çalışmada semen volümünün literatürle uyumlu şekilde azaldığı görülmüş, fakat mililitre bazında sperm konsantrasyonu olumsuz yönde etkilenmemiştir.

Abstinens süresine göre değişebilecek bir diğer parametre sperm motilitesidir. Çeşitli çalışmalar, abstinens süresi ile sperm motilitesi arasında ters korelasyon olduğunu göstermektedir²⁰⁻²³. Abstinens süresi ile motilite arasında herhangi bir korelasyon olmadığını raporlayan çalışmalarda mevcuttur²⁴⁻²⁵. Bu çalışmada abstinens süresindeki uzamanın sperm motilitesine olumlu ya da olumsuz etkisi görülmemiştir. Motilite oranlarının değişmemesi, ejakülasyonda epididimiste depolanan spermin tamamının ejakülatla birlikte atılmaması ve ardışık ejakülasyon sonrası epididimiste kalan spermin elde edilmesinin bir sonucu olarak açıklanabilir.

Semen volümündeki azalma direkt olarak total motil sperm konsantrasyonunda anlamlı oranda azalmaya neden olmaktadır. Çalışmada kısa abstinens süresinde ejakülatla total motil sperm konsantrasyonu azalmış, fakat sperm konsantrasyonu, motilitesi, viabilitesi ve morfolojisinde olumlu ya da olumsuz bir etki göstermemiş, semen volümü ile direkt ilişkili olan total progressif motil sperm sayısında azalma görülmüştür. Total motil sperm sayısının klinik başarıya etkisi özellikle intrauterin inseminasyon ve konvansiyonel in vitro fertilizasyonda ön plandadır, fertilizasyon aşamasında tek motil spermin kullanıldığı intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulamalarında fertilizasyon başarısına olumsuz etkisi yoktur. Fakat çalışmamız kapsamında değerlendirilen spermin kromatin bütünlüğü, DNA fragmantasyonu ve antioksidan aktivitesindeki oransal iyileşmeler ICSI uygulamalarında oositi fertilize etme potansiyeli yüksek spermin seçilmesi şansını arttırmaktadır.

Rutin semen parametrelerinden sperm morfolojisinin abstinens süresi ile korelasyonunu değerlendiren çalışmalarda anlamlı bir fark oluşturmadığı bildirilmiştir¹⁰⁻²⁶. Dupesh ve ark. yaptığı çalışmada farklı abstinens gruplarında değerlendirme yapıldığında, gruplar arasında değerlerin ortalama olarak birbirlerine yakın olduğu, en yüksek normal morfolojide sperm yüzdesinin 8-15 günlük perhiz sonrasında elde edildiği belirtilmiş, ancak istatistiksel anlamlılık göstermediği rapor edilmiştir²⁷. Abstinens süresinin sperm canlılığını ve ilişkili olarak

fertilizasyon potansiyelini etkilemediği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir²⁸. Bu çalışmada da literatürle uyumlu olarak sperm morfolojisi ve viabilitesinde abstinens süresine bağlı anlamlı bir farklılık saptanmadı. Örneklem grubunun geniş olduğu (2458 ejakülat örneği) bir çalışmada abstinens süresine göre sperm parametrelerinden volüm, konsantrasyon ve morfolojinin abstinens süresi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisinin olduğu belirtilmiştir. Ancak sperm morfolojisi ve abstinens süresi arasında korelasyon tespit edilmemiştir²⁹. Bu çalışma küçük örneklem grubunda gerçekleştirilmekle birlikte, korelasyon analizleri değerlendirildiğinde literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

İnseminasyon için kullanılacak spermin kalitesini tercih edilen sperm hazırlama yöntemleri değiştirmektedir. Semen yıkama protokollerinde amaç konsantrasyon, motilite, morfoloji ve viabilite açısından kaliteli spermin eldesini sağlamaktır. Yıkama sonrası sperm konsantrasyonu ve motilitesi hasta semen parametrelerine uygun yıkama metodunun seçildiğini gösteren en önemli iki parametredir. Swim-up yöntemi sperm konsantrasyonunu azaltan bir yıkama metodu olmakla birlikte, sperm total progressif motil sperm sayısı, morfolojisi ve viabilitesi açısından en avantajlı yöntemdir³⁰. Literatürde de desteklenen ve kabul gören bir yaklaşım olarak, laboratuvarımızda normozoospermik olgularda inseminasyon için sperm hazırlığında swim-up yöntemi tercih edilmektedir. Bu nedenle normozoospermik olguları kapsayan bu çalışmada yıkama öncesi ve swim-up yıkaması sonrası sperm parametreleri iki farklı abstinens grubunda karşılaştırıldı. Literatür bilgisi ile uyumlu şekilde hem 2-5 günlük abstinens süresi grubu hem de 1 saatlik abstinens süresi grubunda, beklenildiği şekilde konsantrasyonun anlamlı olarak azaldığı, swim-up sonrası motilitenin anlamlı olarak arttığı tespit edildi.

Abstinens süresinin sperm kromatin bütünlüğü ve sperm DNA fragmantasyonu ile arasında korelasyon olabileceğine dair görüşler mevcuttur. Abstinens süresi arttıkça, epididimal depolanma sürecinde ROS'un (mitokondriyal hasar/lökosit sayısı) arttığı ve böylelikle sperm DNA hasarının ve DNA fragmantasyon yüzdesinin anlamlı olarak arttığı belirtilmiştir²⁹⁻³¹. Benzer çalışmalarda daha kısa abstinens süresinin, üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında sperm DNA fragmantasyonu insidansında azalmaya ve gebelik oranlarında artışa neden olduğu raporlanmıştır⁹⁻¹⁶. Bu çalışmada da, 1 saatlik cinsel perhiz süresinin 2-5 günlük cinsel perhiz süresine göre DNA fragmantasyon yüzdesini anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir.

Kısa abstinens süresinin, I. ve II. mayozunu tamamlamış spermin epididimiste depolanması sırasında granülositler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksik etkilerine daha az

Ardışık Ejakülasyonun Semen Parametrelerine Etkisi

maruz kalmanın sonucunda ölü hücre konsantrasyonunda azalma ve daha genç bir sperm popülasyonu ile sonuçlandığı raporlanmıştır³². Ardışık ejakülasyonlarda sürenin kısa olması spermlerin epididimisten geçişini hızlandırır ve sonuç olarak sperm ROS'un zararlı etkilerine daha az maruz kalır. ROS tarafından oluşturulan oksidatif strese maruziyetin azalması sperm kromatin bütünlüğünde bir iyileşmeye yol açar³³. Sperm kromatin hasarının değerlendirildiği bir çalışmada, abstinens sürelerine göre 2-5 güne karşı, 1 saat sonra elde edilen ejakülatlar karşılaştırılmış ve 2-5 gün abstinens sonrası alınan ejakülat örneklerinde normal sperm kromatin yüzdesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Kısa cinsel perhiz süresi göz önüne alındığında, olgun kromatin yüzdesinde 1 saatlik abstinens süresi grubunda artış olduğu vurgulanmıştır²⁶. Bu çalışmanın sonuçları da bu veriyi desteklemektedir.

Oksidatif stresin sperm hasarının en yaygın nedenlerinden biri olduğu ve fertilizasyon kapasitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Oksidatif stres spermin lipid ve protein yapılarına, DNA'sına zarar vermektedir³⁴⁻³⁵. Sperm hücrelerinin bu tür hasarı onarmak için kendi savunma mekanizmaları vardır ve bu mekanizmalar başarısız olduğunda üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) ile toplam antioksidan kapasite (TAC) arasında bir dengesizlik oluşur³⁴. ROS üretimi ve TAC arasındaki dengesizlik sonucunda oluşan yüksek seviyelerdeki oksidatif stres, sonuçta sperm çekirdek DNA'sına zarar verir; erkek germ hücre hattındaki DNA hasarının ağırlıklı olarak oksidatif stresle indüklendiği ve bu hasarın bu tür strese karşı spermin savunmasızlığını yansıttığı düşünülmektedir³⁶. Yapılan çalışmalarda, rutinde kabul gören 4 günlük cinsel perhiz ile karşılaştırıldığında, kısa abstinens (1 gün) süresi ile total antioksidan kapasite arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir. Abstinens süresinin, epididim veya diğer yardımcı genital bezlerinin ROS ortamı üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Abstinens süresini kısaltarak epididim veya vas deferenste yaşlı sperm nüfusu azaltılabilir. Böylelikle ROS oluşumuna sebep olan ölü ve anomalili sperm kaynağının önüne geçilerek, TAC'ın koruyucu etkisine ihtiyaç azaltılır³⁷. Çalışmamızda da 2-5 günlük cinsel perhiz süresi 1 saatlik cinsel perhiz süresi ile karşılaştırıldığında total antioksidan kapasitenin 1 saatlik grupta daha düşük olduğu, ancak bu verinin gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür. İstatistiksel anlamlılığın değerlendirilmesi açısından örneklem sayısının az olması çalışmanın limitasyonunu oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada abstinens süresindeki kısılmanın rutin semen parametrelerinde, sperm kromatin kondensasyonu ve DNA bütünlüğünün korunmasında, antioksidan kapasitede iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir. Sperm konsantrasyonunu

ve bununla bağlantılı olarak total progressif motil sperm sayısını azaltmakla birlikte, normozoospermik olgularda tercih edilen üremeye yardımcı tedavi yaklaşımına göre inseminasyonda kromatin ve DNA bütünlüğü açısından daha kaliteli sperm kullanılmasına imkan sağlayacaktır. Ardışık ejakülasyonun üremeye yardımcı tedavi uygulamalarında laboratuvar sonuçlarını ve klinik başarıyı iyileştirici etkisine yönelik daha fazla örneklem içeren, kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
2011-KAEK-26
Onay Tarihi: 14 Ekim 2020
Karar No: 2020-18/18

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: B.A., C.Ç., S.I.; Veri toplama ve işleme: B.A., G.U., I.K., K.A., C.Ç., G.K., S.I.; Analiz ve verilerin yorumlanması: B.A., G.U., I.K., K.A., C.Ç., G.K., S.I.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: B.A., S.I.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Çalışma için destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Men's Health* 2014;32:1-17.
2. Barratt CL. Semen analysis is the corner stone of investigation formale infertility. *Practitioner* 2007;251:8-10, 12, 5-7.
3. Francavilla F, Barbonetti A, Necozone S et al. Within-subject variation of seminal parameters in men within fertile marriages. *Int J Androl* 2007;30:174-181.
4. Mortimer D, Templeton AA, Lenton EA, Coleman RA. Influence of abstinence and ejaculation to analysis delay on semen analysis parameters of suspected infertile men. *Arch Androl* 1982;8:251-256.
5. Dupesh S, Pandiyan N, Pandiyan R, Kartheeswaran J, Prakash B. Ejaculatory abstinence in semen analysis: does it make any sense? 2020;15;14:2633494120906882.
6. Bahadur G, Almossawi O, Zaid Z et al. Semen characteristics in consecutive ejaculates with short abstinence in subfertile males. *Reprod Biomed Online* 2015;32:323-328.
7. Agarwal A, Varghese AC, Sharma RK. Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity. *Methods Mol Biol* 2009;590:377-402.
8. Donatella P, Giulia P, Francesco P et al. Cytological and molecular aspects of the ageing sperm. *Hum Reprod* 2019;1;34(2):218-227.
9. Gosalvez J, Gonzalez-Martinez M, Lopez-Fernandez C, Fernandez J L, Sanchez-Martin P. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 2011;96:1083-1086.
10. Richthoff J, Spano M, Giwerzman YL et al. The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Hum Reprod* 2002;17:3162-3169.

11. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996;48(6):835–850. [https://doi:10.1016/S0090-4295\(96\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(96)00313-5).
12. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP et al. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril* 2006;86(4):878–885.
13. WHO. Laboratory Manual For the Examination and Processing of Human Semen 5 th ed. ISBN 2010;978 92 4 1547789.
14. Høst E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F. Sperm morphology and IVF: embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999;78;526;9.
15. Pellestor F, Girardet A, Andreo B. Effect of long abstinence periods on human sperm quality. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1993;39:278–82.
16. Sanchez-Martin P, Sanchez-Martin F, Gonzalez-Martinez M, Gosalvez J. Increased pregnancy after reduced male abstinence. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59:256–60 <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.790919>.
17. Sunanda P, Panda B, Dash C, Padhy RN, Routray P. Effect of age and abstinence on semen quality: A retrospective study in a teaching hospital. *Asian Pac J Reprod*.2014;3:134–41.
18. Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. (2004). Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril* 2004;82:358–66. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.01.039>.
19. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345: 1388-93. <https://doi.org/10.1056/NEJM oa003005>.
20. Marshburn PB, Alanis M, Matthews ML et al. A short period of ejaculatory abstinence before intrauterine insemination is associated with higher pregnancy rates. *Fertil Steril* 2009;93: 286–8.
21. Oldereid NB, Gordeladze JO, Kirkhus B, Purvis K. Human sperm characteristics during frequent ejaculation. *J Reprod Fertil* 1984;71:135–40.
22. Padova G, Tita P, Briguglia G, Giuffrida D. Influence of abstinence length on ejaculate characteristics. *Acta Eur Fertil* 1988;19:29–31.
23. Lehavi O, Botchan A, Paz G et al. Twenty-four hours abstinence and the quality of sperm parameters. *Andrologia* 2014;46:692–697.
24. De Jonge C, La Fromboise M, Bosmans E et al. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril*.2004;82:57–65. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.03.014>.
25. Mayorga-Torres JM, Agarwal A, Roychoudhury S, Cadavid A, Cardona-Maya WD. Can a Short Term of Repeated Ejaculations Affect Seminal Parameters? *J Reprod Infertil* 2016;17:177–83.
26. Scarselli F, Cursio E, Muzzi S et al. How 1 h of abstinence improves sperm quality and increases embryo euploidy rate after PGT-A: a study on 106 sibling biopsied blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 2019;36:1591-1597.
27. Dupesh S, Pandiyan N, Pandiyan R, Kartheeswaran J, Prakash B. Ejaculatory abstinence in semen analysis: does it make any sense? *Ther Adv Reprod Health* 2020.15;14: 2633494120906882.
28. Shi X, Shan Chan CP, Waters T et al. Lifestyle and demographic factors associated with human semen quality and sperm function. *Syst Biol Reprod Med* 2018;64;358;367.
29. Comar AV, Petersen G C, Mauri A L et al. Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. *JBRA Assist Reprod* 2017;21;306;312.
30. Ricci G, Peticarari S, Boscolo R et al. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril* 2009;91:632–8.
31. Agarwal A, Gupta S, Plessis SD et al. Abstinence Time and Its Impact on Basic and Advanced Semen Parameters. *Urology* 2016;94:102-10.
32. Du Plessis SS, McAllister DA, Luu A et al. Effects of H(2)O(2) exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. *Andrologia*.2010;42(3):206–210.
33. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*.2000;21(1):33–44.
34. Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagzloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:1–10.
35. Gavrilouk D, Aitken R. Damage to sperm DNA mediated by reactive oxygen species: its impact on human reproduction and the health trajectory of offspring. *Adv Exp Med Biol*.2015;868:23–47.
36. Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 2017;84;1039;1052.
37. Marshburn PB, Giddings A, Causby S et al. Influence of ejaculatory abstinence on seminal total antioxidant capacity and sperm membrane lipid peroxidation. *Fertil Steril* 2014;102;705;10.