

Sperma Dondurulmasında Farklı Glycerin Oranları ve Alışımın Motiliteye Etkisi

THE EFFECT OF DIFFERENT GLYCERIN RATES AND EQUILIBRATION MEDIA ON MOTILITY IN THE FREEZING OF SEMEN

İsmet İNAN*, Necmettin TEKİN", Ongun KESKİN**, Orhan ERBAY*

* Ankara Hastanesi, Kadın Doğum Kliniği

** A.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama ABD

*** Ankara Hastanesi Bakterioloji Kliniği

ÖZET

Amaç: İnsan spermasının dondurulmasında farklı glycerin oranlarının ve alışım ortamlarının çözüm motilitesine etkisini araştırmak.

Çalışmanın Yapıldığı Yer: A.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölenme ve Sun'i Tohumlama ABD, S.B. Ankara Hastanesi Doğum ve Bakterioloji Kliniği

Materyal ve Metod: Toplam 17 ejakülat kullanılmıştır. Split ejakülat biçiminde %5, 8 ve W oranlarında glycerin içeren spermalar +4 °C de 150 dakika ve +20 °C de 20 dakikalık alışım ortamlarında dondurulmuştur. Spermalarda çözüm motiliteleri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Farklı glycerin oranları (%5, 8 ve 10) içeren spermaların +4 °C lık alışım ortamında dondurulmasıyla elde edilen çözüm motiliteleri % 18.23, 23.23 ve 22.5 bulunmuştur. Aynı glycerin oranlarıyla +20 °C'lik alışımda ise %25.88, 30.88 ve 27.81 motilite saptanmıştır.

Sonuç: En uygun çözüm motilitesi her üç glycerin oranı ile +20 °C de 20 dakikalık alışımla elde edilirken, en yüksek motilite (%30.88) %8 glycerin oranı ile elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sperma, Spermanın dondurulması, Kriyoprotektan

T Klin Jinekoloj Obst 1994, 4: 208-211

Spermanın inseminasyon çalışmalarında kullanılması çok eskilere dayanmakla birlikte, dondurulmasının başarılmasıyla özellikle, evcil hayvanlarda yaygın uygulama alanı bulmuş, son zamanlarda ise insanlarda önem kazanmıştır.

Spermanın kısa süreli olarak değerlendirilmesi, önceleri nativ veya sulandırılmış spermanların ısılarının düşürülmesi (+5 °C) ve bir iki günlük süreler içinde kulla-

Geliş Tarihi: 20.08.1993

Kabul Tarihi: 18.07.1994

Yazışma Adresi: Dr.İsmet İNAN

S.B. Ankara Hastanesi

Doğum Kliniği Cebeci ANKARA

SUMMARY

Object: To investigate the effect of different glycerin rates and equilibration media on postthawing motility in the freezing of human semen.

Institution: University of Ankara, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination. Clinic of Gynecology and Bacteriology in Ankara Hospital of Health Minister'.

Materials and Methods: Seventeen ejaculates were used. Ejaculates were divided in to split ejaculates including 5, 8 and 10 percent glycerin, and were frozen after equilibration at +4 °C for 150 mln. and at +20 °C for 20 min. In semen samples postthawing motility was evaluated.

Results: including different glycerin rates (5, 8 and 10 percent) and equilibrated at +4°C frozen semen samples had 18.23, 23.23 and 22.5 percent motility respectively. With the same glycerin rates in the equilibration at +20 °C, the motility rates were determined 25.88, 30.88 and 27.81 percent, respectively.

Conclusion: The most suitable postthawing motility was obtained in all the glycerin rates with equilibrated semen at +20 °C for 20 minutes, and the highest motility rates (30.88 percent) were obtained with 8 percent glycerin rates.

Key Words: Semen, Freezing of semen, Cryoprotectant

Anatolian J Gynecol Obst 1994, 4: 208-211

nılmasıyla yapılabiliyordu. Ancak, düşük ısıda dondurulması ve daha uzun süre saklanması spermaya katılan kim solüsyonlar ve özellikle de koruyucu maddelerle (kriyoprotektan) gerçekleştirilmiştir (1). Bu çalışmalara 1949 yılında biyolojik materyalin dondurulması ve çözülmesinde koruyucu etkisi olan glycerin'i bulan Polge, Smith ve Porkes (2) öncülük etmişlerdir. Günümüzde biyolojik materyalin özellikle spermatozoon ve embriyonun dondurulması, başta glycerin ve dimetilsulfoksit (DMSO) olmak üzere değişik kriyoprotektanlar ve sperma sulandırıcıları kullanılarak başarıyla yapılabilmektedir.

Spermanın dondurulmasında genellikle pratik kullanım değeri olan yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan başlıcaları şöyle sıralanabilir.

- Sıvı azot buharında yaklaşık -120 °C de payet, minütüb, ampul vb. içinde spermanın dondurulması ve sıvı azotta saklanması (N2/-196°C).

- Kuru buzda pelleî biçiminde spermanın dondurulması (CO2/-79 °C) ve sıvı azot içinde saklanması.

Spermanın dondurulması ve çözüm işlemleri sonrasında gerek in vitro değerlendirmeler (Inseminasyon), gerek in vitro olarak saptanan spermatozoa motilitesi değerleri, kullanılan sperma sulandırıcısı ve kryoprotektan bileşimlerine bağlı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle, araştırmacılar farklı sperma sulandırıcıları ve kryoprotektanlar kullanarak In vitro değerlendirmelere yönelmişlerdir. Nitekim, kimi araştırmacılar Test (2) sulandırıcısı kullanarak dondurdukları insan spermalarında çözüm sonrasında saptadıkları spermatozoa motilitesini kriter olarak ele alırken, birçok araştırmacı da aynı değerlendirmeyi Sodyum Sitrat (4) ve Laktoz (5) gibi solüsyonlar kullanarak yapmışlardır.

Dondurma işlemlerinde sperma sulandırıcılarına katılan kryoprotektanlar ve oranlarıyla ilgili olarak birbirinden oldukça farklı sonuçlar bildirilmiştir. Daha çok kullanım alanı bulan glycerin'in %10'luk oranıyla çözüm sonunda %40'luk motilite ve %10.4'lük gebelik sonucu saptanırken (4), değişik çalışmalarda (3,6) ise aynı kryoprotektanla %25.7'lik çözüm motilitesi ve %27.1-62.4 arasında değişen gebelikte elde edilmiştir.

Dondurulmuş sperma ilk kez 1953 yılında 3 kadın üzerinde uygulanmıştır (3). Günümüzde ise gelişmiş ülkelerde değişik amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle son zamanlarda gelişen ve başarıyla uygulanan in vitro fertilizasyon (IVF) / tüp bebek, Gamete - intra follopan transfer (GİFT) ve değişik amaçlı Inseminasyon (İS) uygulamalarında kullanılmaktadır. Ayrıca, taze spermayla geçebilen birçok hastalığın (AİDS gibi) elimine edilmesi veya kontrolü bu yöntemle sağlanabilecektir (6).

Bu çalışmada, İnsan spermasının dondurulması ve saklanması koruyucu etkisi olan glycerin'in değişik oranları (%5, 8 ve 10) kullanılarak spermlerin farklı alışım ortamlarında dondurulmasının çözülme sonrasında spermatozoa motilitesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmada stérilité ve infertilite tedavisi amacıyla Ankara Hastanesi, Bakteriyoloji Kliniğine gelen hasta veya hasta eşlerinden alınan toplam 17 ejakülat kullanılmıştır.

Elde edilen ejakülatlar oda ısısında bekletilerek likefaksiyonu (sulanması-erimesi) sağlanmış, başlıca spermatozoa özellikleri belirlenmiş ve sulandırma işlemleri sonrasında %50'nin üzerinde motilite gösterenler çalışmada kullanılmıştır.

Ejakülatlar, alındıktan yaklaşık 2-3 saat sonra glycerin (kryoprotektan) içeren sperma sulandırıcısına 1/2 oranında karıştırılmışlardır. Bunun için, her ejakülat 3

parçaya bölünmüş (Splitejekülat) ve içinde %5, 8 ve 10 oranlarında glycerin bulunan Trls (7) solüsyonlarıyla sulandırılmışlardır. Spermalar Minitüblere[^] çekildikten sonra her değişik glycerin oranı için yeterli sayıda minütüb +4 °C de 150 dakika ve +20 °C de 20 dakika alışım (Aquilibrasyon) ortamlarına alınmışlardır.

Spermalar alışım süreleri sonunda sıvı azot buharında (-100/-120 °C) 15 dakika süreyle tutularak dondurulmuşlar ve sıvı azotta (-196 °C) saklanmayı almışlardır. Minitüblerin çözümü, dondurma işlemlerinden en az bir gün sonra olmak üzere +40 °C ilk su banyosunda 12 saniye tutularak yapılmıştır.

Çözülen her sperma numunesinden spermatozoa motilitesi (%) ısıtma tablalı phasenkontrast mikroskopta değerlendirilmiş ve farklı glycerin oranları ve alışım ortamları için ortalama değerler hesaplanarak istatistiki önemlilikleri belirlenmiştir (two-way ANOVA).

Ayrıca, çalışmada kullanılan spermalar sulandırılma işlemleri sonrasında gösterdikleri spermatozoa motilitesine göre, orta (%50), iyi (%60) ve çok iyi (%70) olarak gruplandırılmışlar ve değişik glycerin oranlarına ve alışım ortamlarına göre değerlendirilmişlerdir.

BULGULAR

Çalışmada kullanılan toplam 17 ejakülatın başlıca spermatozoa özellikleri, her özellik için elde olmayan nedenlerle farklı sayıda saptanmış ve ortalama değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Tablodan izleneceği gibi ortalama sperma miktarı 3.5 ml bulunurken, likefaksiyon süresi birbirinden oldukça farklı ve ortalama 81.11 dakika olmuştur. Spermatozoonların hareketleri nativ spermada aktif, anlamsız ve inaktif olmak üzere %48.4, 20.4 ve 30.8 değerlendirilmiş, sulandırma ve dondurma işlemleri sonrasında (çözüm) ise bir yönde hareket edenle değerlendirilmeye alınmış ve motilite (%) olarak verilmiştir (Tablo 1, 3 ve 5).

Diğer spermatozoa özelliklerinden spermatozoa yoğunluğu (95.29×10^5 /ml), anormal spermatozoa oranı (%12.12) ve spermanın pH değeri (7.61) fizyolojik sınırlar içinde bulunmuştur.

Spermanın dondurulmasında kullanılan iki farklı etki faktörünün (glycerin oranı ve alışım ortamı) çözüm sonrası motilitesi üzerine etkileri varians analizi yapılarak değerlendirilmiştir (Tablo 2). Aynı faktörlerin etkisi altında gerçekleşen çözüm motilitesi ortalama değerleri ve standart hataları da Tablo 3'de gösterilmiştir. Buna göre, %5, 8 ve 10 glycerin içeren sulandırıcılarla elde edilen genel motilite değerleri %22.05, 27.05 ve 25.14 olurken, farklı alışım ortamlarında ise genel motilite yüzdeleri 21.37 ve 28.13 (P<0.05) bulunmuştur.

Sulandırma işlemleri sonrasında farklı motilite (kalite) gösteren sperma gruplarının (orta, iyi ve çok iyi) değişik glycerin ve alışım ortamlarından etkilenmeleri istatistiki olarak değerlendirilmiş ve Tablo 4'de gösterilmiştir. Farklı kalitedeki spermaların iki değişik faktörün etkisi altında dondurulmaları sonrası elde edilen çözüm

Tablo 1. Nativ ejakülatlarda saptanan başlıca spermatojolojik özelliklere ilişkin değerler.

Table 1. Spermogram parameters in native ejaculate.

| | X±Sx | n |
|---------------------------------|-------------|----|
| Sperma miktarı (ml) | 3.5±0.85 | 17 |
| Likefaksiyon (dakika) | 81.11±24.45 | 11 |
| Spermatozoa motilitesi (%) | | |
| Aktif hareket: | 48.8±11.84 | 17 |
| Anlamsız hareket | 20.4±4.95 | 17 |
| İnaktif hareket | 30.8±7.47 | 17 |
| Spermatozoa yoğunluğu (X106/ml) | 95.29±23.82 | 16 |
| pH | 7.6H1.84 | 17 |
| Anormal Spermatozoa (%) | | |
| Normal | 76.19±19.05 | 16 |
| Juvenil | 5.39±1.34 | 16 |
| Senil | 6.3H.57 | 16 |
| Anormal | 12.12±3.03 | 16 |
| Ölü Spermatozoa (%) | 56.6±14.15 | 7 |

Tablo 2. Değişik glycerin oranları ve alışımlı spermaların çözümü sonu motilite değerleri varyans analizi sonuçları.

Table 2. Motility percentage of spermatus in various çerine ratin after defrezing.

| V.K. | S.D. | K.T. | K.O. | F | P |
|----------------|------|---------|--------|-------|--------|
| Genel | 101 | 241.893 | | — | |
| G.A. | 5 | 17.193 | 3.438 | 1.469 | P>0.05 |
| Glycerinler A. | 2 | 4.305 | 2.153 | 0.92 | P>0.05 |
| AlışımlarA. | 1 | 12.739 | 12.739 | 5.44 | P<0.05 |
| Etkileşim | 2 | 0.149 | 0.074 | 0.03 | P>0.05 |
| G.i | 96 | 224.700 | 2.341 | — | — |

motilitesi ortalamaları ve Standard hataları da Tablo 5'de verilmiştir. Tablodan izleneceği gibi her üç kalite grubunda da farklı glycerin oranından çok, alışımlı ortamın etkisi gözlenmiştir. En yüksek motilite (%23.75) orta kalitedeki spermalarda %5 glycerin oranı ve +20°C de 20 dakikalık alışımlı sağlanırken, iyi ve çok iyi sperma gruplarında en yüksek motilite değerleri (%33.57 ve 33.33) %8 glycerin ve yine +20 °C de 20 dakikalık alışımlı ortamlarında bulunmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada kullanılan ejakülatlarda saptanan başlıca spermatojolojik özelliklere (spermogram) ilişkin değerler genelde fizyolojik sınırlar içinde olmuştur (Tablo 1). Ancak, spermanın likefaksiyonu (81.11±24.45 dakika) ve spermatozoonların subvital boyama testi (eosin)

Tablo 3. Değişik glycerin oranları ve alışımlı süreleri kullanılarak dondurulmuş spermaların çözümü sonu motilite değerleri (n=17)

Table 3. Sperm motility rates in various glycerine concentration and equilibrium time.

| Glycerin (%) | Alışımlı | | Genel |
|--------------|---------------|----------------|------------|
| | +40C/150 dak. | +20 oC/20 dak. | |
| 5 | 18.23±2.46 | 25.88±3.3 | 22.05±2.13 |
| 8 | 23.23±2.26 | 30.88±3.46 | 27.05±2.14 |
| 10 | 22.5±3.43 | 27.81±3.75 | 25.14±2.46 |
| Genel | 21.37±1.57 | 28.13±1.91 | |

ile saptanan ölü oranları (%56.6±14.15) normal değerlerin (8) üstünde bulunmaktadır. Bu değerler, spermaları kullanılan kişilerin oiası stérilité ve infertilite nedenlerine bağlı olarak veya diğer özelliklere kıyasla daha az sayıda değerlendirilmelerinden kaynaklanmış olabilir.

Spermatozoonların dondurulmasında ve çözülmesi sırasında hücre membranları üzerinde ve arasında bulunan suyun kristalizasyonu ve rekristalizasyonu sonucu membranlarda perforasyonların (özellikle akrozom civarında) olduğu bilinmektedir (9). Fertilizasyonda ise, yalnızca motil ve normal akrozomal yapılu spermatozoonlar etkili olabilmektedirler (10,11). O nedenle, gerek in vivo, gerekse in vitro çalışmalarda spermatozoonların fertilité güçlerinin araştırılmasında öncelikle spermatozoa motilitesi ve morfolojik yapısı araştırılmaktadır (9,12). Sunulan çalışmada spermanın dondurulması ve çözülmesinde kryoprotektan etki, sulandırmaya katılan glycerinle sağlanmaya çalışılmıştır. Değişik oranlarda (%5, 8 ve 10) spermaya katılan glycerinle az çok farklı (p>0.05) sonuçlar alınmış, en yüksek spermatozoa motilitesi (%30.88 ±3.46) %8'lik oranla elde edilmiştir.

Sperma sulandırıcısına değişik oranlarda glycerin katarak insan spermalarını donduran araştırmacıların (3,4,6,9,12,13), çözümü sonu spermatozoa motilite değerleri (%27.1±62.4) arasında değişmiş ve bu çalışma sonuçlarıyla kısmen uyum, kısmen de farklılıklar göstermiştir. Farklı çözümü motilitesi elde edilmesinde şüphesiz spermaya katılan glycerin oranı ve kullanılan sulandırıcının etkisi söz konusudur. Ancak, araştırmacıların değerlendirmelerinde esas aldıkları spermatozoonların hareket biçimleri ve farklı motilite değer yarılları da etkili olmuş olabilir.

Çalışmada oluşturulan iki farklı alışımlı ortamının spermatozoa motilitesi üzerine etkisi oldukça farklı (P<0.05) bulunmuştur. En olumlu sonuç (%28.13±1.91) +20 °C de 20 dakikalık alışımlı sağlanmış, her üç glycerin oranında da oda ısısında 20 dakikalık alışımlı dondurmanın üstünlüğü gözlenmiştir.

Benzer bir sonuçta, çalışmada spermatozoa motilitesi yönüyle gruplara ayrılan ejakülatlarda bulun-

Tablo 4. Farklı motilite gruplarından (Kalite) spermaların çözüm motilite değerleri varians analizi.

Table 4. The variance analysis of postthawing motility values of the sperms from different motility groups.

| V.K | S.D. | K.T. | K.O. | F | P |
|---------------|------|---------|--------|------|--------|
| Gene) | 101 | 241.893 | - | - | - |
| G.A. | 17 | 49.413 | 2.906 | 1.28 | P>0.05 |
| GlycerinlerA. | 2 | 2.169 | 1.084 | 0.48 | P>0.05 |
| Alışım lar A. | 1 | 13.980 | 13.98 | 6.16 | P<0.05 |
| Kaliteler A. | 2 | 25.331 | 12.666 | 5,58 | P<0.05 |
| GXA | 2 | 0.210 | 0.105 | 0.05 | P>0.05 |
| GXK | 4 | 6.212 | 1.553 | 0.68 | P>0.05 |
| AXK | 2 | 1.938 | 0.969 | 0.43 | P>0.05 |
| GXAXK | 4 | 0.573 | 0.143 | 0.46 | P0.05 |
| Hata | 84 | 190.644 | 2.270 | - | - |

Tablo 5. Farklı motilite gruplarından (orta, iyi ve çok iyi) spermaların dondurulması ve çözüm motiliteleri.

Table 5. The freezing and postthawing motilities of the sperms from different motility groups.

| Glycerin (%) | Spermatozoa motilitesi (%) | | | | | |
|--------------|----------------------------|---------------|------------|---------------|---------------|-------------|
| | Orta (n=4) | | iyi (n=7) | | Çok iyi (n=6) | |
| | 4°C/150 dak | 20 °C/20 dak. | 4°C/150dak | 20 °C/20 dak. | 4°C/150dak | 20°C/20dak. |
| 5 | 13.7±6.87 | 23.75±7.46 | 22.14±4.61 | 26.43±6.14 | 16.66±4.01 | 26.67±4.77 |
| 8 | 12.5±6.25 | 22.5±11.25 | 27.86±1.87 | 33.57±4.72 | 25.0±1.83 | 33.33±4.21 |
| 10 | 17.5±8.75 | 20.0±7.9 | 25.0±5.73 | 29.28±5.61 | 23.33±4.77 | 30.83±6.38 |

muştur (Tablo 5). Her üç motilite grubunda da çözüm motilitesine en olumlu etki (P<0.05) +20 °C de alışımı yapılan ejakülatlarda gözlenmiş, farklı glycerin oranlarının etkisi olmakla beraber istatistiki olarak önemsiz (P>0.05) bulunmuştur (Tablo 4). Bu grupta en yüksek çözüm motilite değerleri başlangıç motilitesi iyi ve çok iyi olarak değerlendirilen ejakülatların +20 °C de 20 dakikalık alışımalarıyla elde edilmiştir.

Sonuç olarak, insan spermasının dondurulmasında kryoprotektan (glycerin) oranının ve alışım ortamlarının çözüm motilitesine etkili olduğu, en iyi sonucun ise bu çalışmada kullanılan %8'lik glycerin oranı ve +20 °C de 20 dakikalık alışım ile elde edildiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Jahnel F. Ciber die VViederstandföhigkeit von menschlichen Spermatozoen gegenüber starker Kätte. Klin Wschr 1938; 17:1273.
- Polge C, Smith AU, and Parkers AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration in tow temperatures, Nature London 1949; 164:666.
- Keel AB, Webster BW. Semen analysis data from fresh and cryopreserved donor ejaculates: Comparison of cryoprotectants and pregnancy rates, Fertility and Sterility. 1989; 52:1.
- Brown CA, Boone WR, Shapiro SS. Improved cryopreserved semen fecundability in an alternating fresh-frozen artificial insemination program, Fertility and Sterility, 1988; 50:5.
- Vasterling HW. Die künstliche Besamung beim Menschen. In: Paufler SK und Mitautoren: Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Verlag M. und H. Schaper Hannover 1974.
- Shapiro S, Saphire DG, Stone WH. Changes in American AID Practice During the Past Decade, Int J Fertil 1990; 35:284-91.
- Apel G. Motilitüt and Kopfkappenintegritüt von aufgetautem Kaninchensperma im Vater-Söhne-Vergleich, Hannover, Tierärztl. Hochsh Diss 1986.
- Lud wing G, und Frick J. Praxis der Spermatologie, Springer-Verlag, Heideiber New York 1987.
- Wooley DM, und Richardson DW. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing, J Reprod Fertil 1978; 53:389-94.
- Saacke RG, Amman RP and Marshall CE. Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls, J Anim Sei 1968;27:1391-1400.
- Johnson LA. Fertility results using frozen boar spermatozoa, 1 st Int Conf On Deep Freezing of Boar Semen Uppsala Ber 1985; 199-222.
- Ackerman DR. Hyaluronidase In human semen und sperm suspensions subjected to temperatura shock and freezing, J Reprod Fertil 1970; 23:521-3.
- Byrd W, Edman C, Bradshaw K, Odum J, Corr B and Ackerman G. A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor sperm. Fertility and Sterility 1990; 53:521-7.