

OLİGOSPERMİK HASTALARDA SPERM KALİTESİNİN İNVİTRO OLARAK ARTIRILMASI

INVITRO ENHANCEMENT OF SPERM QUALITY IN OLIGOZOOSPERMIC PATIENT

DAYANÇ, M., GÖKALP, A., ÖZGÖK, Y., YILMAZ, Y., KARADEMİR, K., HARMANKAYA, Ç.

GATA Üroloji ABD

ÖZET

Mayıs 1988 ile Ocak 1992 tarihleri arasında GATA Üroloji A.B.D. Polikliniğine infertilite nedeni ile başvuran ve sperm sayısı 20 milyon/ml'nin altında bulunan 80 olgunun semeni alınarak, sperm yıkama teknikleri ile sperm sayısındaki ve yüzdesindeki değişiklikleri gözlemek amacıyla, Ham F-10 vasatı ile yıkandı.

Olguların yaşları 21-47 (ortalama 29.24) arasında idi.

Yıkama öncesi sperm sayısı 7-20 milyon /ml (ortalama 15.73 milyon/ml) iken yıkama sonrası 10-30 milyon/ml (Ortalama 21.7 milyon /ml) olarak bulundu.

Motilite, yıkama öncesi % 20-70 (ortalama 42.57) iken yıkama sonrası % 25-90 (Ortalama 55.83) bulundu.

Spermatozoa sayısında % 37.14 artış, motilitede % 13.88 lik bir artış sağlanmıştır ki bu da literatür ile uyumlu bulundu.

Sonuç olarak sperm yıkama tekniği ile kazanılan artışın yeterli olduğuna ve kullandığımız teknikle yıkanmış spermin intrauterin inseminasyon veya invitro fertilizasyon için kullanılabilmesine karar verdik.

SUMMARY

Sperm specimen of 80 patients, whose sperm counts were lower than 20 mil/ml and who were being treated for infertility in GATA Urology Department, were obtained from May 1988 to January 1992. Specimen were washed by Ham F-10 medium to observe differences in sperm counts and motility.

Ages of the patients were 21-47 (mean 29.24)

While the sperm counts were 7-20 mil/ml (mean 13.73 mil/ml) before washing, the counts were 10-30 mil/ml (mean 21.7 mil/ml) following washing procedure. The motility rates were 20-70 % (mean 42.57 %, and 25-90 % (mean 55.83 %) before and after washing respectively.

The increase in sperm count was 37.14 %, and in motility was 13.88 %. These results are similar to other studies in literature.

As a result, we concluded that the increase obtained by sperm washing was enough to be used for intrauterine insemination or invitro fertilization.

GİRİŞ

Çocuk sahibi olamama düşüncesi evlilik öncesi bireylerin bir çoğunda mevcuttur. Evli çiftlerin yaklaşık % 10'unda bulunan infertilite probleminin yarısının erkekten kaynaklanan faktörlere bağlı olduğu düşünülürse, yaklaşık 10 milyon evli çift bulunan Türkiye'de 500.000 erkeğin infertilite problemi ile karşı karşıya olabileceği sonucuna varılır.

İnfertil erkeklerin büyük kısmında sözkonusu olan oligospermi bir hastalık değil semptomdur. Dünya Sağlık örgütünün sperm sayısının 20 milyon/ml altında olmasını oligospermi olarak kabul etmesinin yanısıra MacLeod ve Zukerman'ın yaptıkları çalışmalarda fertil erkeklerin sperm sayılarının 20 milyon /ml'nin altında, hatta 10 milyon /ml'nin altında olabileceği belirtilmektedir (1,2).

Fertilizasyonu tek spermin sağladığı gözönüne alındığında canlı sperm olan tüm

erkekler fertil kabul edilebilir. Sadece sperm ovuma ulaşmasının yeterli olabileceği fikri invitro fertilizasyon ve artifisyel inseminasyondaki gelişmeleri doğurmuştur (3).

Spermilerin fertilizasyon için hazırlanmasında yıkama, yüzdürme, çöktürme, kafeinle muamele edilmesi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (4).

Spermilerin yıkanması yeni bir yöntem olmayıp, 1970'li yıllarda spermeleri daha küçük bir hacimde konsantre etmek amacı güdülmüştür.

Günümüzde ise inseminasyon öncesi daha kaliteli sperm örnekleri elde etmek amaçlanmaktadır. Sperm kalitesini artırmak üzere sıklıkla albumin ve perkol gradientleri kullanılmaktadır (5). Bu yöntem için en uygun adaylar sperm-mukus ilişkisi zayıf olan çiftlerdir. Diğer uygun adaylar varikosel gibi anatomik bozukluğu olanlar ile idiopatik oligoastenospermililerdir (4).

MATERYAL VE METOD

Mayıs 1988 /Ocak 1992 tarihleri arasında infertilite nedeni ile polikliniğimize başvuran 80 oligospermik hastada sperm yıkama işlemi ile sperm kalitesindeki değişiklikleri araştırdık.

Hastaların yaşları 21-47 (ortalama 29.2375) arasında değişiyordu. Semen örnekleri 4 günlük cinsel perhizden sonra, hastanede steril tüplere alınarak incelendi. Sperm sayı ve motiliteleri tarafımızdan tespit edildikten sonra aşağıdaki şekilde sperm yıkama tekniği uygulandı;

Toz halde alınan Ham F-10 vasatı serum fizyolojik ile sulandırılıp kalsiyum laktat, sodyum bikarbonat, potasyum bikarbonat, penisilin ve streptomisin ile zenginleştirilerek, Lapata ve arkadaşlarının protokolüne uyuldu. Vasatın osmolalitesi 290 mOsm/kg'a getirilip bir Pasteur pipeti ile içinden 10 dakika süreyle % 5 oksijen, % 5 karbondioksit, % 90 nötrojenden oluşan gaz karışımı geçirildi. Sonuçta pH 7.35 olarak ayarlandı ve medyum 0.22 mikronluk milipor filtreden süzülerek sterilize edilip donduruldu. kullanacağımız zaman Ham-10 medyu-

mu 37 C'ye ısıtılıp sözedilen gazdan geçirildi (6).

Bir miktar semen örneği sperm sayısı ve motilitenin belirlenmesi için kullanıldıktan sonra geri kalan örnek, hacminin iki-üç katı kadar medyum ile karıştırıldı. 900 devir /dk. da 5 dk. santrifüje edildi. Üstteki kısım atılıp dipteki sediment 2 ml. medyumla yeniden karıştırılarak santrifüje edildi. Bunun da sedimenti alınıp, içine 1 ml. vasat eklendi. Sperm sayısı ve motilite yeniden belirlenerek örnek son kez satrifüje edildi. Üstteki 0.2 ml.'lik kısım ile alttaki sediment alınıp, orta kısım atıldıktan sonra, bu iki kısım yeniden karıştırıldı. Yıkanmış sperm nakle hazır hale geldiler.

İlk motilite oranı düşüğe veya semen örneğinde fazla atık madde varsa bir 'swim-up' tekniği kullanıldı. İkinci yıkamadan hemen sonra semen 1 ml medyumla karıştırılıp tekrar gaz karışımından geçirilerek 37 C'de 40 dk süre ile enkübe edildi. Sedimentin üzerinde kalan kısımda bulunan hareketli sperm toplandı, santrifüje edildi, 0.2 ml medyumla yeniden karıştırılarak işlem tamamlandı.

BULGULAR

Olgulara sperm yıkama tekniği uygulamadan önce ortalama sperm sayısı 15.73 milyon/ml (7-20 milyon/ml) iken, yıkama sonrası ortalama 21.7 milyon /ml (10-30 milyon/ml) olarak bulundu. İşlem sonrası sperm sayısında ortalama % 37 (% 11-%84) lik bir artış elde edildi.

Yıkama işleminden sonra % 55.83 (% 25-% 90) olarak bulundu. Bu da yıkama ile motilitede ortalama % 13.88 (% 3 - % 30)lik bir artış elde edildiğini gösterdi.

Sonuçların istatistiksel anlamlılığı t-student testi ile araştırıldı. Sperm yıkama işlemi öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında sperm sayısı için t-değeri 18.7996 (p<0.05) sperm motilitesi için t-değeri 14.0594 (p<0.05) olarak hesaplandı. Her iki parametredeki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Tablo 1. 80 olgunun işlem öncesi ve sonrası karşılaştırılması

Hasta sayısı	Yıkama öncesi	Yıkama sonrası	% değişiklik	t değeri	p	
Sperm sayısı	80	15.73x10 ⁶	21.70x10 ⁶	37.14	18.7996	<0.05
Sperm Motili.	80	42.57	55.83	13.88	14.0594	<0.05

TARTIŞMA VE SONUÇ

Pisagor, Aristo, Sokrates, Hipokrat gibi eski Yunan bilginlerinin ve eski Çin tıbbının infertilitede erkeğe ait faktörlerin de olabildiğini farketmelerine rağmen, bu sorunda erkeği temsil eden spermatozoidin ilk olarak 1850 'de Jansen tarafından görülmesi etyolojiyi saptamak açısından çığır açmıştır. Bunu izleyen gelişmeler olan spermin mikroskopik, kimyasal analizlerinin yapılması, endokrinolojideki ilerlemeler infertilitenin bir çok sebebinin ortaya çıkarılmasına yardımcı olmuşlardır. Sebepler ortaya konduktan sonra uygun tedaviyi arama aşamasına gelinmiş, bu spektrum günümüzde artifisiyel inseminasyon ve invitro fertilizasyona kadar uzamıştır.

Başlangıçta sadece kadına bağlı hastalık durumlarında önerilen intrauterin inseminasyon şimdilerde oligospermik olgularda da iyi sonuçlar vermektedir (7,8).

Semen yıkama teknikleri ile izole edilen motil sperm topluluğu, semendeki total sperm sayısının % 10-20'si kadardır. Bu sırada debris ve lökositlerin ayrılmış olması avantajdır. Yıkama tekniği kullanıldıktan sonra 500.000-1.000.000 arasında iyi hareketli sperm elde edilmesi tekniğin başarılı olduğunu gösterir (9). Elde edilmesi gereken sperm hacmi 0.5 ml'dir ki çalışmamızda bu miktar her seferinde sağlanmıştır.

Glass ve Ericson'un çalışmalarında Tyrode solusyonunu kullanarak swim-up (yüzdürme) uygulanmış ve sperm sayısında % 28 motilitede % 30 artış sağlanabilmiştir (10).

Çalışmamızda tüm olgularda semen

santrifuj edildikten sonra sadece motilitesi düşük olanlara swim-up tekniği uygulanmış ve sayıda % 37, motilitede % 13.88 lik artış literatürle uyumlu bulunmuştur.

Semeni sulandırmak, spermlerin aktivite kaybını önlemek ve semen içindeki artuk maddeleri uzaklaştırmak için albumin ve perkol gradientleri sık olarak kullanılmaktadır. Vermeiden ve arkadaşları 1987'de yaptıkları çalışmada hem albumin hem perkol kullanılarak swim-up yapılmış ve aralarındaki farkları araştırılmıştır (11). Cell Soft CASA kompüterize sistemi ile sperm sayısı ve motilitesindeki değişiklik her iki gradient için de % 33 bulunmuştur. Biz de çalışmamızda, temininin kolay olması ve aralarında fark olmaması nedeniyle bir albumin gradienti olan Ham F-10 vasatını kullandık. Sağlanan artış Vermeiden ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu bulundu.

Ejakulatin ilk kısmında motilite ve sperm sayısı yüksek, prostaglandin miktarı düşüktür. Farris ve Murphy 98 olguda motil sperm açısından semenin tümünü ve ilk kısmını incelemişler, 89 olguda ilk kısımda çıkan motil sperm sayısının tüm semenden 7.4/1 oranında fazla olduğunu, sadece 9 olguda ikinci kısmının 4.5/1 oranında yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (12).

Prostaglandinlerin uterus içinde kramplara sebep olduğu ve ejakulatin ilk kısmında fazla miktarda motil sperm ile birlikte düşük seviyede prostaglandin bulunmasından ötürü bir çok çalışmacı intrauterin inseminasyonda ejakulatin ilk kısmını kullanmışlardır (13,14,15).

Bizim çalışmamızın amacında hazırlanan spermin uterus içinde konulması olmadığından semeni tümüyle incelemeye aldık.

İnvitro fertilizasyon uygulanacak olguların, başarı açısından fraksiyonlarının sayı ve motilite yönünden araştırılması gerekmektedir.

Literatür araştırılması yapıldığında Barwin % 6, Glass ve Ericson % 5, Mastroianni % 17 oranında intrauterin inseminasyondan sonra ciddi uterus krampları gözlenmiş ve bunu fazla miktarda yıkanmamış sperm insemine edilmesine bağlamışlardır (10,16,17). Bu bilgilerden hareketle, çalışmamızda; sperm yıkanarak sonuçta 0.5 cc hale getirildi.

Başka bir boyuttan bakıldığında; uterus içine konacak semenin teorik olarak ta olsa enfeksiyon oluşturma riski bilindiğinden çalışmamızda hazırlanan kısma streptomisin ve penisilin eklenmiştir (6,10,16).

En iyi sonucu elde edebilmek için uyulması gereken kuralları özetle sıralayacak olursak;

1- Çiftler ayrı ayrı değerlendirilmeli; kadın jinekolog, erkek ürolog tarafından takip edilmelidir. Sperm yıkama tekniği ürolog tarafından seçilmeli ve yapılmalıdır.

2- Spermioqram mümkün ise kompüterize sistem ile yapılmalı, değil ise konuyu iyi bilen bir kişi; tercihen ürolog tarafından yapılmalıdır.

3- Semen en az iki fraksiyona ayrılmalı, sayı ve motilite yönünden incelenerek hangi kısmının kullanılacağı saptanmalıdır.

4- Tek vasat kullanmak yerine, önceden bir kaç vasat ile semen yıkanmalı ve hangisinin daha etkili ise o vasat kullanılmadık.

5- Sperm sayısında mı, motilitesinde mi sorun olduğu bilinerek buna göre yıkama tekniği kullanılmalıdır. Hastanın sperm sayısı yetersiz fakat motilite iyi ise sperm yıkama tekniklerinden çöktürme uygulamalı, sperm sayısı iyi motilite düşük ise yüzdürme yöntemi kullanılmalıdır. Şayet hem sperm sayısı hem de motilite düşük ise iki tekniği birden uygulayarak daha kaliteli sperm elde edilebilir.

6- İşlemler tamamıyla steril koşullarda gerçekleşmelidir.

7- Sperm insemine edildiği ve inseminasyonun gerçekleştirildiği merkez aynı olmalı ve 24 saat hizmete hazır halde tutulmalıdır.

8- Zamanla oluşacak motilite kaybını önlemek açısından, erkeğin spermini en kısa sürede merkeze getirmesi sağlanmalı yada en

iyisi sperm merkezde alınmalıdır.

Intrauterin inseminasyon başarı oranları merkezlere göre farklılıklar arz etmektedir. Farklılıkların temelinde yukarıda sözü edilen kurallara uyulma derecesi yatmaktadır. Uygun hasta seçimi ve uygun teknik kullanılması ile gebelik sağlayabilecek yetenekte sperm elde edilebileceği bizim çalışmamızda d gösterilmiştir.

Ürologlar olarak bizi ilgilendiren bölüm sperm insemine hazırlanma haline getirilmesi olduğundan çalışmamızın amacına ulaştığı söylenebilir. İnfertilite tedavisindeki arayışların ortaya çıkardığı bu alternatifin gün geçtikçe daha başarılı sonuçlar vereceği, ekip çalışması ile yüzdürücü sonuçların artacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- 1- MacLeod, J., Gold, R.Z.: The male factor in fertility and infertility and in 1000 case of infertile marriage. J. Urol 66: 436, 1951.
- 2- Zukerman, Z., Rodriguez Rigau, L.J., Smith, K.D., Steinberger, E.: Frequency distribution of sperm counts in fertile and infertile males Fertil Steril 28: 1310, 1977.
- 3- Eckerling, B.: Sterility due to oligospermia and hypokinesis of the sperm. Fertil Steril 11: 475, 1960.
- 4- Ronald, L.: Modern concepts of male infertility Urol. Clin. North Am. 13: 455-65, 1986.
- 5- Tanagho, E.A., Aninch, J.W.: Smith's General Urology, Twelfth Edition, 646, 1988.
- 6- Lopata, A., Johnston, I.W.H., Hault, I.J., Speirs, A.I.: Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by invitro fertilization of a pre-ovulatory egg. Fertil Steril 33: 117, 1980.
- 7- Huszar, G., Makler, A., Murillo, O., Massey, J., De Cherney, A.: The efficacy of intrauterine insemination (Abstr. 259) Fertil Steril 41: 1085, 1984.
- 8- Guttmacher, A.F.: The role of artificial insemination in the treatment of sterility. Obstet Gynecol Surv 15: 767, 1960.
- 9- Arnold, M.B., Christine, L.C.: Sperm processing and insemination for oligospermia Urol. Clin. North Am. 597-607, 1987.
- 10- Glass, R.H., Erricsson, R.J.: Intrauterine insemination of isolated motile sperm. Fertil Steril 29: 535, 1978.
- 11- Vermeiden et al. Presented at the 5 th World Congress on invitro Fertilization and Embryo

Transfer, April, 1987.

12- Farris, E.J., Murphy, D.P.: The characteristics of the two parts of the partitioned ejaculation and the advantages of its use for intrauterin insemination. *Fertil Steril* 11: 465, 1960.

13- MacLeod, J.: Human male infertility. *Obstet. Gynecol. Surv.* 36: 335, 1971.

14- Perez-Pelaez, M., Cohen, M.R.: The split ejaculate in homologous insemination *Int. J. Fertil* 10: 25, 1965.

15- Glazerman, M., Bernstein, D., Insler, V.: The

cervical factor of infertility and intrauterine insemination. *Int. J. Fertil* 29: 16, 1984.

16- Barwin, B.N.: Intrauterine insemination of husband's semen. *J. Reprod Fertil* 36: 101, 1974.

17- Mastroianni, L. Jr., Laberge, J.L., Rock, J.: Appraisal of the efficacy of artificial insemination with husband's sperm and evaluation of insemination technics, *Fertil Steril* 8: 260, 1957.