

İnseminasyon Örneklerinin Tüpte ya da Kateter İçerisinde Bekletilme Süresi Sperm Motilitesini Nasıl Etkiliyor? Karşılaştırmalı Deneysel Çalışma

Ranan Gulhan Aktas¹, Emine Aksoy², Handan Ankaralı³

1 Zeynep Kamil Kadın Ve Çocuk Hastalıkları Eğitim Ve Araştırma Hastanesi

2 Konya Eğitim Ve Araştırma Hastanesi

3 Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi

Adres : Zeynep Kamil Hastanesi tüp Bebek Merkeziüsküdar İstanbul - Türkiye

Cep: 05333992755 e-mail: ranagulhan@yahoo.com

ÖZET:

Amaç: Ucuz, kolay ve hızlı bir yöntem olan "inseminasyon"da başarıyı arttırabilmek için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu işlem için hastadan alınan örnekler hazırlama aşamasından sonra; farklı nedenlerle kateter ya da tüp içerisinde laboratuvarlarda bekletilmektedir. Çalışmada; bu bekleme süresinin sperm motilitesi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod: Bu amaçla 15 hastadan alınan örnekler tüp ya da kateter içerisinde 1 ila 3 saat bekletildi. Yıkama öncesi, yıkama sonrası, hazırlama işleminden 1 saat sonra ve 3 saat sonra örneklerdeki sperm hareketliliği ayrıntılı şekilde incelendi. Aynı hastadan alınan örnek hem tüp hem de kateter içerisinde bekletildi. Tüm verilerin karşılaştırmalı istatistikleri yapıldı.

Bulgular: Sonuçlar; örneklerin hazırlandıktan sonra katetere yüklenerek bekletilmesinin daha iyi olduğunu gösterdi. Bu bekleme süresi uzadıkça motilite oranı da anlamlı şekilde azalmakta idi. 3 saat sonra istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görüldü.

Sonuç: Bulgularımız; örneklerin hazırlandıktan sonra en kısa sürede hastaya verilmesinin başarıyı arttırabilecek önemli faktörlerden biri olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İnseminasyon, Sperm hareketliliği, Kateter

SUMMARY:

How Does the Waiting Time of the Insemination Specimens in Catheters or in Tubes Effect the Sperm Motility? A Comparative Experimental Study

Aim: İnsemination is an easy, fast and affordable technique. There are many studies related about how to increase the success of this technique. Waiting time of the insemination specimens in the laboratory varies under different conditions. The aim of the study was to examine the effects of the waiting time of the specimens on sperm motility.

Materials and Methods: Specimens from 15 patients were left in the incubators at 37°C for 1 or 3 hours. Sperm motility was counted before preparation, right after preparation, 1 hour later and also 3 hours later after preparation. Specimens from each patients were either in tube or in catheter. Statistical analysis were made.

Findings: Sperm motility was much better in the specimens in catheters. As waiting time was increased, sperm motility was decreased. Statistical meaningful differences were clear on the specimens which were waited for 3 hours. **RESULTS:** The study shows that one of the important factor to increase the success at insemination is to give the prepared specimens to the patients as soon as possible.

Key words: İnsemination, Sperm motility, Catheter

GİRİŞ

İnseminasyon; subfertil hastalarda gebelik elde edilmesinde çok önemli, oldukça kolay, hızlı ve ucuz bir tekniktir(1). Bu tekniğin başarı ile uygulanması; gebelik oranlarını arttırarak daha pahalı, uzun ve zor bir işlem dizisi olan

tüp bebek uygulamalarını azaltacaktır. Bu nedenlerle; inseminasyonlarda başarı oranını arttırmak için çok farklı çalışmalar yapılmaktadır(2-7). Baba adayından alınan örneğin uygun şekilde hazırlanması bu işlemin

ilk ve çok önemli kısmıdır. Örneğin hazırlanmasında kullanılan tüm tekniklerde amaç; ejakülatta spermilerin semenden temizlenmesi, mümkün olduğu kadar çok sayıda normal morfolojili ve yüksek motilitedeki spermilerin anne adayına verilebilmesidir. Yıkama işlemi sonrası motil sperm oranının yüksek olmasının başarıyı arttırdığı çalışmalarla gösterilmiştir(2-5). Tüm merkezlerde baba adayından örnek alınır, uygun metodlarla bu örnek yıkanır ve anne adayına verilmek üzere inseminasyon kateterine yüklenerek bekletilir(8). Bazan anne adayının hazır olmaması, hekimin başka öncelikli işleri ya da çevresel nedenlerle hazırlanmış örneğin bekleme süresi hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Çalışmada; hazırlanmış örneğin kateter içerisinde bekleme süresinin spermilerin motilitesinde değişikliğe yol açıp açmadığının araştırılması ve bu süre içerisinde santrifüj tüpü içerisinde bekleyen örneklerle kateter içerisinde bekleyen örneklerin karşılaştırılması amaçlandı.

MATERYAL VE METOD

Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezine spermioyogram için başvuran hastalardan sperm sayısı 20 milyon ve üzeri, motilitesi %30 ve üzeri olan 15 hastanın örneği çalışma kapsamına alındı. Bu hastaların spermioyogramları hazırladıktan sonra atılacak örnekler çalışma için kullanıldı. Bu hastaların spermioyogramları hazırlanırken gerek yıkama öncesi gerekse yıkama sonrası örnekteki sperm sayıları ve motiliteleri belirlenmişti. İnseminasyon için hazırlama yöntemi olarak örnekler silika partikülleri içeren gradient yöntemi ile çift fazlı (%90- %45'lik grad) şekilde yıkanmıştı. Bunun için iki ayrı falkon tüpüne %90'lık grad üzerine %45'lik graddan 1'er cc konuldu. 1600 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek tüpün dip kısmında 0.5cc kalana dek üst kısmı çekildi. Sonra her iki tüpe yıkama medyumundan 2 cc eklendi, 2200 rpm'de 6 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Tüplerin dip kısmında 0,5 cc kalana kadar süpernatant çekilip atıldı. Aşılama kateterlerine 0,5 cc yıkanmış sperm örneklerden çekildi. Tüm çalışmada aynı tip aşılama kateteri kullanıldı. Tüpteki yıkanmış spermilerden 0. saat değerlendirmesi için

örnekler hazırlanır hazırlanmaz makler kamerasına 1damla damlatıldı. Tüpüte kalan örnek ve katetere yüklenen örnek 37C'a ayarlanmış etüve kaldırıldı. Her ikisi için de 1. saat ve 3. saatte motilite değerlendirmeleri yine aynı kişi tarafından ve yine Makler kamerası kullanılarak yapıldı. Her aşamada; toplam motil hücre yüzdeleri (T), hızlı hareketli sperm yüzdesi(A), yavaş hareketli sperm yüzdesi(B), yerinde hareketli olanlar(C) ve hareketsiz olanlar(D) saptandı. T,A,B,C ve D ölçümlerinde ayrı ayrı 6 farklı ölçüm zamanının ortalamalarını karşılaştırmada basit tekrarlanan ölçümlü varyans analizi kullanıldı. Ayrıca anlamlı düzeyde farklı olan ölçüm zamanlarının belirlenmesinde ise post hoc test olarak Bonferroni testi kullanıldı.

BULGULAR

Merkezimize spermioyogram yapılması amacı ile başvuran hastalardan sayım sonrası 20 milyon ve üzeri sayı elde edilen ve motilitesi %30 ve üzerinde olan 15 hastanın örneği çalışmada kullanılmıştır. Örneklerin likefiye olduktan hemen sonraki ve yıkama sonrası değerlendirme sonuçları **Tablo 1**'de özetlenmiştir. Bunun ardından her örnekten 0,5 cc tüpüte bırakılmış ve 0,5 cc katetere yüklendi. Tüpüte 1 saat ve 3 saat kalan spermilerin motilite yüzdeleri de **Tablo 2**'de özetlendi. **Tablo 3**'te ise kateter içerisinde 1 saat ve 3 saat kalan spermilerin motilite yüzdeleri belirtilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalı tüm sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Tablo 1: Yıkama öncesi ve yıkama sonrası motilite değerleri (%)

HASTA NO.	YIKAMA ÖNCESİ				YIKAMA SONRASI					
	T	A	B	C	D	T	A	B	C	D
1	88	3	81	4	12	80	0	74	6	20
2	91	2	87	2	9	89	1	83	5	11
3	94	8	78	8	6	78	2	70	6	22
4	87	1	73	13	13	79	0	59	20	21
5	94	4	84	6	6	78	0	63	15	22
6	92	4	81	7	8	84	0	79	5	16
7	90	5	79	6	10	68	0	59	9	32
8	97	15	80	2	3	89	1	83	5	11
9	90	1	76	13	10	58	0	43	15	42
10	94	7	81	6	6	65	0	56	9	35
11	96	6	85	5	4	75	0	66	9	25
12	96	0	93	3	4	71	0	61	10	29
13	91	5	83	3	9	81	1	76	4	19
14	87	0	78	9	13	79	0	71	8	21
15	95	4	88	3	5	87	1	82	4	13

T:Total Motil Sperm Yüzdesi

A: Hızlı Hareketli Sperm Yüzdesi

B: Yavaş Hareketli Sperm Yüzdesi

C: Yerinde Hareketli Sperm Yüzdesi

D: Hareketsiz Sperm Yüzdesi

Tablo 2: Tüpte bekletilen örneklerin motilite değerleri(%)

HASTA NO.	1.SAAT				3.SAAT					
	T	A	B	C	D	T	A	B	C	D
1	96	4	89	3	4	91	0	84	7	9
2	86	2	80	4	14	74	0	52	22	26
3	92	5	80	7	8	81	0	65	16	19
4	90	0	78	12	10	46	0	23	23	54
5	93	4	87	2	7	81	0	75	6	19
6	95	4	86	5	5	94	0	92	2	6
7	90	2	76	13	9	84	0	75	9	16
8	91	7	80	4	9	89	0	79	10	11
9	82	1	70	11	18	73	0	45	28	27
10	91	4	83	4	9	79	0	60	19	21
11	85	0	73	12	15	83	0	62	21	17
12	92	0	78	14	8	99	0	53	26	21
13	82	2	75	5	18	84	0	78	6	16
14	90	0	83	7	10	82	0	64	18	18
15	85	3	72	10	15	71	0	45	26	29

T:Total Motil Sperm Yüzdesi
A: Hızlı Hareketli Sperm Yüzdesi
B: Yavaş Hareketli Sperm Yüzdesi
C: Yerinde Hareketli Sperm Yüzdesi
D: Hareketsiz Sperm Yüzdesi

Tablo 3: Kataterde bekletilen örneklerin motilite değerleri (%)

HASTA NO.	1.SAAT				3.SAAT					
	T	A	B	C	D	T	A	B	C	D
1	96	4	90	2	4	96	4	90	2	4
2	95	2	85	8	5	95	2	85	8	5
3	94	6	82	6	6	94	6	82	6	6
4	86	0	77	9	14	86	0	77	9	14
5	93	4	85	4	7	93	4	85	4	7
6	96	4	85	7	5	96	4	85	7	5
7	88	2	75	11	12	88	2	75	11	12
8	96	9	82	5	4	96	9	82	5	4
9	80	1	69	10	20	80	1	69	10	20
10	89	4	80	5	11	89	4	80	5	11
11	88	4	76	8	12	88	4	76	8	12
12	92	0	77	15	8	92	0	77	15	8
13	94	4	88	2	6	94	4	88	2	6
14	89	0	85	4	11	89	0	85	4	11
15	94	3	88	3	5	94	3	88	3	5

T:Total Motil Sperm Yüzdesi
A: Hızlı Hareketli Sperm Yüzdesi
B: Yavaş Hareketli Sperm Yüzdesi
C: Yerinde Hareketli Sperm Yüzdesi
D: Hareketsiz Sperm Yüzdesi

Total Motilite(T):

Tablo 4'te T ölçümünün 6 farklı zamandaki ortalama ve standart sapma değerleri yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde; hemen yıkama sonrası ile yıkama öncesi arasında anlamlı bir artış ($P=0.012$) vardır. Hemen yıkama sonrası ile 3. saatte tüpteki ($P=0.009$) ve 3. saatte kateterdeki örnekler karşılaştırıldığında ($P=0.015$) anlamlı düşüş gözlenmektedir.

Tablo 4: T ölçümünün istatistiksel verileri

	Ortalama	Standart Deviasyon	Ornek Sayısı
1	92.1333	3.31375	15
2	89.3333	4.36961	15
3	91.3333	4.57738	15
4	80.7333	12.30834	15
5	85.2667	8.19814	15
6	77.4000	8.84631	15

1= yıkama sonrası 0. saat T ölçümü
2= yıkama sonrası 1. saat tüp ve T ölçümü
3= yıkama sonrası 1. saat kateter ve T ölçümü
4= yıkama sonrası 3. saat tüp ve T ölçümü
5= yıkama sonrası 3. saat kateter ve T ölçümü
6= yıkama öncesi T ölçümü

Hızlı hareketli Sperm Oranı(A):

Tablo 5'te hızlı hareketli spermle ilgili verilerin istatistiksel sonuçları yer almaktadır. Yine yıkama öncesi ve sonrası arası anlamlı bir artış vardır($P=0.012$). Hemen yıkama sonrası ölçümler; 3.saate tüpte ve kateterde bekleyen örneklerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksektir (sırası ile $P=0.009$ ve $P=0.015$).

Tablo 5: A ölçümünün istatistiksel verileri

	Ortalama	Standart Deviasyon	Ornek Sayısı
1	4.3333	3.82971	15
2	2.6333	2.13363	15
3	3.1333	2.44560	15
4	.0000	.00000	15
5	.2000	.56061	15
6	.4000	.63248	15

1= yıkama sonrası 0. saat A ölçümü
2= yıkama sonrası 1. saat tüp ve A ölçümü
3= yıkama sonrası 1. saat kateter ve A ölçümü
4= yıkama sonrası 3. saat tüp ve A ölçümü
5= yıkama sonrası 3. saat kateter ve A ölçümü
6= yıkama öncesi A ölçümü

Yavaş Hareketli Sperm Oranı (B):

Tablo 6'da yavaş hareketli spermle ilgili istatistiksel verilerin ortalaması ve standart deviasyonu özetlenmiştir. 3 saat tüpte bekleyen örnekte yavaş hareketli sperm sayısı bir saat tüpte bekleyen örnekte($P=0.025$) ve yıkama sonrası hemen ölçümden($P=0.005$) anlamlı şekilde düşüktür. 1 saat tüpte ($P=0.035$) bekleyen örneklerdeki ölçüm ile yıkama öncesi ölçüm arasında anlamlı fark vardır.

Tablo 6: B ölçümünün istatistiksel verileri

	Ortalama	Standart Deviasyon	Ornek Sayısı
1	81.8000	5.07374	15
2	79.3333	5.60187	15
3	81.6000	5.84074	15
4	63.4667	17.99153	15
5	74.8667	11.79508	15
6	68.3333	11.61075	15

1= yıkama sonrası 0. saat B ölçümü
2= yıkama sonrası 1. saat tüp ve B ölçümü
3= yıkama sonrası 1. saat kateter ve B ölçümü
4= yıkama sonrası 3. saat tüp ve B ölçümü
5= yıkama sonrası 3. saat kateter ve B ölçümü
6= yıkama öncesi B ölçümü

Yerinde Hareketli Sperm Oranı(C):

Tablo 7'de yerinde hareketli spermle ilgili istatistiksel verilerin ortalaması ve standart deviasyonu özetlenmiştir. 3 saat tüpte bekleyen örnekte yerinde hareketli sperm sayısı bir saat tüpte bekleyen örnekten(P=0.005) ve yıkama sonrası hemen ölçümden(P=0.006) anlamlı şekilde artmıştır. 3 saat tüpte bekleyen örnekler; yıkama sonrası hemen ölçümlerle (P=0.006), ya da 1 saat gerek kateterde (P=0.005) gerekse tüpte bekleyen(P=0.005) örneklerle karşılaştırıldığında; bu değerlerin artmasına neden olmaktadır.

Tablo 7: C ölçümünün istatistiksel verileri

	Ortalama	Standart Deviasyon	Ornek Sayısı
1	6.0000	3.54562	15
2	7.5333	4.06848	15
3	6.6000	3.64104	15
4	15.9333	8.57294	15
5	10.2000	5.46678	15
6	8.6667	4.70056	15

- 1= yıkama sonrası 0. saat C ölçümü
 2= yıkama sonrası 1. saat tüp ve C ölçümü
 3= yıkama sonrası 1. saat kateter ve C ölçümü
 4= yıkama sonrası 3. saat tüp ve C ölçümü
 5= yıkama sonrası 3. saat kateter ve C ölçümü
 6= yıkama öncesi C ölçümü

Hareketsiz Sperm Oranı(D)

Tablo 8'de yerinde hareketsiz spermle ilgili istatistiksel verilerin ortalaması ve standart deviasyonu özetlenmiştir. Hareketsiz sperm sayısı 3 saat bekleyen tüpte belirgin şekilde artmaktadır (P=0.006). 1 saat tüpte (P=0.003) ya da 1 saat kateterde(P=0.000) beklemiş örneklerde yıkama öncesi örneğine göre hareketsiz sperm oranı düşüktür.

Tablo 8: D ölçümünün istatistiksel verileri

	Ortalama	Standart Deviasyon	Ornek Sayısı
1	7.8667	3.31375	15
2	10.6000	4.38830	15
3	8.6667	4.56175	15
4	20.6000	11.22370	15
5	14.7333	8.19814	15
6	22.6000	8.84631	15

- 1= yıkama sonrası 0. saat D ölçümü
 2= yıkama sonrası 1. saat tüp ve D ölçümü
 3= yıkama sonrası 1. saat kateter ve D ölçümü
 4= yıkama sonrası 3. saat tüp ve D ölçümü
 5= yıkama sonrası 3. saat kateter ve D ölçümü
 6= yıkama öncesi D ölçümü

SONUÇ

Bu deneysel çalışmada; aşılama örneklerinin hazırlanmasının ardından bekleme sürecinin başarıyı nasıl etkileyebileceği araştırılmaya çalışıldı. Çok sayıda çalışmada aşılamanın başarılı olmasında motilitenin önemli olduğu vurgulanmıştır(1-5, 9). Bu nedenle çalışmada da motil sperm oranları incelenerek en iyi sonucun ne zaman alınabileceği belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki; yıkama işlemi sonrası örneklerde motilitesi yüksek sperm oranı belirgin şekilde artmaktadır. Bu da daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi beklenen bir durumdur(8). Çalışmada örnekler 1 saat tüpte bekleyince yavaş hareketli sperm artmıştır. Kateterde 1 saat bekleyen örneklerde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Ancak 3 saat bekletilince gerek tüpteki gerekse kateterdeki hareketli sperm oranlarında anlamlı düşüş gözlenmiştir. Yavaş hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz sperm oranları; özellikle 3 saat tüpte bekleyen örneklerde artmaktadır. Bu bulguları şu şekilde yorumlayabiliriz: 1 saatlik süreçte kateterde bekleyen örnekte istatistiksel anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bu nedenle örneğin yıkanma işlemi bitirilir bitirilmez katetere yüklenmesi ve bu şekilde inkübatörde bekletilmesi daha uygun olacaktır. Buna karşılık; 3 saat gerek tüpte gerekse kateterde bekleyen örneklerde, örnekler inkübatörde 37C'lık ısıda bekletilmiş olmasına rağmen, hareketli sperm oranında anlamlı bir düşüş olmaktadır. Bu değişiklikler tüpte bekleyen örneklerde daha belirgindir. Sonuçlar göstermektedir ki; yıkama sonrası hazır hale gelen örnekler hemen katetere yüklenmeli ve mümkün olan en kısa sürede hastaya verilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Keck C, Gerber-Schäfer C, Wilhelm C, Vogelgesang D. Intrauterine insemination for treatment of male infertility. *Int J Androl.* 1997; 20 Suppl 3:55-64.
2. Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2009 Mar;91(3):777-81.

3. ME Abdallah, F Yelian, MP Diamond, EE Puscheck. Correlation of Processed Total Motile Sperm Count with Intrauterine Insemination Success. *Fertility and Sterility*, 91(3), Supplement 1, 2009, S10.

4. Ulrike Berg, Cosima Brucker, Frank Dieter Berg. Effect of motile sperm count after swim-up on outcome of intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, 1997;67(4): 747-50.

5. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2009; 91(3):777-81.

6. Paul B Miller MD, M Lee Acres NP, J Glenn Proctor BS, H Lee Higdon III Ph D and William R Boone Ph D. Flexible versus rigid intrauterine insemination catheters: A prospective, randomized, controlled study . Presented at the 52nd Annual Clinical Meeting of the American College of Obstetricians and Gynecologists, Philadelphia, Pennsylvania, May 2004, 1–5.

7 . KL Smith, DR Grow, HP Wiczuk, DL O'Shea and M. Arny. Does catheter type effect pregnancy rate in intrauterine insemination cycles?, *J Assist Reprod Genet*, 2002, 19(2): 49–52.

8. Boomsma CM., Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004; (3).

9. Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, Cox A, Jacobs P, Janssen M, Nijs M. Semen quality and intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, 2005; 83 (5):1544-1546.