

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
BİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**ŞİDDETLİ ERKEK KISIRLIĞINA SEBEP OLAN  
MORFOLOJİK SPERM BOZUKLUKLARININ IŞIK  
MİKROSKOBU, HAREKETLİ SPERM ORGANEL  
MORFOLOJİSİ DEĞERLENDİRME (MSOME) VE  
TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM)  
YÖNTEMLERİ İLE İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Ferhat CENGİZ**

EDİRNE – 2010

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
BİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**ŞİDDETLİ ERKEK KISIRLIĞINA SEBEP OLAN  
MORFOLOJİK SPERM BOZUKLUKLARININ IŞIK  
MİKROSKOBU, HAREKETLİ SPERM ORGANEL  
MORFOLOJİSİ DEĞERLENDİRME (MSOME) VE  
TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM)  
YÖNTEMLERİ İLE İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Ferhat CENGİZ**

**Tez No:**

EDİRNE – 2010

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü**

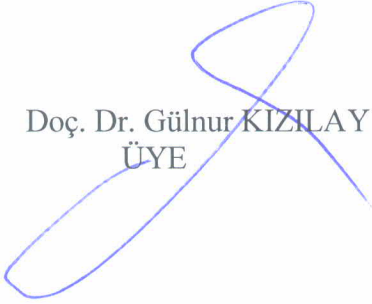
**ONAY**

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Mehmet KANTER danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Ferhat CENGİZ tarafından tez başlığı “Şiddetli Erkek Kısırlığına Sebep Olan Morfolojik Sperm Bozukluklarının Işık Mikroskobu, Hareketli Sperm Organel Morfolojisi Değerlendirme (MSOME) ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Yöntemleri ile İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 19.07.2010 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **“Yüksek Lisans Tezi”** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet KANTER  
JÜRİ BAŞKANI



Doç. Dr. Gülnur KIZILAY  
ÜYE



Yrd. Doç. Tevfik AKTOZ  
ÜYE



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK  
Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÜR

Eđitimim süresince, yetiŐmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakârlığı esirgemeyen aileme minnettarım. ÇalıŐmam süresince beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel katkılar ile desteklerini esirgemeyen değerli danıŐman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet KANTER, araŐtırmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Semra KAHRAMAN, Doç. Dr. Gülnur KIZILAY, Yrd. Doç. Dr. YeŐim Hülya UZ'a en içten teŐekkürlerimi sunarım. ÇalıŐmam esnasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Cevat AKTAŞ, Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŐIR, Melike SAPMAZ METİN, Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ, Mustafa ERBOĐA, Duygu UZUN, Uđur DİLEKÇİ, Ebru KARABULUT, Soner UYSAL ve Memorial Hastanesi Tüp Bebek Laboratuvarı ekibine teŐekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>İNFERTİLİTE</b> .....	3
<b>KADIN KISIRLIĞI</b> .....	4
<b>ERKEK KISIRLIĞI</b> .....	4
<b>SPERMATOGENEZ</b> .....	4
<b>SEMEN ANALİZİ DEĞERLENDİRİLMESİ</b> .....	6
<b>SPERM MORFOLOJİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ</b> .....	7
<b>ERKEK İNFERTİLİTESİNDE SPERM MORFOLOJİSİNİN YERİ</b> .....	11
<b>MSOME İLE SPERM MORFOLOJİSİ İLİŞKİSİ</b> .....	12
<b>TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBU DEĞERLENDİRMESİ</b> .....	13
<b>SPERMİN ULTRASTRÜKTÜREL DEĞERLENDİRMESİ</b> .....	14
<b>NORMAL SPERMİN ULTRASTRÜKTÜREL YAPISI</b> .....	14
<b>SPERMLERİN ULTRASTRÜKTÜREL BOZUKLUKLARI</b> .....	15
<b>ŞİDDETLİ ERKEK KISIRLIĞINA SEBEP OLAN MORFOLOJİK DEFEKTLER</b> 15	
<b>MEGALOHEAD</b> .....	15
<b>GLOBOZOOSPERMİ</b> .....	19
<b>TAİL STUMP</b> .....	22
<b>TOTAL PİNHEAD</b> .....	25
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	28
<b>BULGULAR</b> .....	33

<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>62</b>
<b>SONUÇ .....</b>	<b>67</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>68</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>70</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>72</b>
<b>RESİMLEMELER LİSTESİ.....</b>	<b>80</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>82</b>

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>A°</b>	: Armstrong
<b>AURKC</b>	: Aurora kinase C
<b>AZF</b>	: Azoospermi faktörü
<b>Bkz.</b>	: Bakınız
<b>CASA</b>	: Computer aided sperm analysis, Bilgisayar destekli sperm analizi
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>DFS</b>	: Displasia of fibrous sheath, Fibröz kılıf displazisi
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>DSÖ</b>	: Dünya sağlık örgütü
<b>dk</b>	: Dakika
<b>FISH</b>	: Flourescent in-situ hybridization
<b>GER</b>	: Granüllü endoplazmik retikulum
<b>HBV</b>	: Hepatit B
<b>HCV</b>	: Hepatit C
<b>HTF</b>	: Human tubal fluid, İnsan tubal sıvısı
<b>IVF</b>	: İn vitro fertilizasyon
<b>ICSI</b>	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
<b>IMSI</b>	: Yüksek mikroskopik büyütmeyle seçilmiş sperm mikroenjeksiyonu, Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection
<b>IUI</b>	: İntra uterin inseminasyon

<b>MSOME</b>	: Hareketli sperm organel morfolojisi değerlendirme, Motile sperm organellar morphology examination
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>N</b>	: Nükleotid
<b>OAT</b>	: Oligoastenoteratozoospermia
<b>OsO4</b>	: Osmium tetraoksit
<b>PGD</b>	: İmplantasyon öncesi genetik tanı
<b>TEM</b>	: Transmisyon elektron mikroskobu
<b>TESE</b>	: Testiküler sperm ekstraksiyonu
<b>YÜT</b>	: Yardımcı üreme teknikleri
<b>WHO</b>	: World health organization
<b>µm</b>	: Mikrometre



## GİRİŞ VE AMAÇ

Yetmişli yıllardan itibaren uygulanmaya başlanan in vitro fertilizasyon (IVF) ve 1992'den itibaren uygulanan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemleri erkek infertilitesi başta olmak üzere günümüzde infertilite tedavisinde umut kaynağı olmuştur. Erkek infertilitesine sebep olan parametreler arasında spermelerin sayı ve hareketliliklerinin yanında spermelerin şekil bozuklukları ayrı bir yer teşkil etmektedir. Sperm şekil bozuklukları, erkeklerde infertiliteye yol açan önemli sebeplerinden biridir. Kruger kriterlerine göre değerlendirilmiş sperm morfolojisi fertil ve infertil erkeği belirlemede en önemli parametredir. Spermelerin baş, akrozom, orta-kısım ve kuyruğunda izlenen anomalilerin birçoğu ışık mikroskopuyla tanınabilir. Spermelerin şekil bozuklukları ışık mikroskobu ile ayırımı yapılamadığında veya yapısal özelliklerinin daha ayrıntılı anlaşılabilmesi için elektron mikroskobu ile inceleme yapılması gerekir.

Bu çalışmada şiddetli erkek kısırlığına sebep olan morfolojik sperm bozukluklarından Megalohead (Büyükbaş, makrosefal), Tail stump (Güçük kuyruk, küt kuyruk), Globozoospermi (Round head, yuvarlak baş), Yoğun Pinhead (İğne baş, başsız sperm) anomalilerine sahip spermelerin ışık mikroskobu, hareketli sperm organel morfolojisi değerlendirme (MSOME) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile ince yapı düzeyinde fertil bireylerin spermeleri ile karşılaştırmalı incelenmesi amaçlanmıştır. Fertil erkeklerle kıyaslanan, infertil erkeklerin spermelerinde, fonksiyonel özelliklerini değiştirecek düzeyde belirgin değişiklikler olduğu bilinmektedir. İnce yapı düzeyinde 9+2 mikrotübül yapısı, fibröz kılıf yapısı, akrozom ayırımı, mitokondri mevcudiyeti ve yerleşimleri, semi kantitatif değerlendirmede anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Sperm morfolojisi; üremeye yardımcı tedavi merkezlerinin başarılarını etkileyen önemli bir parametredir. Döllenmede ve embriyo

gelişiminde rol oynadığı bilinen şiddetli erkek kısırlığına sebep olan sperm morfolojilerinin ışık mikroskobu ultrastrüktürel incelemelerinin yapılması tedavi sırasında bize yol gösterici olabilir, sperm anomalileri ile ilgili çalışmalar genişletilip yeni çözümler üretilebilir. Ayrıca hareketli sperm organel morfolojisi değerlendirilmesi yapılarak mikroenjeksiyon işlemi sırasında yüksek büyütmede seçilip kullanılan spermelerin morfolojileri önceden değerlendirilmiş olacak. Böylelikle sperm morfolojisi değerlendirme tekniklerinin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları hakkında bilgi sahibi olabileceğiz.

Çalışmamız; şiddetli erkek kısırlığına sebep olan sperm morfolojilerinin ışık mikroskobu ile rutin morfoloji değerlendirilmesi, elektron mikroskopik incelemeleriyle bu spermelerin ve ultrastrüktürel yapılarının hangi düzeyde etkilendiğine, MSOME yöntemi ile in vitro fertilizasyon, mikroenjeksiyon işlemlerinde sperm seçimi için önceden bilgiler verebilir. Bu çalışma ile üremeye yardımcı tedavi merkezlerinin başarılarını olumsuz yönde etkileyen nedenlerinden biri olan şiddetli erkek kısırlığına sebep olan spermelerin histolojik yapısının araştırılması ve/veya ortaya konulması mümkün olacaktır. Böylelikle bu sperm morfolojilerinin anlaşılması, tedavinin yönlendirilmesi, üremeye yardımcı tedavi merkezlerinin işlem sırasında sperm seçimi ve değerlendirmesi için önceden elde edilecek bilgilerle üremeye yardımcı tedavi tekniklerine yarar sağlamayı amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### İNFERTİLİTE

İnfertilite, bir yıl içinde etkili bir korunma yöntemi kullanılmamasına ve düzenli cinsel ilişki varlığına rağmen çocuk sahibi olunamamasıdır. Sağlıklı çiftlerin yaklaşık % 85 - 90'ında ilk bir yıl içerisinde gebelik gerçekleşmesi beklenir (1). İnfertilite problemi üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 10-15'ini etkileyen bir durumdur (2). Bu oran yılda yaklaşık olarak 2,4 milyon çifte infertilite tanısı konması demektir. Dünyada binlerce çift infertilite tedavisi alabilmek ümidi ile üremeye yardımcı tedavi merkezlerine başvurmaktadır. İnfertilite konusunda klasik yaklaşımlara ek olarak, son yirmi yıl içinde birçok yenilik olmuştur. Bunların başında in vitro fertilizasyon ve diğer yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) gelişmesi yer almaktadır (3). Yardımcı üreme teknikleri, dışıdan alınan oositlerin erkekten alınan spermiler ile laboratuvar ortamında fertilize edilmesi ve elde edilen embriyonun tekrar dışı genital sistemi içine (özellikle uterus veya tuba uterina) yerleştirilmesi ilkesine dayanır. Günümüzde infertil çiftlerin tedavisinde yardımcı üreme tekniklerinden; in vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu en sık kullanılan yöntemlerdir (4). Bu yöntemler erkek infertilitesi başta olmak üzere günümüzde infertilite tedavisinde umut kaynağı olmuştur (5). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) çok merkezli araştırmalarının sonucunda infertilite kliniklerine başvuran çiftlerin infertilite yüzde oranları aşağıdaki şekildedir (6).

İnfertilite Nedenleri	%
Yalnızca kadına bağlı nedenler.....	41
Yalnızca erkeğe bağlı nedenler.....	24
Kadın ve erkeğe birlikte bağlı nedenler.....	24
Nedeni açıklanamayan.....	11

## **KADIN KISIRLIĞI**

Kadınlarda ortaya çıkan infertilitenin başlıca nedenleri; Uterin disfonksiyon, uterin tüplerin tıkanıklığı, anormal servikal mukus, spermelere karşı aşırı duyarlılık gelişimi ve ovulasyon yokluğu şeklindedir (7,8).

## **ERKEK KISIRLIĞI**

Erkek infertilitesi etiyolojik olarak dört grupta sınıflandırılabilir.

- 1- Spermatogenez faktörleri
- 2- Duktal faktörler
- 3- Semen faktörleri
- 4- Koital faktörler

Spermatogenezdeki bozukluklar genetik anomalilere bağlı primer testiküler hastalıklar (Klinefelter veya Down sendromu gibi), gonadal gelişimdeki genital olmayan bozukluklar, nedeni bilinmeyen tübüler veya interstisiyel testiküler lezyonlar, hipotalamik pitüiter testiküler sistemdeki disfonksiyonlar, kriptorşidizm, varikosel, skrotumun dış ortamdaki ısı artışlarına ya da aşırı titreşimlere maruz kalması, otoimmüniteye bağlı orşit, stres, bazı ilaçlar ve radyasyon ile ilişkilidir.

Transportu sağlayan duktuslarda veya yardımcı bezlerdeki malformasyon ya da obstrüksiyon, oligozoospermi ya da azospermiye neden olabilir. Böyle sorunlar konjenital (Vaz deferensin yokluğu ya da ejakülasyon duktusların darlığı), enfeksiyonlardan, prostatitten, ameliyatlardan sonra olabilir. Retrograd ejakülasyon bozuklukları ise diyabetik nöropati, sempatektomi veya sempatik sinirlerde hasara (Retroperitoneal lenf nodu diseksiyonundan sonra sıkça görülebilir) bağlı olabilir.

Koital faktör ya da semenin vajinanın içine aktarılmasındaki sorunlar ise empotans, ejakülasyon yetersizliği, hipospadias, uygunsuz koital teknik, anormal derecede uzun ya da kısa cinsel perhiz süreleri veya kayganlaştırıcı spermisitlerin yanlış kullanımı şeklinde özetlenebilir (9).

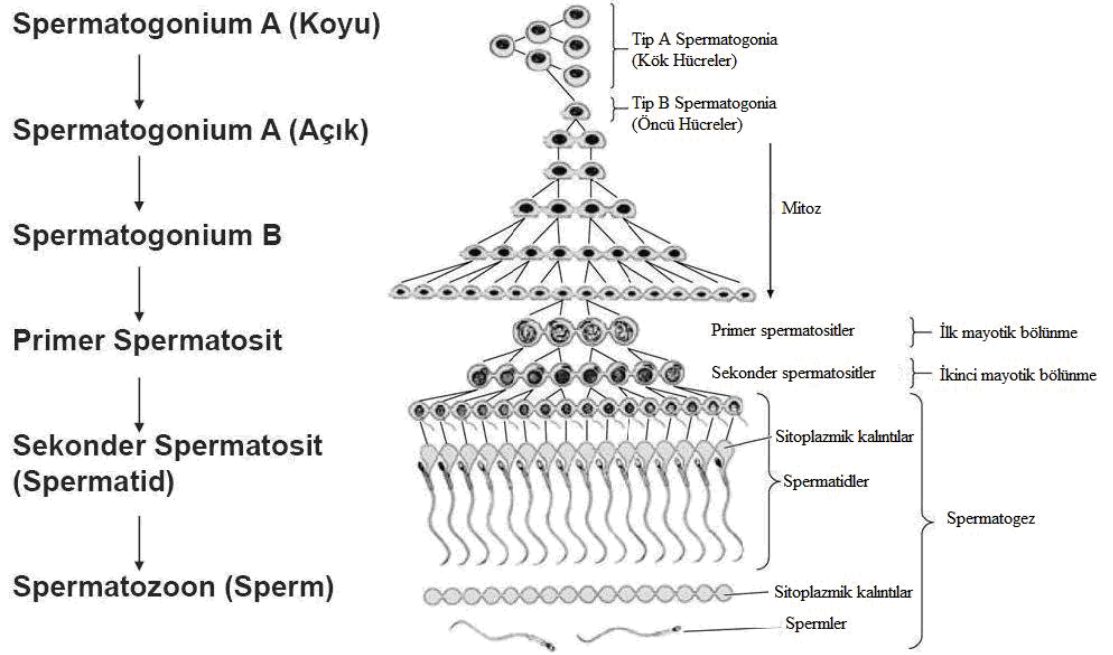
## **SPERMATOGENEZ**

Spermatogenez testisteki seminifer tübüllerde gerçekleşir. Seminifer tübüllerde en bazalde bulunan spermatogonyum hücreleri ana spermatogenik hücreler olup diğer hücreler bunlardan köken alırlar. Ana hücre koyu boyanan spermatogonyum A hücresi olup daha sonra açık tip Spermatogonyum A'ya daha sonrada Spermatogonyum B'ye dönüşür. Bazı hücreler her zaman kaynak hücre olarak kalarak spermatogenezin ömür boyu devam

edebilmesini sağlar.

Spermatogonyum B bir yerde mitoz bölünmeyi keserek mayoz bölünmeye girer ve primer spermatisitleri oluşturur. Seminifer tübüllerde görülebilen en büyük spermatogenik hücreler olmasıyla ayırt edilebilirler. Daha sonra primer spermatisitler mayoz II ye girerek sekonder spermatisitleri (Spermatid) oluşturur. Bu evre çok kısa sürüp hemen olgunlaşma aşamasına geçtikleri için oluşan preparatlarda pek rastlanmaz.

Spermatidler bölünme sırasında kendi aralarındaki ve sertoli hücreleri ile yaptıkları sitoplazmik bağlantıları ancak olgunlaşma evresinde kopartırlar. Bu evrede kuyruk oluşturulur ve fazla sitoplazma atılır. Böylelikle son şeklini almış ancak tam olarak olgunlaşmamış hareketsiz spermiler oluşur (Bkz. Şekil 1), (47).



Şekil 1. Spermatogenez (47)

### Spermiyogenez

Spermatidlerden spermatozoonlar oluşurken meydana gelen değişikliklere spermiyogenez adı verilir. Bu değişiklikler 4 aşamada sıralanır.

**Golgi aşaması:** Granüllü Endoplazmik Retikulum'da (GER) hidrolitik enzimlerin sentezi, golgide akrozom öncesi granüllerin paketlenmesi ve tek bir akrozomal vesikülün oluşumu ve flagellar aksonemin oluşumu bu evrededir.

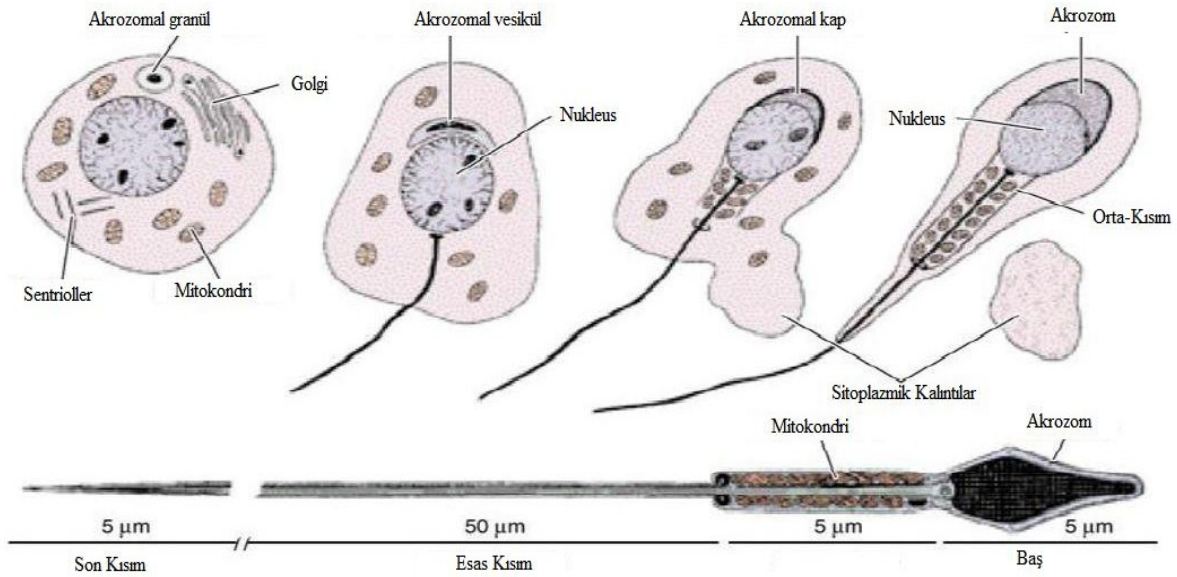
**Kep aşaması:** Akrozomal vesikülün boyutu artar ve en son boyutuna ulaşır akrozom adını alır.

**Akrozomal aşama:** Spermatid morfolojisinde çok sayıda değişiklik karakterizedir. Çekirdek yassılaştır, özel şeklini alır, mitokondriler yer değiştirir ve hücre uzar.

**Maturasyon (olgunlaşma) aşaması:** Spermatid sitoplazmasının atılması ile karakterizedir.

### Spermiasyon

Olgunlaşmasını tamamlayan ve serbestleşen spermin seminifer tübülün lümenine atılması olayıdır (Bkz. Şekil 2), (47).



**Şekil 2. Spermiojeniz (47)**

### SEMEN ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfertilite olgularının yaklaşık yarısı erkeğe bağlı olduğundan, dikkatli ve düzgün yapılacak iyi bir semen analizi değerlendirmesi çok kıymetli bilgi sağlayabilmekte ve tedaviyi yönlendirmektedir. DSÖ tarafından tanımlanan konvansiyonel semen analizinde, volüm, aglütinasyon, pH, sperm olmayan yuvarlak hücre konsantrasyonu gibi parametrelerin yanında, en önemli parametreler, konsantrasyon, motilite ve morfolojidir (6,10).

Sperm konsantrasyonu, total ejakülataın 1 ml'sindeki sperm sayısı olarak tanımlanır. En

popüler sperm sayım kamaraları; hemositometre ve makler kamarasıdır. Makler kamarasında güvenilir bir sonuç için ideal olanı 100 karedeki spermleri saymaktadır. Normal sperm konsantrasyon değeri 20 milyon/ml olarak kabul edilmektedir. Bu değer MacLead ve Gold tarafından yapılan çalışmada fertil erkeklerin sadece %5'inde sperm konsantrasyonunun 20 milyon/ ml'nin altında bulunması sonucunda belirlenmiştir (11).

Sperm motilitesi, ejakülattaki progresif hareketli sperm yüzdesi olarak ileri doğru hareketli sperm veya % 25 ileri doğru hızlı hareketli sperm yüzdesi olarak kabul edilmektedir. Sperm hareketliliği Dünya Sağlık Örgütü tarafından dört sınıfta değerlendirilmektedir.

+ 4: Hızlı ileri progresif hareketli

+ 3: Yavaş doğrusal olmayan hareketli

+ 2: Yerde Hareketli

+ 1: Hareketsiz

Sperm hareketliliği iki şekilde ölçülebilir; manüel veya bilgisayar destekli olarak (CASA: Computer aided sperm analysis, bilgisayar destekli sperm analizi). Sperm konsantrasyonunda olduğu gibi hareketlilik değerlendirmesinde de aynı semen örneğinde dahi elde edilen sonuçlar arasında büyük farklılıklar olması laboratuvar çalışanlarının kişisel tecrübesinden kaynaklanmaktadır. Bu yüzden klinisyen, laboratuvarın daha çok hangi sayım kamarasını tercih ettiğine laboratuvarın fertil popülasyon için hangi referans değerlerini kabul ettiğine dikkat etmelidir. Spermin motilite bozukluğunun çeşitli sebepleri olsa da astenozoospermik pek çok erkekte sebep saptanamamaktadır (12–14).

## **SPERM MORFOLOJİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Son yirmi yılda sperm konsantrasyonu ve motilitesi değerlendirme yöntemlerinde fazla bir ilerleme olmamasına karşın, sperm morfolojisi değerlendirme yöntemlerinde önemli gelişmeler olmuştur. Sperm morfolojisi için geçerli Dünya Sağlık Örgütü kriterleri (14) ve Kruger'in (Tygerberg) kriterleri (16,17) birbirine yakındır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1992'ye ait kriterleri rutin semen değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılır. DSÖ kriterlerine göre değerlendirildiğinde, normal kategoriye giren spermlere sahip hasta sayısının daha fazla olduğu görülmüştür (12,13). Kruger kriterleri, standart IVF şansları düşük ancak ICSI ile fertilizasyon şansları daha yüksek olan çiftlerin saptanması amacıyla kullanılır (16).

Servikal mukus, yalnızca normal morfolojili spermlerin geçmesine izin verici özellikler taşımaktadır. Ancak normal morfolojiye sahip spermler progresif motiliteye sahip olabilmektedirler. Şekil bozukluğu olan spermler ya immotil kalacaklar ya da progresif olmayan hareketliliğe sahip olacaklardır. Morfolojisi bozuk olan bir sperm, en iyi olasılıkla

progresif olmayan hareket yapabilir. Progresif motiliteye yalnızca morfolojik olarak normal veya normale yakın spermeler sahip olabilir. Morales ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda normal morfolojiye sahip spermelerin anormal spermelerden daha çok yüzmelerinden başka daha yüksek dönme, flagellar hareket sıklığı ve flagellar hareket yüksekliğine de sahip olduklarını göstermişlerdir. Sonuç olarak bilinmesi gereken öncelikle sperm morfolojisi düzgün olmalıdır ki sperm hareketliliği ve progresyonu iyi olabilsin (6).

Klinik literatüre dayalı semen parametrelerinin referans değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Bu aralıkların dışındaki değerler erkek infertilitesini akla getirir ve ek klinik ve/veya laboratuvar değerlendirmesini gerektirir. Semen parametreleri için verilen referans değerlerin döllenme için gerekli minimum değerler olmadığı ve semen değerleri bu aralıklarda olmayan erkeklerin de fertil olabileceği unutulmamalıdır. Buna karşın referans değerlere göre normal olan bir erkekte de infertilite görülebilir.

Sperm morfolojisini değerlendirmek, sperm sayısı ve hareketliliğini değerlendirmekten daha fazla sabır ve deneyim gerektirir. Morfolojik değerlendirmede amaç sperm fonksiyonları hakkında in vivo ve in vitro anlamda öngörülerde bulunmak olduğundan, yapılacak değerlendirmede esas alınacak kriterlerin dikkatle seçilmesi gerekecektir (6).

**Tablo 1. Semen analizi referans değerleri (16)**

(En az iki değerlendirmede)	
Ejakülat hacmi	> 2.0 mL
pH	> 7.2
Likefaksiyon	15 dakika
Viskozite	< 2 cm
Sperm konsantrasyonu	> 20 milyon/mL
Total sperm sayısı	> 40 milyon/ejakülat
Motilite yüzdesi (a+b)	> %50 a (İleri hızlı)                      b (İleri yavaş) c (Yerinde hareketli)      d (Hareketsiz)
Normal morfoloji	> %30 normal (DSÖ, 1992) > %14 normal (Kruger katı kriterleri, DSÖ, 1999)
Lökosit	< $1 \times 10^6$ / ml
Vitalite	> %75

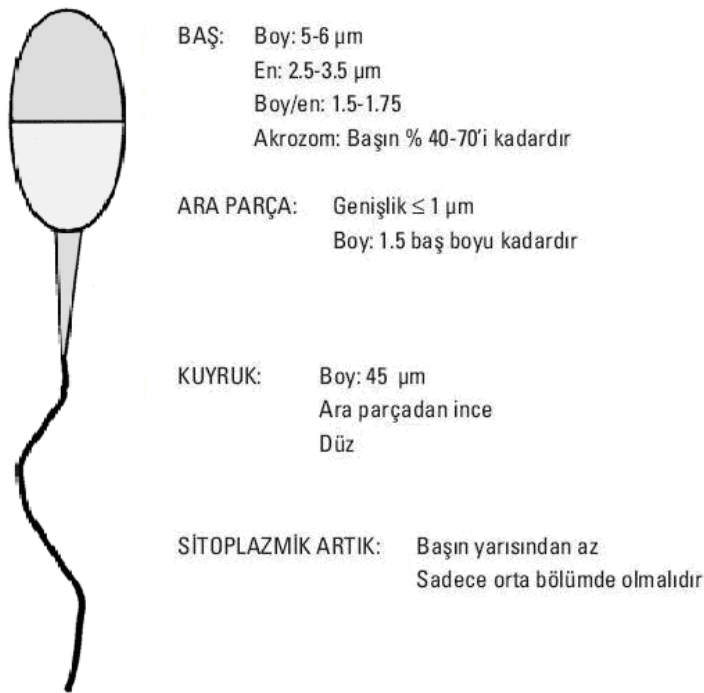


Erkek infertilitesine sebep olan parametreler arasında spermilerin şekilsel bozukluğu ayrı bir yer teşkil etmektedir. Kruger kriterlerine göre değerlendirilmiş sperm morfolojisi fertil ve infertil erkeği belirlemede en önemli parametredir (20). Şekilleri önemli ölçüde farklı olmasa da boyanmış insan spermilerin başları, orijinal semendeki canlı spermilerin başlarından hafifçe daha küçüktürler (21). Spermilerin normal morfolojik değerlerini saptarken kesin kriterler kullanılmalıdır (22).

Bir sperm normal olarak kabul edilebilmesi için sperm başı, boynu, orta kısmı ve kuyruğu normal olmalıdır. Başın şekli oval olmalıdır. Fiksasyon ve boyama etkisinden kaynaklanan hafif azalmayı da hesaba katarak başın boyu 4.0–5.0  $\mu\text{m}$  ve genişliği de 2.5-3.5  $\mu\text{m}$  olmalıdır. Baş boyunun baş genişliğine oranı 1.5 – 1.75 arasında olmalıdır (Bkz. Şekil 3).

Sperm boy ve genişlik değerlendirmesi oküler bir mikrometre ile yapılır. Baş bölgesinin %40-70'ini kapsayan iyi belirlenmiş bir akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım ince uzun ve genişliği 1  $\mu\text{m}$ 'den az, boyu baş uzunluğunun 1.5 katı ve başa aksiyel olarak bağlanmış olmalıdır. Sitoplazmik artıklar normal baş alanının yarısından az olmalıdır. Kuyruk düz, düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 45  $\mu\text{m}$  uzunlukta olmalıdır.

Bu sınıflandırma şemasına göre bütün sınırdaki şekiller anormal kabul edilir (14, 23). Bu sınıflandırma kriterlerini kullanarak in vitro şartlarda fertilizasyonu öngören sperm morfoloji değerleri bulunur (24–26).



**Şekil 3. Krugerin kesin kriterlerine göre normal sperm (23)**

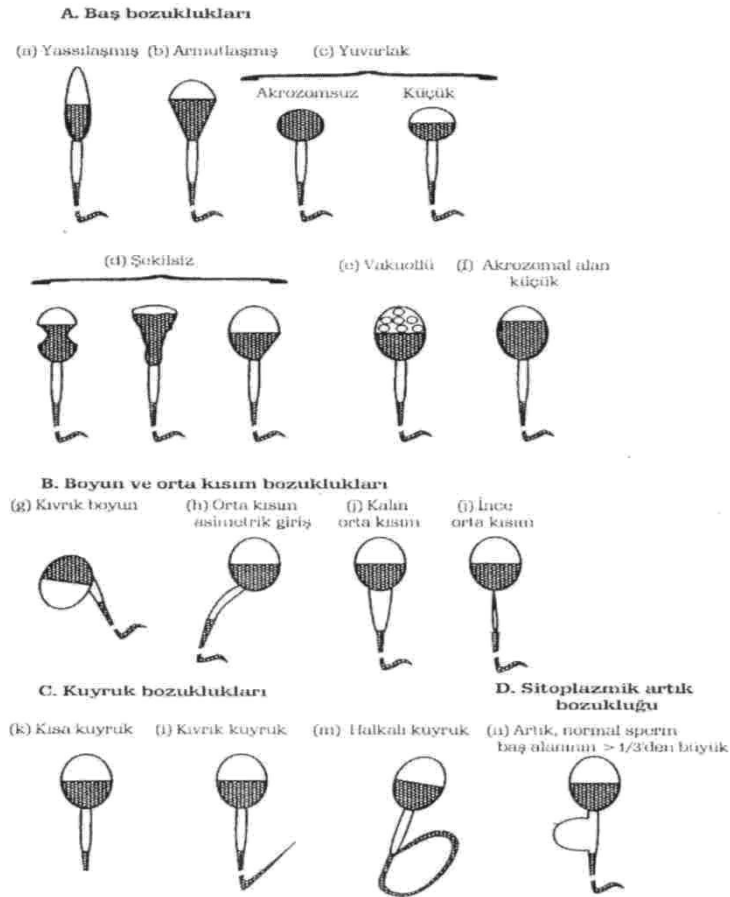
Morfoloji değerlendirmesi yaparken aşağıdaki morfolojik defekt sınıflandırma kategorileri dikkate alınmalıdır (Bkz. Şekil 4), (27).

### Baş Defektleri

Baş defektleri sırasıyla geniş, küçük, yassı, armutlaşmış, yuvarlak, şekilsiz başlar; vakuollü başlar (baş alanının %20'den fazlası boyanmamış vakuoler alanlarla kaplı). Küçük akrozomal bölge içeren başlar (baş alanının %40'ından azı) ve çift başlılar veya bunların herhangi bir kombinasyonu şeklindedir.

### Boyun ve Orta Kısım Defektleri

Boyun ve orta kısım defektleri sırasıyla kırık boyun (boyun ve kuyruk başın uzun eksenine 90°den büyük bir açı yapması), orta kısmın başa asimetrik girişi, kalın ve şekilsiz orta kısım, anormal derecede ince orta kısım (hiç mitokondrial kılıf yok) veya bunların herhangi bir kombinasyonu şeklindedir.



Şekil 4. İnsan spermatozoonlarının bazı anormal şekillerinin şematik çizimleri (14)

### **Kuyruk Defektleri**

Kuyruk defektleri sırasıyla kısa, birden çok, u-şeklinde kıvrık, kırık veya bükük kuyruklar ( $>90^\circ$ ). Düzensiz genişlikte kuyruklar, halkalı kuyruklar veya bunların herhangi bir kombinasyonu şeklindedir.

### **Sitoplazmik Artıklar**

Normal bir sperm baş alanının 1/3'den büyük olan sitoplazmik kalıntılar anomali olarak değerlendirilir. Genelde orta kısmın etrafında bulunur.

Sadece kuyruğu olan spermiler ayrımsal bir morfoloji sayımı içinde değerlendirilirler. Kopuk veya serbest sperm başları sperm olarak kabul edilemezler fakat ayrıca kayıt edilebilirler. Halkalı kuyruklar, düşük sperm motilitesi ile ilgili olabilir veya spermilerin hipoozmotik bir strese maruz kaldıklarını gösterebilir (Bkz. Şekil 4), (27).

### **ERKEK İNFERTİLİTESİNDE SPERM MORFOLOJİSİNİN YERİ**

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesindeki problem spermilerin çok şekilli ve farklı morfolojik şekillerde olabilmeleridir. Işık mikroskopisi ile yapılan incelemeler ancak sınırlı bilgi verebilmektedir. Elektron mikroskopisi ile yapılan incelemeler ise, hiç şüphe edilmeyen ve ince yapı düzeyindeki bozuklukları bile ortaya çıkarılabilmektedir. Sperm analizine ait sonuçlar ve sınır (cut-off) değerler normal sperm morfolojisine ait kriterlere dayandırılarak yapılmaktadır. Sperm başına ait ciddi anomalileri olan hastalarda, dölleme sağlanabilse bile gebeliğin başarılı bir şekilde devamı ve canlı doğum ihtimali düşüktür. ICSI'deki başarı şansının ise sperm analizi veya sperm morfolojisi ile ilgisi şüphelidir. Sperm decondansasyon defektleri ve DNA anomalileri, sperm morfolojisinden bağımsız olarak sperm dölleme kapasitesini etkileyen esas faktörler olabilir (29).

Anormal başa sahip spermilerden gelişen embriyoların normal bir gebelik olarak devam etme potansiyelleri düşük bulunmuştur. Teratozoospermi ile daha az ciddi erkek infertilitesi formları karşılaştırıldığında, ICSI sonrasında fertilizasyon ve gebelik oranları açısından belirgin bir fark izlenmemektedir. Oligoastenoteratozoosperminin (OAT) en ciddi formlarından elde edilen spermelerde de, daha hafif erkek infertilite formlarından elde edilen gebelik oranlarına ulaşılabilir ve bu oranlar normal sperme sahip ve konvansiyonel IVF programlarından elde edilen gebelik oranlarından farklı değildir. Motilite, morfoloji veya sayıya ait en ciddi problemler bile ICSI sonrası gebelik oranlarını etkilememektedir. ICSI'deki fertilizasyon başarısızlığı sperm morfolojik bozukluğundan değil, kötü oosit kalitesi veya canlı olmayan sperm nedeni ile olmaktadır (15).

Herhangi anormal bir sperm morfolojisinin neden olduğu, şiddetli teratozoosperminin sonuçlarından biri, fertilizasyon başarısızlığıdır. İmplantasyon ve devam eden gebelik oranlarının, düşük olmasına rağmen ICSI, morfolojik olarak tamamen anormal sperm hücrelerinde tek tedavi biçimi olmaktadır (18). Gebelik oluşumunu sistematik bir şekilde düşünerek, infertilitenin değerlendirilmesinde ve buna yönelik tedavinin düzenlenmesinde bir algoritma planlanabilir (29).

Erkek infertilitesi, infertil çiftlerin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Bunların %30-50'sinde de etioloji saptanamamaktadır. Bu kişilere özel klinik testler prensip olarak erkek infertilitesinin nedeninin tanımlanmasında tedaviyi yönlendirebilecekse yapılmalıdır (10).

### **MSOME VE SPERM MORFOLOJİSİ İLE İLİŞKİSİ**

Sperm morfolojisi, doğal dölllenme, intrauterin inseminasyon (IUI) ve geleneksel in vitro fertilizasyon sonucunu önceden tahmin etmenin en iyi yolu olarak bilinmektedir. Diğer taraftan şiddetli teratozoospermi, globozoospermi ve megalohhead vakalarında düşük fertilizasyon, gebelik ve implantasyon oranları bildirilmiş olmakla birlikte, düşük sperm kalitesi konusunda araştırma yapan yazarların büyük çoğunluğu, sperm morfolojisi ve IVF-ICSI başarısının arasında herhangi bir ilişkiyi not etmemişlerdir. Bu durumu açıklamaya yönelik 4 farklı görüş ileri sürülmüştür.

İlk olarak, morfolojik olarak normal sperm hücrelerinin, ICSI prosedürü ile pas geçilen, dişi üreme sistemindeki engellerden ve zona pellucidadan başarılı geçişi gereklidir.

İkinci olarak, şiddetli anormal baş şekline sahip sperm hücreleri (Yuvarlak, büyük veya tapered) genellikle mikroenjeksiyondan önce embriyolog tarafından elenir.

Üçüncü olarak, orijinal menideki rastgele hücrelerden veya hareketli hücreler üzerinden gerçekleştirilen sperm morfoloji değerlendirmesi, özellikle düşük mikroskop büyütmesi altında seçildiğinde, yumurtaya enjekte edilen tek bir spermin morfolojik kalitesi hakkında yeterli bilgi vermeyebilir.

Dördüncü olarak, ICSI sonucunu etkileyebilecek bazı sperm organel bozuklukları morfolojik tarafından 1000x büyütmede veya embriyolog tarafından 200x-400x büyütmede tesbit edilemeyebilir (37).

Bartoov ve arkadaşları tarafından bu son hipotezi test etmek amacıyla, gerçek zamanlı hareketli sperm hücrelerinin ayrıntılı morfolojik değerlendirmesine yönelik yeni bir metod geliştirmişlerdir. Hareketli sperm organel morfolojisi değerlendirme (MSOME – Hareketli Sperm Organeller Morphology Examination) olarak tanımlanan bu metod, invert ışık mikroskopunda dijital görüntüleme ile 6300x – 8050x büyütme elde edebilmek için arttırılan

yüksek güçte Nomarski optik donanımı ile gerçekleştirilir (36). Bartoov ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, MSOME karakteristikleri ve ICSI sonuçları arasındaki ilişkiyi değerlendirmiş ve vakuollü sperm mikroenjeksiyonun, erken abort ve düşük gebelik oranları ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir (38).

Yüksek mikroskopik büyütmeyle seçilmiş sperm mikroenjeksiyonu (IMSI-Intracytoplasmic Morphologically-selected Sperm Injection), MSOME tekniğinin sperm seçimi yapıldıktan sonra mikroenjeksiyon işleminin yapılmasıdır. IMSI tekniği ile ilgili yapılan detaylı araştırmalarda gebelik oranlarını ve implantasyon oranlarını yükselttiğine, abort oranlarını düşürdüğü gösterilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda fertilizasyon oranlarını etkilemediği, en yüksek kalitede embriyo elde etme oranlarını ve blastosist formunda kaliteyi yükselttiği çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda; sperm başı içerisindeki genetik materyali içeren nükleus kısmında bulunan vakuoller, DNA yapısında hasar bulunabileceği konusunda ipucu vermektedir. Sperm DNA yapısındaki hasarlar, dölleme başarısızlığı, embriyo gelişiminin durması, kötü ve/veya yavaş embriyo gelişimi gibi problemlere sebep olabilmekte, dolayısıyla gebelik şansını olumsuz etkilemektedir.

Özellikle şiddetli erkek faktörü olan vakalarda, tekrarlayan tüp bebek başarısızlığında ve nedeni izah edilemeyen infertilite durumlarında, sperm rolünü anlamaya ve uygun yapıdaki spermelerin seçilmesine olanak veren IMSI sistemi; blastosist evresine ulaşabilecek iyi embriyoların gelişimine de imkan vermesi yönünden bu alandaki yeni ve önemli gelişmelerden birisidir (39–45).

## **TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBU DEĞERLENDİRMESİ**

Işık mikroskopunda ayrıntılı görüntü en yakın 2 noktayı ayırdetme (rezolüsyon) ve büyütme (magnifikasyon) ile birlikte sağlanmaktadır. Işık mikroskopuyla daha detaylı incelemek amacıyla yapılan büyütme arttırılması rezolüsyonu azaltacağından, incelenen doku ve örneğin ayrıntıları iyi seçilemez. Beyaz ışığın dalga boyu uzun olduğundan dolayı yüksek büyütmele incelenen doku ve örneğin görüntüsü net görülmez. Elektron mikroskopunda elde edilen görüntüler, elektron ışınlarıyla sağlanır. Elektron titreşimlerinin dalga boyları küçük ( $\approx 0.05 \text{ \AA}$ ) olduğundan mikroskopun çözümüme gücü fazladır. Bu nedenle elektron mikroskopunda canlı ve cansız materyallerin ince yapılarını incelemek mümkün olmaktadır. 1950 yılından beri moleküler ve makromoleküler seviyede hücrelerin ince yapılarını transmisyon elektron mikroskopu ile incelenmektedir (47).

## SPERMİN ULTRASTRÜKTÜREL DEĞERLENDİRMESİ

Spermin ultrastrüktürel incelemesi elektron mikroskopisi ile yapılır. Işık mikroskopunda, bükülme ya da kıvrılma gibi belirgin kuyruk anomalileri ile akrozom yokluğu tanımlanabilir. Mitokondri, dış yoğun fibriller ya da mikrotübüllere ait anomalilerin tesbitin de ise elektron mikroskopi değerlendirmesi gerekir. Böyle defektler genellikle ileri derecede motilite azalması ya da hiç motilite olmaması ile sonuçlanır. Bu olgularda sperm canlılık testleri yapılmalıdır. Böylece ölü spermler canlı fakat hareketsiz spermlerden ayırt edileceklerdir. Işık mikroskobu ile sperm morfolojisi açıkça normal bulunan ama in vitro fertilizasyonda izah edilemeyen başarısızlık gözlenen olgularda da ultrastrüktürel anomaliler saptanmıştır. Canlılığı oldukça yüksek olmasına rağmen motilitesi çok düşük semen örneği bulunan hastalarda ya da bazı izah edilemeyen infertilite olgularında elektron mikroskopisi istenilebilir (19, 48).

## NORMAL SPERMİN ULTRASTRÜKTÜREL YAPISI

Elektron mikroskopunda spermin ultrastrüktürel yapısı değerlendirilirken aşağıdaki değerlendirmelere dikkat edilmelidir. Esas parça, sperm hücresi kuyruğunda devam eder. Tüm sperm hücresi, plasmalemma tarafından sarılıdır. Akrozom, spermatidin golgi aygıtından oluşur. Akrozom fertilizasyon için önemli bir rolü oynayan akrozomal proteinaz olan akrozini içerir. Orta parçanın eksenini, merkezden uzak sentriolden ortaya çıkan kuyruğu oluşturur. Kuyruk, dokuz çevresel mikrotübül çifti ve iki merkezi mikrotübülden oluşur ( $9 \times 2 + 2$  yapısı). Normal bir spermin ultrastrüktürel yapısı Şekil 5'te tanımlanmıştır (49).

I = Sperm, Baş Bölgesi

- 1 Nükleer vesikül
- 2 Akrozom
- 3 Nükleus
- 4 Akrozom sonrası bölge

II = Sperm, Boyun Bölgesi

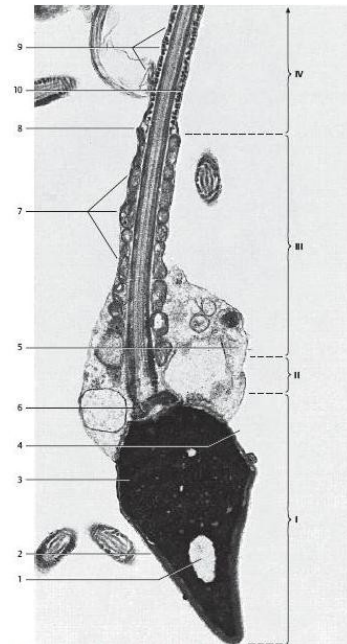
- 5 Sitoplazmik droplet
- 6 Bağlantı kısmı, başla aynı düzlemde

III = Sperm, Orta Kısım

- 7 Mitokondri kılıfı
- 8 Halka

IV = Sperm, Esas Parça

- 9 Fibröz kılıf
- 10 Aksonem



Şekil 5. Sağlıklı erkeğe ait ejakülat spermi, elektron mikroskop büyütmesi  $\times 17000$ , (49)

Normal sperm tanımlanırken kullanılan seçilmiş ultrastrüktürel karakteristik özellikler aşağıda sıralanmıştır;

- Sperm tek ve plazma membranı tam olmalıdır.
- Sitoplazmik kalıntı olmamalıdır.
- Akrozomal kep devamlı ve normal pozisyonda, normal şekilli, normal boyutlarda, yoğun içerikli olmalıdır.
- Nükleus normal şekilli olmalı ve olgun kromatinli olmalıdır.
- Mitokondri normal şekilli ve düzgün yerleşimli olmalıdır.
- Dineyn kolları, dış yoğun fibriller, fibröz kılıf yapısı ve aksonemal yapı normal olmalıdır. Mikrotübüllerde 9+2 yapısı mevcut olmalı şeklinde tanımlanmıştır (50).

### **SPERMLERİN ULTRASTRÜKTÜREL BOZUKLUKLARI**

Spermin ultrastrüktürel bozuklukları elektron mikroskopisi ile tanımlanabilir. Dış-yoğun fibriller, mikrotübüller ve mitokondrideki defektler bu incelemeyle ortaya konulabilir. Aksonemin en yaygın karşılaşılan bozukluğu mikrotübül ve ilişkili yapıların sayı anomalileridir. Böylece, standart 9 + 2 mikrotübül yapısından sapmalar hareketsiz sperm ile sonuçlanabilir. Glozoospermi, megalohhead ve pinhead anomalilerine sahip spermelerinde ultrastrüktürel bozuklukları tesbit edilmiştir (51–56).

### **ŞİDDETLİ ERKEK KISIRLIĞINA SEBEP OLAN MORFOLOJİK DEFEKTLER**

Şiddetli erkek kısırlığına sebep olan morfolojik defektler; megalohhead, globozoospermi, tail-stump ve total pinhead şeklindedir. Bu spermelerin ortak sonuçları olarak düşük fertilizasyon oranları, kötü ve/veya yavaş embriyo gelişimi, yüksek anoploidi oranları, düşük implantasyon ve düşük gebelik oranları elde edilmektedir (57).

### **MEGALOHEAD**

Megalohhead anomalisi ilk kez Nistal ve arkadaşları tarafından 1977’de tanımlanmıştır. Teratozoospermi olarak isimlendirilen şekil bozukluklarının çok özel bir türü olarak, megalohhead düşük hareketliliğe sahip spermin varlığı, değişken sayıda kuyruk yapısı, düzensiz büyük boyutlu kafaların varlığı ile karakterizedir. Ayrıca kromozomal anomaliler ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Megalohhead ve bazı özel anomalilere (Globozoospermi, tail stump) sahip hastaların hala infertilite tedavisinde düşük fertilizasyon oranları, kötü embriyo gelişimi, düşük implantasyon ve gebelik oranları ile tüp bebek merkezlerinin başarısını

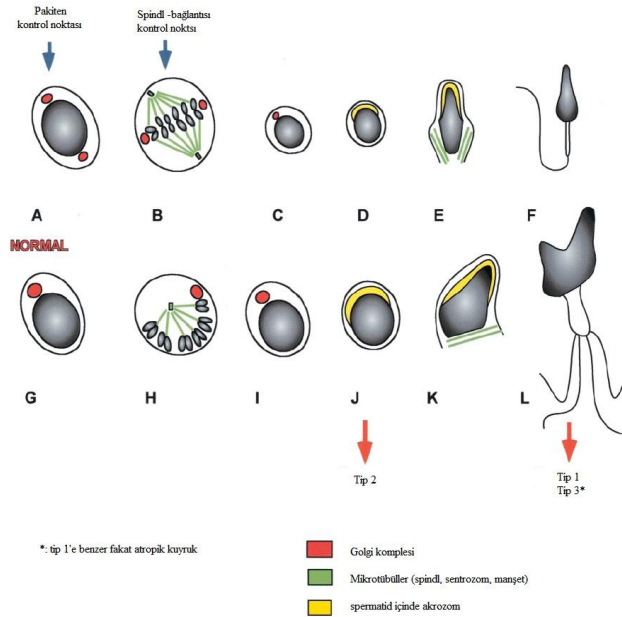
önemli oranda düşürmektedir (57).

Megalohead sendromu olan erkeklerde genellikle ağır infertilite karşılaşılr ve ICSI bu sorunu aşmak için tek yaklaşımdır. Megalohead sendromuna sahip Ejakülata sık sık pinhead anomalisine sahip spermier eşlik ederken, anormal sperm morfolojili spermier (yuvarlak, amorf, düzensiz kafa şekli, kuyruk defektleri) çeşitli yüzdelerle eşlik eder (57–62).

Mayoz bölünme defektlerinden kaynaklanan megalohead sendromunun 3 tipi tanımlanmıştır;

Tip 1’de standart büyük başlı ve çok kuyruklu yapıdır. Mikrotübül ve manşet organizasyonundaki bozukluk nedeniyle baş şekli düzensizdir. Tip 2’de pakiten aşamasında golgi bölünmesinin gerçekleşmediği, Metafaz I’de aşamasında gelişimi durmuş formlardır. Spermioenez devam ederek büyük ve round bir baş oluşturur. Tip 3’ün oluşum mekanizması tip 1 ile aynı fakat aksonem gelişimi ve aksonemal yapıların düzeninde de bozukluk vardır (Bkz. Şekil 6).

Sperm FISH (flourescent in-situ hybridization) incelemelerinde en yüksek anomali saptanan gruptur (%45–55). Bu formları içeren sperm örneklerinde normal görünümlü spermierde de anomali oranının yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu anomalinin baskın olduğu örneklerde aynı zamanda sperm sayısı, hareketliliği ve canlılığının da düşük olması nedeniyle yeterli sperm elde edilebilmesi için cerrahi yola başvurulması gerekebilmektedir (66).



**Şekil 6. Megalohead oluşum mekanizmaları (66)**

Ayrıca bu hastaların sperm örneklerinde bozuk akrozomlu spermier veya akrozomsuz spermier de görülebilir. Diğer eşlik eden bozukluklar arasında; pinhead sperm çok sıklıkla



megalohead sperm örneklerinde bulunabilir. Muhtemelen, pinhead spermilerin kafaları sertoli hücreleri, epididimal hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirken kuyrukları fagosite edilemez. Megalohead sperm örneklerinde, en önemli morfolojik belirtiler kuyrukları olmayan çok sayıda sperm başına sahip sperm ve ejakülatta veya testiküler sperm ekstraksiyon solüsyonlarında bol miktarda olgunlaşmamış spermatidler bulunmasıdır. Bu yüzden, megalohead sperm birçok anormal formlarının varlığı birlikte genotipte ve spermatogenezdeki hatalar ile ilişkili gösterir. İlginçtir ki megalohead sperm örneklerinde sperm canlılığını büyük ölçüde düşüktür. Testis örneklerinde bile, düşük canlılık görülmektedir (61).

### **Megalohead Sperm Sendromu İle İlgili Olan Bozukluklar**

Yapılan çalışmalara göre, spermatogenezin erken aşamalarındaki kusurları, yani mayoz bölünme eksiklikleri insan megalohead spermelerinde bir diğerinin aynısı kromozomal yapıların yanında (65, 66) sitokinezdeki kayıplar, büyük başlı sperm için yüksek oranda triploidi çıkmasına neden olabilir (62,67).

Ortaya çıkan kusurlara bağlı olarak, megalohead sperm Tip I ve Tip II olarak iki fenotipte sınıflandırılabilir. Tip I fenotipteki megalohead sperm iki mayoz bölünme geçiremeyen germ hücresinden köken aldığı ve bu hücrelerin genellikle spermiogenezin ilerlememesinden ötürü, bu tip sperm tetraploid (4N) kromozomal içerik ile ilişkili ve kuyruğu olmayan bir yuvarlak baş olur. Tip 2 fenotip sonuçlarından mayoz bölünme yetmezliği, spermiogenezin spermatid aşamasında durması nedeniyle ve bu aşamada kuyruğu olmayan makronükleer spermatidler ortaya çıkar (66). Bununla birlikte, bazı hastalarda, spermatid farklılaşması bazen tamamlanabilir. Bu örneklerin sonuçlarından mayoz bölünme ve spermiogenezin duraklaması, bir veya daha fazla kuyruklu sperm ile diploid/ veya tetraploid kromozom içeriğine neden olabileceği belirtilmiştir (68–70).

Megalohead spermelerde, golgi kısmının bozukluğu ve nükleer içeriğin bozulması, sentrozom çoğaltılması veya ayrılmasındaki hatalar, monopolar mikrotübül çifti ve tek taraflı mikrotübül manşet oluşumu mayotik hatalarla birlikte oluşur (66). Megalohead spermelerin belirgin özelliği sonunda, bir kenarında tek taraflı manşet varlığı, bununla birlikte dev bir nükleus ve akrozomal şekil düzensizliği gibi bazı kuyrukların nükleusa bağlantı pozisyonunda yetersizliğe de sebep olur (70). Bunun dışında mayoz bölünmenin pakiten aşamasındaki hatalar, büyümüş kafa boyutu ve normal sperm sayısını açıklar. Bu kontrol noktaları spermatogenezdeki anormalileri seçerek daha sonra tüm süreçleri geciktirirken ve anormal

spermlerin apoptoza girmelerinden de sorumludur. Perotti, Giorgia, Chemes ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda ilk olarak sperm hücrelerinin bağlayan orta parçasının, bağımsız olarak olgunlaşmamış spermatidlerde nükleustan geliştirdiğini göstermişlerdir ve oradaki göç mekanizmasında veya kuyruğun yerleşmesindeki bir kusur pinhead anomalisiyle ilişkin olabildiği veya başların kuyruk olmadan oluşturduğunu öne sürülmüştür (71,72)

Chemes ve arkadaşlarının görüşlerine göre pinhead sperm kuyruğun çekirdeğin kaudal kutbuna, hareket mekanizmasında olan bozukluktan yada implantasyon fossası, bazal kısmın oluşumunu etkileyen nükleus bozukluğundan kaynaklanıyor (73). Her iki durumda da, çekirdek ve kuyruk spermatid sitoplazması içinde ayrı olarak gelişiyor ve spermiogenezin sonunda ayrılıyorlar. Bu yüzden başlar sertoli hücreleri, epididimal hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite ediliyor ama kuyruklar kalıyor. Kahraman ve arkadaşlarının çalışmalarında bulunan kafasız bir çok kuyruk ve özellikle megalohhead semen örneklerinde kuyruksuz bir çok kafanın bulunmasını açıklayabiliyor. Hem semen, hem de hastaların testiküler örneklerinde anormal kafalı sperm örnekleri bulunmuştur (61).

### **Megalohead Spermin Genetik Kökeni**

Kahraman ve arkadaşlarının çalışmalarında megalohhead sendromu olan 17 hastanın sonuçları analiz edilmiş, hastaların yarısında ailevi megalohhead sendromu vakalarının görülmesi kuvvetli şekilde megalohhead sperm sendromunun genetik kökenli olabileceğini ve bir sonraki kuşağa geçebileceği belirtilmiştir (61). Benzachen ve arkadaşları bir çok kısırlık vakası ve prenatal ölüm vakası olan ailevi geçmişe sahip şiddetli teratozoospermia vakasını rapor etmişler. Bu hastalarda sperm kromozom analizi %100 poliploidi olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, ailenin başka bireyleri arasında kısırlık geçmişi olması, morfolojik sperm defektlerinin yüksek oranda kromozomal anormallikle ilişkili olması spermatogenez bozukluklarının genetik kökenli olması ile ilişkilendirilebilir (74).

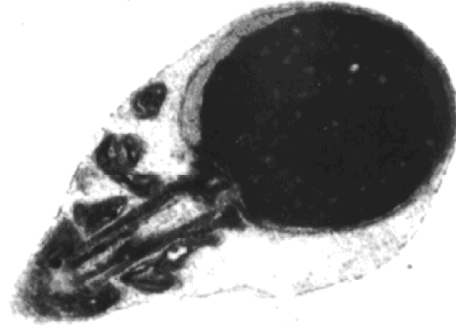
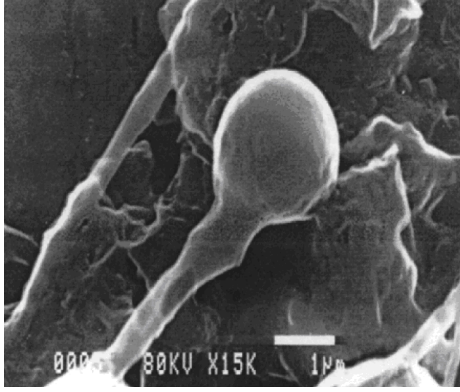
Ailevi geçmişi olan vakalardan başka, hayvan deneylerinde spermatogenezin mayotik evresindeki genetik bazı bozuklukları tesbit etmiştir. Mayotik bozukluklardan kaynaklanan anomaliler daha çok *Drosophila*'nın infertil mutantları üzerinde çalışılmıştır. Mayotik iplikçiklerde olan fonksiyonel bozukluğu olan mutant tipinde poliplodisi olan spermatidler analiz edilmiştir. Bir başka mutasyon kısmi iplik aktivitesi sonucunda ortaya çıkan çok çekirdekli spermatide sebep oluyor. Fare modellerinde şimdiye kadar, direk veya indirek olarak mayotik bölünmede rolü olan genin 120 knock-out (genin silinmesi) faresi, 17 inaktiveleştirilmiş gen dahil, spermatogeneze bağlı infertiliteyi araştırmak için yapılmıştır.

Mutant hayvanlardan gelen mayozda rol alan faktörler bilgisi sayesinde mayotik bölünmedeki bozukluklar sonucunda ortaya çıkan insan sperm fenotiplerinin mekanizmalarını taklit etmemize imkan veriyor (75-81).

Yakın zamana kadar spermatogenezde etkili olduğuna inanılan aday genler ve insanlarda mayotik bozukluklara sebep olan mutasyonlar üzerindeki çalışmalar sonuç vermemiştir. Dieterich ve arkadaşları tarafından 2007’de yapılan çalışmada spermin kafa ölçüsünün büyümesine sebep olan aday geni ortaya çıkardılar. Megalohead sperm sendromu olan 10 infertil erkek hasta analiz edilmişler. Bu hastaların hepsinde aurora kinase C (AURKC) geninde 3. eksonda homozigot sitozin delesyonu tesbit edilmiştir. AURKC hücre periyodunda bulunan bir serin/threonin kinazıdır ve testiste yüksek oranda salgılanmaktadır. Aynı zamanda sitokinez, mitoz ve mayozda da rolü var. AURKC salgısı mayozla sınırlanmış gibi gözüküyor. Bunun yanısıra çalışma AURKC’deki mutasyon protein sentezinin tamamlanmadan durmasına yol açarak kinaz domain olmayan kesik bir proteinin oluşmasına sebep olduğunu tesbit ediyor. 5 AURKC mutasyonu taşıyan hastanın 3-renkli FISH (kromozom 18, x ve Y) analizi sonucunda analiz edilmiş spermın sadece 8%’inin haploid içeriğe sahip olduğu ortaya çıkıyor. AURKC’deki mutasyonun aktif olmayan protein üretimine sebep olarak aynı zamanda kromozomal segregasyon ve buna ilişkin sitokinez bozukluğuna, dolayısıyla büyük kafalı, çok kuyruklu poliploid spermın üretimine sebep olduğu bildirilmiştir (46).

### **GLOBOZOOSPERMİ**

Globozoospermi akrozomun tamamen yokluğu, sperm orta bölgesinin bozukluğu, zona’ya bağlanamama ve infertilite ile ortaya çıkan, henüz genetik nedeni tam olarak belirlenememiş nadir görülen bir durumdur (82). Androloji kliniğinde incelenen hastaların %0,1’inde akrozomal yapıların tamamen yokluğu saptanmaktadır (83). Globozoospermi ilk defa 1965 yılında Myhöfer tarafından ortaya konuldu (84). Daha sonra Schirren ve Holstein grubunun 1971 ve 1973 yıllarında yayınladıkları iki makale ile bu yuvarlak başlı spermlerdeki akrozom yokluğu tanımlanmıştır (85,86). Spermiogenez sırasında golgi cisimciğinden gelişen akrozomal vesikül oluşamaz ve bu nedenle ‘küresel (globe)’ şeklinde sperm başları görülür.



**Şekil 7, 8. Globozoosperminin elektron mikroskopi görünüşleri (95)**

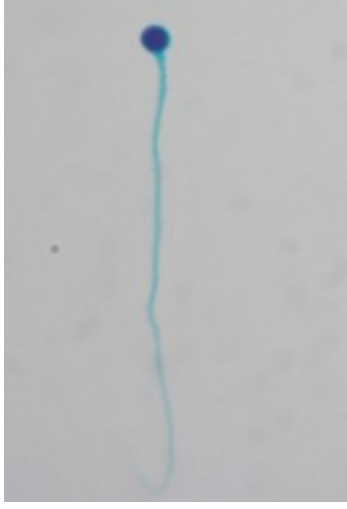
Küre şeklindeki sperm başı ile beraber büyük vakuoller içeren anormal şekilli nükleus mevcuttur. Kromatin sferik bir yapıda yayılmakta ve etrafında değişen oranlarda bir sitoplazma ile çevrilmiştir. Sperm orta bölgesi ve kuyruğunda da yapısal anomaliler gözlenmekte ve genellikle beraberinde mitokondrinin de anormal olduğu belirtilmektedir. Akrozom yokluğunun sebepleri konusunda farklı görüşler mevcuttur. Akrozomun nükleustan ayrı geliştiği ve artık sitoplazma ile birlikte sertoli hücresi içinde kaldığı gösterilmiştir. Kaudal manşet yokluğu ve Calisin proteinin yokluğu yuvarlak baş yapısına sebep olan iskelet problemleri olarak gösterilmiştir (87–89). Şekil 7 ve 8’de globozoospermi’nin elektron mikroskopik fotoğrafları gösterilmiştir (95). Bu hastalarda semen analizi, konsantrasyon ve motilite yönünden normaldir. Ejakülatta gözlenen spermelerin akrozomları bulunmayacağı için, yuvarlak başlı olarak izlenirler. Normal sperm analizi bulunan erkeklerde çok nadiren böyle spermeler de gözlenebilir (28).

Tanı morfolojik değerlendirme ile konulur. Çok nadir görülen bir patoloji olması nedeniyle deneyimli bir andrologun konsültasyonu ile bu hastalar saptanabilmektedir. Her ne kadar, “total globozoospermide tek şans ICSI’dir” dense de, sperm morfolojisinin ICSI sonrası fertilizasyon oranlarını etkilediği patolojidir (15).

### **GLOBOZOOSPERMİ’DE ULTRASTRÜKTÜREL ARAŞTIRMALAR**

Globozoospermi’nin iki alt tipi tanımlanmıştır (90). Tip I akrozom; akrozom içeriğinin tamamen yokluğunu ifade eder. Hastalığın klasik formu olup, spermın insan oositini fertilize etme yeteneği bulunmaz (28). Tip I’de kromatin sferik olarak dağılmıştır ve akrozom tamamen yoktur. Spesifik proteinaz olan akrozozin ve akrozomal membran da tamamen yoktur. Bu nedenle sperm zona pellusida’yı geçemez. Aksonem, kuyruk, mitokondri ve mikrotübüllerde yapısal bozukluklar görülebilir. Akrozomun yokluğu temel boyalarla kolaylıkla

gösterilebilmektedir. Baş içerisinde büyük vakuoller gözlenir (Bkz. Şekil 9).



**Şekil 9. Tip I Round Sperm**



**Şekil 10. Tip II Round Sperm**

Tip II defekt taşıyan sperm ise akrozom kalıntıları bulundurabilir ve bu nedenle oositi fertilize edebilecek bir miktar potansiyele de sahiptir. Tip II'de ise koni şeklinde bir nükleusla beraber bir miktar akrozom mevcuttur. Nükleus etrafında sitoplazmik halkacıklar vardır; ve bu durum bazı sekonder dejeneratif değişikliklerin olduğuna işaret eder. İnfertilite nedeni kötü motilitedir ve gonadotropinler kullanılarak gebelik elde edilebilmiştir (Bkz. Şekil 10), (91). Bu iki grubun, klinik davranışı belirlemesinden ötürü iyi ayırt edilmesi gerekmektedir. Nükleer proteinler elektroforetik olarak değerlendirildiğinde globozoospermide normal sperme oranla histon ve intermediate proteinlerin daha fazla bulunduğu, ancak protaminlerin daha az olduğu saptanmıştır (92,93). Bir diğer çalışmada Fosfolipaz A2 düzeyinin farklı olmadığı ama elektroforezde majör protein bandlarında eksiklikler tesbit edilmiştir (94).

### **GLOBOZOOSPERMİ'DE GENETİK ARAŞTIRMALAR**

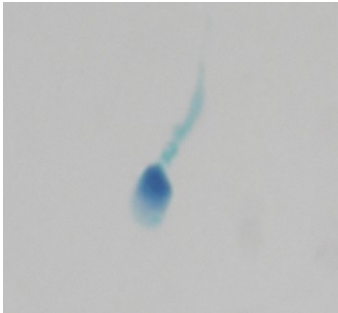
Erkek infertilitesi ile kromozomal anomaliler yakın ilişki içerisinde. Genel popülasyona göre infertil erkeklerde 10 kat daha fazla normal dışı kromozomal yapı saptanmıştır. Bazı translokasyonlarda kromozomal yönden normal dışı sperm saptanma oranı %50 olup asıl olarak bu translokasyonda rol alan kromozomlarla ilişkilidir. Her ne kadar geçiş paterni kesin olarak gösterilememiş olsa da ailesel olgular görüldüğünden bu hastalığın genetik bir temeli olması gerektiği düşünülerek değişik yazarlarca otozomal resesif, monogenik veya poligenik geçiş olabileceği öne sürülmüştür (95).

## TAIL STUMP

ICSI sonuçları, ejakülatlarında sadece immotil spermeleri olan hastalar için genelde kötüdür. İmmotil silya sendromu olan hastalardaki ICSI sonuçlarının neden bu kadar kötü olduğu netlik kazanmamıştır. İnce yapı düzeyindeki defektler sentrozom benzeri mikrotübüler yapıları da etkiliyerek ICSI sonrası fertilizasyon başarısızlığına ve kötü embriyo gelişime yol açıyor olabilir. Primer silyar diskinezi ile ilgili bir durum olması muhtemel patolojilerden biri olan “Tail Stump” sendromunda, kuyrukta morfolojik defektler söz konusudur ve bu durum nedeniyle hareketsizlik ortaya çıkmaktadır (15).

Fibröz kılıf displazi veya tail stump sendromu 1987 yılında Chemes ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu patoloji aşırı astenozoopermi, spermelerin total hareketsizliği ve sperm fibröz kılıf organizasyonunda ciddi sorunlara yol açmasıyla karakterize edilmiştir (96). Daha sonra yapılan ultrastrüktürel çalışmalarda bu hastalarda kronik solunum şikayetleri görülmesi ile birlikte klasik dineyn yapısının eksikliği eşlik etmesiyle ilgili olduğu anlaşılmış ve immotil silya sendromu, fibröz kılıf displazisi şeklinde tanımlama getirilmiştir (97). Bu hastalarda primer infertilite öyküsü izlenmiş ve bu hastalar klinik tedavilere ve in vitro fertilizasyon gibi klasik yöntemlere cevap vermemiştir. Transmisyon elektron mikroskobu, fibröz kılıf displazili sperm mevcut olan hastalarda şiddetli aksonemal ve periaksonemal değişikliklerin anlaşılmasında etkili olmuştur. İnfertil erkeklerde görülen benzer kusurlu sperm kuyruğu insanlarda ve bazı memeli türlerinde de tesbit edilmiştir. (98).

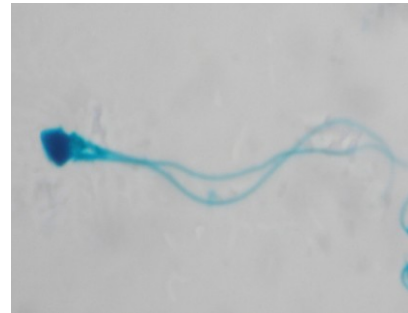
Hipertrofi ve hiperplazi sperm kuyruğunun kısa, kalın ve irregüler olmasına yol açar. Kuyruğun özel bir şekilde kısa ve kalın kalmasına bağlı güdük kuyruk sendromu (Stump-Tail) olarak da literatürde yer almıştır. Bu tip problemler geç spermiyogenez döneminde gerçekleştiği için testiküler orijinlidir ve fibröz kılıftaki bozukluklar tüm spermeleri etkilediği için ciddi motilite sorunlarına yol açar (30).



Şekil 11. Tail Stump



Şekil 12. Dag Defekt.



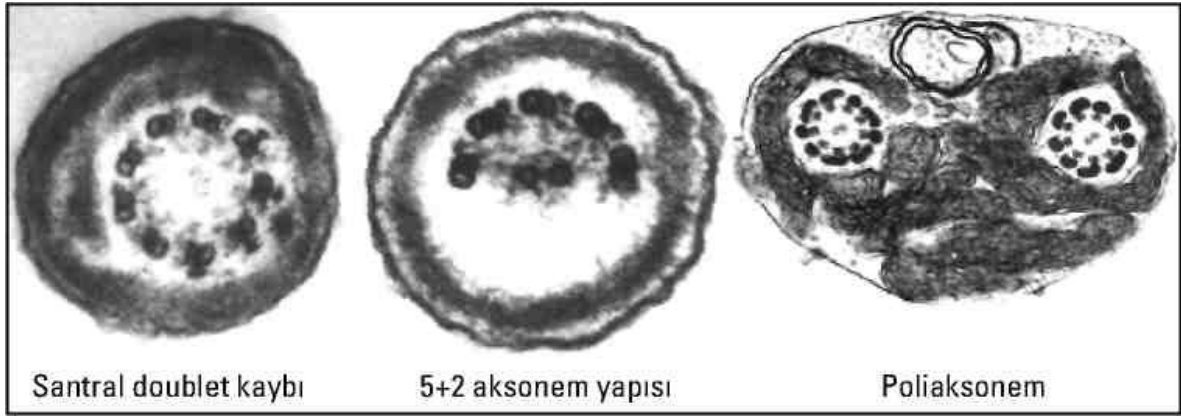
Şekil 13. Büyükbaş-Çift Kuyruk

Aksonem yapısındaki fibröz kılıf yapısıyla beraber olan bozukluklar longitudinal

kolonlarla, transvers kolonlar arasındaki uyumu bozar. Bazılarında sadece merkezi ikilide ve güç kollarında kayıp saptanırken, bazılarında 9+2 aksonemal yapı tamamen kaybolmaktadır. Bu yapı bozuklukları tail stump morfolojisine ait spermelerde rastlandığı gibi; dag defekt, büyük başlı, çift başlı ve çift kuyruklu spermelerde gözlenmektedir (Şekil 11–14).

### Aksonemde Yapısal Bulgular

Aksonemde yapısal bulgular; iç ve dış güç kollarında kayıp, iç kollarında kayıp, dış kollarda kısalık, iç kolların neksin bağlantıları ve radyal uzantılarda kayıp, mikrotübüler çiftlerde bozulma, dış güç kollarında kayıp, radyal olmayan bağlantı ve bağlantı başlarında kayıp, santral mikrotübüler çiftlerin eksik veya defektif olması şeklindedir (Bkz. Şekil 14).



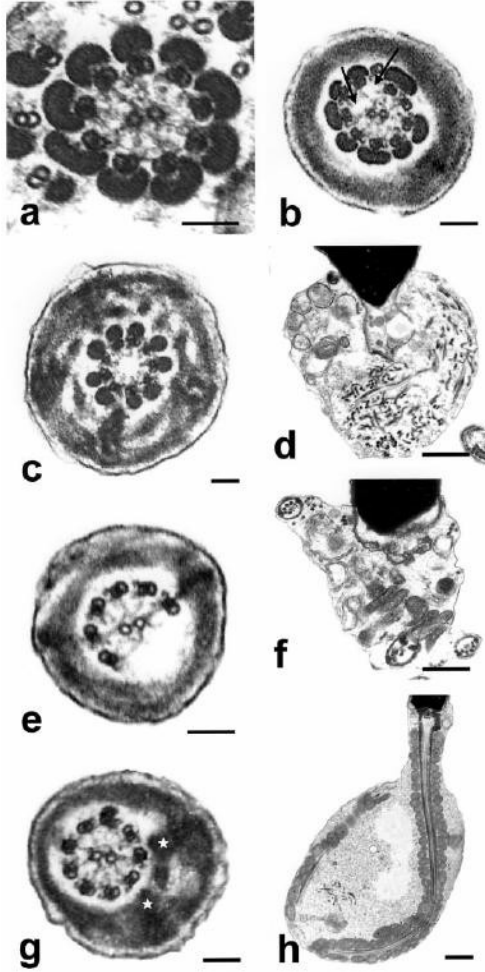
Şekil 14. Aksonem anomalileri (96)

Silya ve kuyruklarda dineyn kolları eksiktir. İç ve dış kollar yok ise, sperm hareketsiz kalacaktır. Ancak sadece dış kol yok ise sınırlı sperm hareketi vardır. Yine aksonemin aksesuar yapılarındaki bozukluklarda ise hareket kaybından çok, hareket bozuklukları gözlenir. Ancak bu tanıyı koyabilmek için çok sayıda kesitin elektron mikroskopik incelemesi gereklidir. İlk kez Kartagener tarafından 1933'te 4 olguda situs inversus, bronşektazi ve kronik sinüzit tablosu ile tariflenmiştir. İmmotil silya sendromu saptanan olguların (sıklığı 1:20000) yaklaşık %50 oranındaki bir grubu Kartagener sendromu tanısı alır. Otozomal resesif geçiş söz konusudur (96).

Fibröz kılıf displazisi çeşitleri Mitchell ve arkadaşları tarafından 2006'da 6 farklı tipte tanımlanmıştır.

- Tip I: Dış Dineyn kolları eksiktir (a).
- Tip II: Radyal kollar eksiktir (b).
- Tip III: Merkezi mikrotübül çifti eksik (9+0 yapısı) ve kuyruk yapısı uzamamıştır (c,d).

- Tip IV: Aksonemal mikrotübül çiftleri kısmen eksiktir. Kıvrılmış ve düzensiz kuyruk yapısı eşlik edebilir (e,f).
- Tip V: Dense fibrillerin yerleşimleri düzensizdir (g).
- Tip VI: Orta-kısım uzamıştır (h) (Bkz. Şekil -15, Bar; a,b,c,e,g: 0.1 µm, d,f,h: 1 µm) (99).



Şekil 15. Fibröz kılıf displazisi çeşitleri (99)

### İmmotil Silya Sendromu

Nadir, konjenital bir anomalidir. Sperm kuyruğunun aksonemine ait yapısal bir bozukluğudur. Standart 9 + 2 mikrotübül yapısından sapmalar immotil sperm ile sonuçlanabilir. En sık gözlenen defekt hem iç hem de dış dineyn kollarının tamamen yokluğudur. Diğer bozukluk örnekleri iç ya da dış kolların ayrı ayrı yokluğunu içerir. Bazı olgularda, bütün spermiler aynı defekti taşımayabilir. Aksonem yapıların komplet yokluğu nadirdir. İmmotil silya sendromlu hastalarda değişken kollar ve mikrotübüllerin



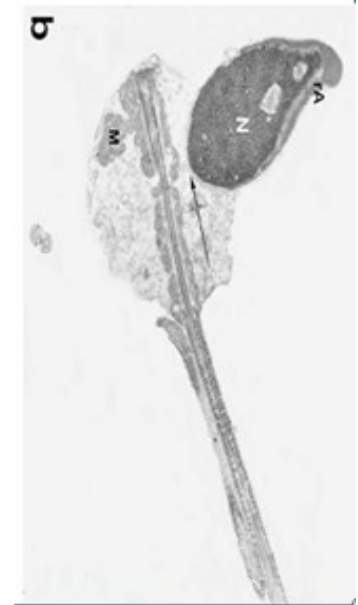
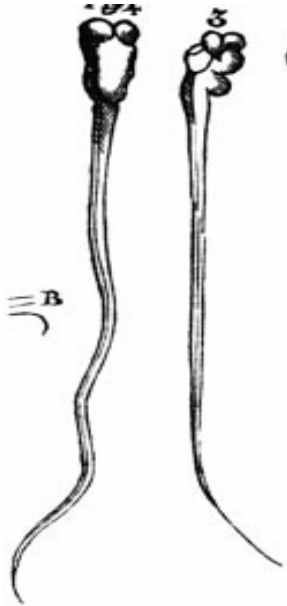
transpozisyonu gibi kuyrukta ultrastrüktürel defektler de tanımlanmıştır. Dolayısıyla bu sendrom heterojen bir tablo olup, bazı sperm motilite gösterebilirler. Dış yoğun fibril bozukluklarına mikrotübül anomalilerinden daha az rastlanır. Bu yapıların bozukluklarında, kuyruk hareketlerinin normal olmadığı hareketsiz sperm gelişir.

### 9+0 Sendromu

Sperm kuyruğunun bir diğer strüktürel defektidir. Santral mikrotübül çifti yoktur ve buna bağlı olarak sperm motilitesi kaybolur. Nadir bir anomali olup, 1/1000 sıklığında gözlenmektedir. Kardeşler arasında gözlenmesi, genetik nedenleri düşündürmektedir. Genelde tüm sperm etkilenmişlerdir (28).

### TOTAL PİNHEAD

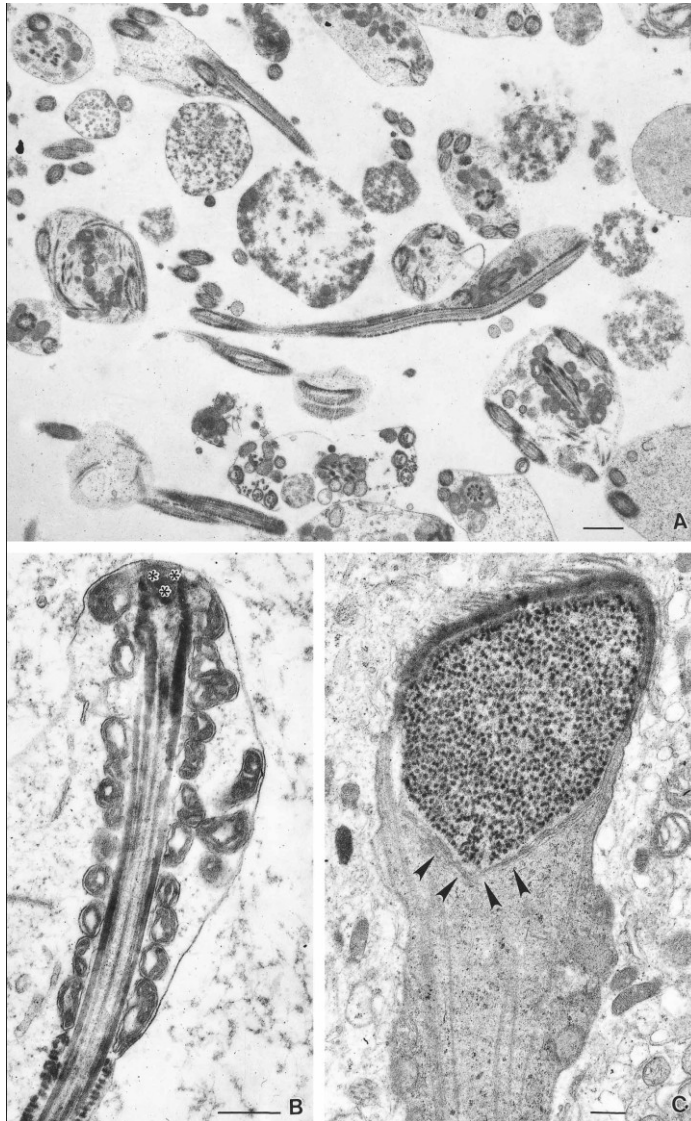
Pinhead anomali kuyruğun baştan koparak ayrılması şeklinde tanımlanmıştır. Baştaki bazal bölgenin akrozomun karşı kutbundaki nükleusa tutunmasındaki bozukluk spermiasyonda başların ve kuyrukların ayrılmasına neden olur. Bu başlar absorbe edilir ve semende yalnız başına kalan kuyruklar 'Pinhead' defektini oluştururlar. Bu defektin genetik olarak aktarıldığına inanılmaktadır (28).



Şekil 16. Tip I pinhead (101) Şekil 17. Tip II pinhead

Şekil 18. Tip III pinhead (101)

Pinhead anomalili spermiler anormal başlarla birlikte sperm hücrelerinin çeşitli formlarının arasında görülen nadir bir anomalidir. Pinhead anomalisi çok az dikkate alındığı için karakteristiği hakkında az bilgi mevcuttur. 1981'de, Perotti ve arkadaşları, infertil bir hastalarında sperm hücrelerinin çoğunun başsız olduğu ve bu sperm hücrelerinin kafasının kesildiğini belirtmişlerdir. Chemes ve arkadaşları 3 infertil hastada yaptıkları incelemede sperm kafasının kesildiğini not etmişlerdir. Pinhead veya başsız sperm hücrelerinin testiküler kaynaklı ve kuyruğa sahip bir spermatitten ve nükleustan bağımsız olarak geliştiği belirtilmiştir (100).



**Şekil 19. Pinhead çeşitleri (101–104)**

Tip I Pinhead'te normal kamçı ve birkaç baş sonlanması ile birlikte hiçbir nükleer içerik bulunmamaktadır. Tip II Pinhead'te normal bir orta parçası olabilir bununla birlikte bir

sitoplazmik kalıntıyla çevrilidir. (Bkz. Şekil 19A ve B) Tip III Pinhead'te orta parça ile değişik açılarla gevşek bağlantılı sperm başları gözlenir (Bkz. Şekil 19C)

Chemes ve arkadaşları pinhead spermleri orta kısma bağlanma yapısına göre sınıflandırmıştır. Bunlar;

- **Tip I**, Kuyruğun ucunda bir veya iki sentriol var. Bu sentrioller küçük sitoplazma artıklarıyla çevrilidir (Bkz. Şekil 16).
- **Tip II**, Gelişimin ileri evresinde büyük globuler sitoplazmik droplet içermektedir (Bkz. Şekil 17).
- **Tip III**, Sperm başı mevcut fakat orta kısımdaki anormal hizalanmadan dolayı proksimal bağlanma söz konusudur (Bkz. Şekil 18), (101–104).

Gevşekçe bağlantılı başların bulunması, implantasyon kısmının olduğu ve olgunlaşmamış spermatidten nükleus ve flagellar kök desteklerinin arasında bağlantı olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Yapılan çalışmalarında yedi hastanın daha spermiogenez esnasında boyun bölgesinin patolojik gelişmesinden türediği bu sendrom, anormal spermin diğer formlarında gösterilen anormal baş-orta kısım bağlantılarını kapsadığı gibi başsız sperm hücrelerinin düşüncesi genişletilmiştir (Bkz. Şekil 19), (101).

Olgun spermatidin sentriolünden, olgun spermlerin kuyruk aksonemi meydana gelir. Spermiogenezin 1. safhasında distal sentriyol aksonemi nükleusa kademeli olarak yaklaşarak yapışır. Farklılaşan spermatid nükleusu kaudal kısma doğru göç eder. Nükleusun kuyruğa yapıştığı yerde sığ bir konkav yapı oluşur. Buna implantasyon fossası adı verilir. İmplantasyon fossasında sentriol ve nükleus ile yakın ilişki içindedirler. Nükleusun dış çeperi elektron açısından yoğun dar bir tabaka geliştirir. Bu bazal plate olarak adlandırılır (102, 103).

Pinhead sperm mekanizması hakkında çeşitli hipotezler öne sürülmüştür.

- Golgi kompleksine ait vesiküllerin aşırı üretimi ile ortaya çıkabilmektedir.
- Aşırı üretim nedeniyle baş-kuyruk bağlantısındaki hassasiyet artmaktadır.
- Bazı vakalarda ise sperm aksinde yanlış hizalanma sebebiyle, nükleusun lateral pozisyonuna 90 ile 180 ile bağlanamamasından kaynaklanmaktadır (103, 104).

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **HASTA VE KONTROL GRUPLARI**

Bu çalışmaya Memorial hastanesi yardımcı üreme teknikleri ve genetik merkezi polikliniğine başvuran ve şiddetli erkek kısırlığına sebep olan morfolojik sperm bozukluklarından megalohhead, tail stump, globozoospermi ve pinhead anomalilerine sahip erkek bireyler arasından seçildi. Çalışmamıza megalohhead anomalisine sahip 4 hasta, globozoospermi anomalisine sahip 6 hasta, tail stump anomalisine sahip 8 hasta, total pinhead anomalisine sahip 2 hasta dahil edilmiş olup, gönüllü fertil 3 bireyden kontrol grubu oluşturuldu. Tüm hastalara çalışma öncesi bilgi verildi ve onam formu doldurulup imzalatıldı.

### **SEMEN ÖRNEĞİNİN ALINMASI**

Semen örneği hastalardan en az 3 gün en fazla 5 günlük cinsel perhiz uygulaması sonrası, mastürbasyon tekniği ile elde edildi. Hastaya, androloji laboratuvarındaki biyolog tarafından steril semen kabına hastanın adı, soyadı ve tarih yazılıp, semen verirken dikkat edilecek hususlar, biyolog tarafından sözlü olarak anlatıldı ve aynı zamanda bu bilgilerin bulunduğu yazılı bir form verildi. Semen örneği alınan hasta önemli bir viral enfeksiyon (HBV, HCV vb.) taşıması durumunda semen kabı ve hasta formu üzerine, kontaminasyon riski ile ilgili not düşüldü.

### **SEMEN ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Semen örneğinin incelenmesi normal likefaksiyon süresinin (20- 30 dakika) hemen bitiminde gerçekleştirildi. Konsantrasyon, motilite ve morfoloji parametreleri değerlendirilip

semen analizi ön kayıt formuna kayıt edildi. Bununla birlikte volüm, aglutinasyon, pH, sperm dışı immatür germ hücreleri, eritrosit, lökosit ve epitel hücreleri varsa ayrıca değerlendirildi.

### **SPERM KONSANTRASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sperm konsantrasyonu, semenin likefiye olmasını takiben öncelikle semen örneği pastör pipeti ile birkaç kez pipetlenerek homojenize olması sağlandı. Mikropipetle 5-10 µl alınarak makler sayma kamarasında (Makler® Counting Chamber - Israel) 20x büyütmede faz kontrast mikroskopta (Olympus CH 30, Tokyo, Japan) sperm sayısı mililitre başına milyon cinsinden belirlendi.

### **SPERM HAREKETLİLİĞİ VE PROGRESYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Motilite ve progresyon değerlendirmesi ışık mikroskopu (Olympus CH 30, Tokyo, Japan) ile 20x büyütmede DSÖ kriterlerine göre en az 100 sperm sayılarak total motilite, progresif motilite, yavaş progresyon, yerinde hareket ve hareketsiz sperm yüzdeleri hesaplandı. Sayılan 100 spermin hareketli olanlarının yüzde olarak değeri, sperm total motilitesi olarak hesaplandı.

### **SPERM MORFOLOJİ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Değerlendirme sonrası likefiye olmuş semen örneği 1/1 oranında sıvı besiyeri (ALLgrad wash- Canada) ile homojenize edildikten sonra 1000 devirde 10 dakika santrifüj (Heraus Megafuge 40- Germany) edilerek konsantere edildi. Üst kısım atıldıktan sonra pelletin üzerine 0.25 ml sıvı besiyeri konularak homojenize edildi. 10 µl alındıktan temiz bir lam üzerine damlatılarak ince bir yayma hazırlandı. Havada kuruduktan sonra yayma spermac boyama (Spermac Stain-Fertipro-Belgium) prosedürü uygulandı.

Fiksatif	5-30 dakika
Distile su	Birkaç kez yıkanır.
Spermac A boyası	1-2 dakika
Distile su	Birkaç kez yıkanır.
Spermac B boyası	45 saniye
Distile su	Birkaç kez yıkanır.
Spermac C boyası	1 dakika
Distile su	Birkaç kez yıkanır.

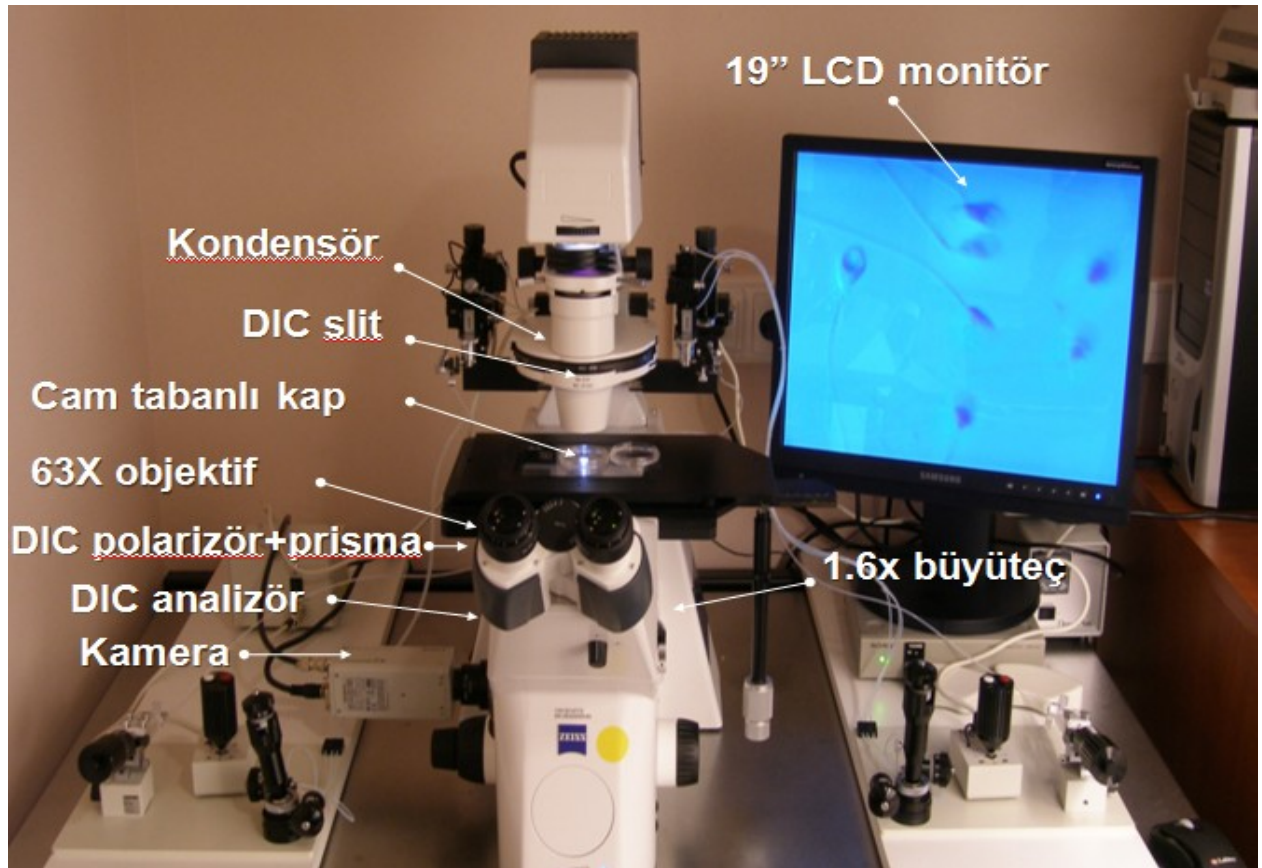
Kuruduktan sonra ışık mikroskobunda 100x büyütmede, immersion yağı ile faz kontrast mikroskobunda (Olympus Bx50, Tokyo, Japan) değerlendirme yapıldı. En az 100 ardışık sperm sayılarak normal, küçük başlı, uzun başlı, çift başlı, kuyruk anomalili, boyun ve orta kısım anomalili, amorf ve çoklu anomalili formlar ve spermin spesifik strüktürel

bozulukları; megalohhead, tail stump, globozoospermi, pinhead anomalileri yüzde cinsinden sperm morfoloji değerlendirme formuna kaydedildi ve bulgular fotoğraflandırıldı.

### SEMEN ÖRNEKLERİNİN MSOME İÇİN HAZIRLANMASI

MSOME için sperm kaynağı olarak taze ejakülat kullanıldı. Her örneğe göre uygun sperm hazırlığı gerçekleştirildi. Sperm hazırlığı sonunda spermler 0,2 ml HTF solüsyonu içerisinde süspanse edilerek 37°C’de muhafaza edildi. Değerlendirmesi için cam tabanlı steril petri kabı üzerinde hazırlanan ve üzeri steril parafin yağı ile kaplanan 10 µl’lik %10’luk aralığındaki sıvı besiyeri damlacığı içine hazırlanan semen örneğinden yaklaşık 5000 sperm içerecek miktarda insemine edildi.

### SEMEN ÖRNEKLERİNİN MSOME İLE DEĞERLENDİRİLMESİ



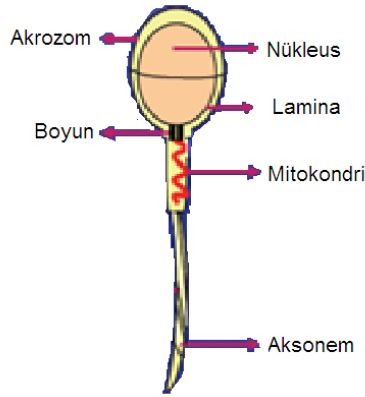
Şekil 20: Hareketli sperm organel değerlendirmesi için gerekli mikroskop düzeneği

Sperm değerlendirilmesi DIC objektif ve DIC kondenser ile donatılmış Zeiss Axio Observer A1 invert mikroskop kullanılarak gerçekleştirildi. Görüntüleme için 1.0 x kamera adaptörü ile mikroskoba eklenen 1/3" Sony DxC-390P 3 CCD video kamera ve 19" Samsung LCD monitör kullanıldı. Elde edilecek toplam büyütme oranı 8050x olarak hesaplandı; (Bkz.

Şekil 20), (63x objektif x 1.6x Optobar x 1/3" kamera x 1.0x adaptör x 19" monitör=8050x).

Semen örneklerinin MSOME kriterleri genel sınıflandırma için Bartoov'un tablosundan faydalanıldı. MSOME işleminde 6 organel (akrozom, nükleus, akrozom sonrası lamina, boyun, orta kısım ve aksonem) incelenip bulgular fotoğraflandırıldı (Bkz. Şekil 21).

### Bartoov Sınıflandırması



- Akrozom
- Lamina
- Boyun
- Mitokondri
- Aksonem
- Nükleus

### Şekil 21. Bartoov'un sınıflandırmasında değerlendirilen organeler (36)

**Normal Şekli Nükleus:** Düzgün, simetrik ve oval konfigürasyonlu olmalı, ayrıca ortalama boyunun  $4.75 \pm 0.28 \mu\text{m}$  ve eninin  $3.28 \pm 0.20 \mu\text{m}$  olmalıdır.

**Nükleer Kromatin:** Nükleer kromatin yapısının normal olduğunun söylenebilmesi için normal nükleer alanın 4% den daha fazla alanı kaplayan 1 veya daha fazla vakuolünün olmaması gerekir (36).

### ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME

Sperm örnekleri rutin elektron mikroskopik için öncelikle 2700 devirde 10 dakika santrifüj edilerek konsantrasyon elde edildi. Örnek %2,5'lük glutaraldehitte (Glutaraldehit EM Grade %50 cat. No: 16320) 4–6 saat fikse edildi. Sperm konsantrasyonunun daha sonraki elektron mikroskopik takip işlemlerinde dağılmaması için %2'lik saf agara gömüldü. Daha sonra Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bölümünde rutin elektron mikroskopik incelemeler için uygulanan takipler uygulandı.

Elektron mikroskopik incelemeleri için;

- |  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. Glutaraldehit (pH'sı 7.3, % 2.5'lük ) | 1–4 saat prefiksasyon |
| 2. Fosfat tamponu                        | 1 gece                |

3. OsO4 (% 1'lik)	1 saat postfiksasyon
4. Fosfat tamponu	15 dakika yıkama
5. Dehidratasyon	
○ % 50 Alkol	10 dk
○ % 70 Alkol	10 dk
○ % 90 Alkol	10 dk
○ % 96 Alkol	10 dk
○ % 100 Alkol	20 dk
○ % 100 Alkol	20 dk
○ % 100 Alkol	20 dk
6. Propilen oksit (Saydamlaştırma)	
○ Propilen oksit I	20 dk
○ Propilen oksit II	20 dk
○ Propilen oksit III	20 dk
7. Propilen oksit + araldit (İnklüzyon)	
○ 3 hacim Propilen oksit + 1 hacim Araldit	1 saat
○ 1 hacim Propilen oksit + 1 hacim Araldit	1 saat
○ 1 hacim Propilen oksit + 3 hacim Araldit	1 gece
8. Saf aralditte bekletme	1 saat
9. Kapsüle gömme, etiketleme	
10. 45 °C'lik etüvde	1gün
11. 60 °C'lik etüvde	2 gün bekletildi.

Blokların kesim bölgelerini belirlemek amacıyla, yarı ince kesitler alınarak (RMCMTX Ultramikrotom Amerikan), azur mavisiyle boyandı. Belirlenen bölgelerden 40–60 nm kalınlığında ince kesitler alınıp, kesitler uranil asetat ve kontrastı artırmak amacı ile Reynold'un kurşun sitrat boyaları ile boyandı. Bu kesitler Jeol 1010 elektron mikroskopunda incelenerek, bulgular fotoğraflandırdı.



## **BULGULAR**

### **KONTROL GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

#### **Kontrol Grubunda Işık Mikroskopik Bulgular**

Kontrol grubuna ait deneklerden alınan semen örnekleri, rutin spermac boyası ile boyanıp kruger kriterlerine göre değerlendirildiğinde; sperm başlarının şekilleri genellikle oval, boyları 4.0 – 5.0  $\mu\text{m}$  ve genişlikleri de 2.5 – 3.5  $\mu\text{m}$  aralığında idi. Spermilerin boy ve genişlik değerlendirmesi oküler bir mikrometre ile yapıldı. Spermilerin baş bölgelerinde %40-70'ini kapsayan iyi belirlenmiş bir akrozomal bölge mevcuttu. Spermilerin çoğunun orta kısmı düzgün, spermilerin boyunun sperm baş uzunluğuna oranı 1.5–2.0 arasında ve başa aksiyel olarak bağlanmış durumdaydılar. Kuyruklar düz, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 40–50  $\mu\text{m}$  uzunluğundaydı (Resim 1). Değerlendirilen spermelerde normal sperm morfolojisine sahip spermilerin yanında anormal morfolojili spermelerde mevcuttu. Bazı spermelerde normal baş alanının yarısından az miktarda sitoplazmik kalıntı vardı. Kontrol grubuna ait sperm morfoloji değerlendirmesi normal sınırlar içindeydi. Genel itibariyle birçok sperm normal veya normale yakındı (Resim 2).

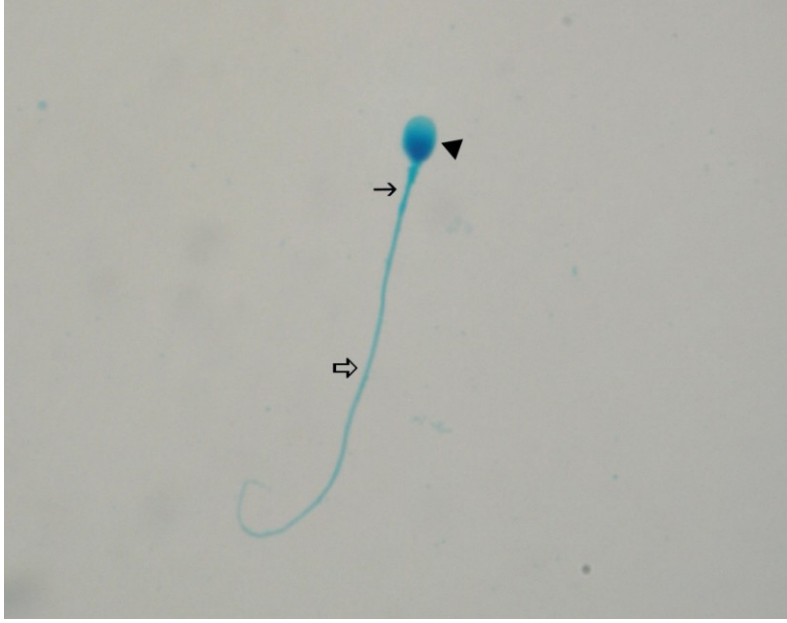
#### **Kontrol Grubunda MSOME Bulguları**

Kontrol grubunda yapılan MSOME işleminde 6 organel (akrozom, nükleus, akrozomal sonrası lamina, boyun, orta kısım ve kuyruk) incelendi. Değerlendirilen spermelerde akrozomlar başın ön kısmında, düzgün yapılı vakuol içermiyordu, akrozomal sonrası lamina düzgün yapılı idi. Boyunlar baştan aksiyel olarak çıkışlı sitoplazmik kalıntılar içermiyordu. Mitokondriler boyun kısmında düzgün yerleşimli ve boyun kısmında mitokondri eksikliğini

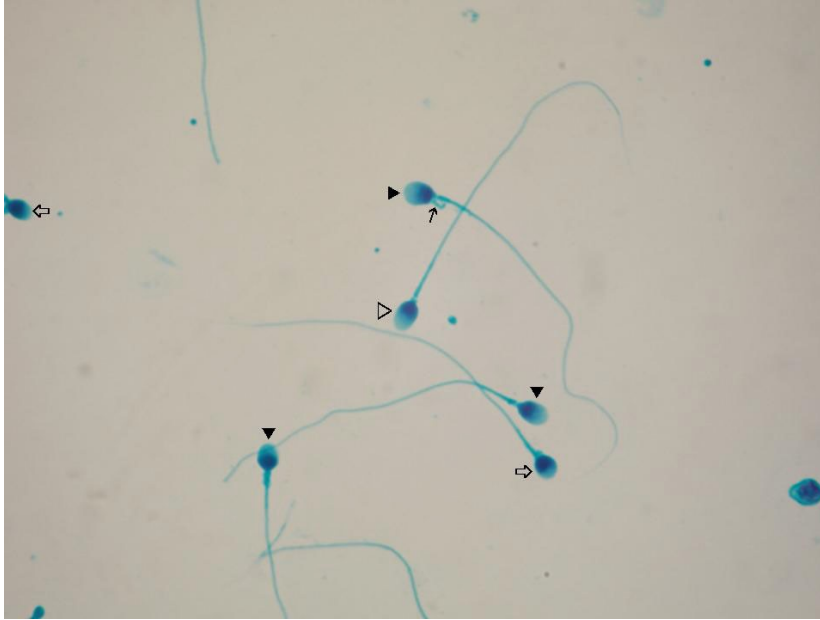
ve dağınıklığını gösterecek bozukluklar tesbit edilmedi. Kuyruklar düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 40–50 µm uzunluğundaydı. Nükleuslar incelendiğinde normal şekilli düzgün, simetrik ve oval konfigürasyonlu oldukları gözlemlendi (Resim 3). Spermilerin nükleer kromatin yapısının normal olduğunun söylenebilmesi için normal nükleer alanın 4% den daha fazla alanı kaplayan 1 veya daha fazla vakuollerin olmaması gerekir. Normal olarak değerlendirilen spermelerde vakuolizasyon gözlenmemiştir. Kontrol grubunda yapılan MSOME işleminde spermilerin değerlendirilmesi normal sınırlar içindeydi. Genel itibariyle birçok sperm normal veya normale yakındı. Normal sperm morfolojisine sahip spermilerin yanında anormal morfolojili spermelerde mevcuttu (Resim 4).

### **Kontrol Grubunda Elektron Mikroskopik Bulgular**

Kontrol grubunda yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede spermilerin akrozomal kep kısmı normal şekilli, devamlı ve başın ön kısmını %50–60 oranında kaplayacak boyutlarda ve yoğun içeriğe sahipti. Nükleuslar normal şekilli, olgun kromatinliydi. Kuyruklardaki aksonemal düzenler normal şekilliydi (Resim 5). Fibröz kılıf yapıları normal ve bir bütün halindeydi. Gözlenen mikrotübül yapılarının büyük çoğunluğunda 9+2 yapısı mevcuttu (Resim 6). Mitokondriler normal şekilli ve sperm boyunlarının her iki tarafında simetrik ve düzgün yerleşimliydi (Resim 7).



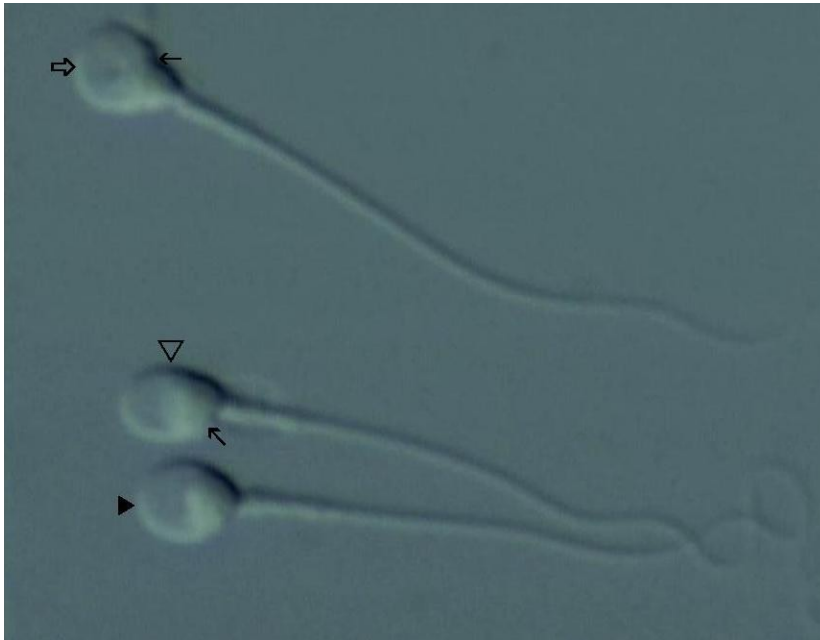
**Resim 1. Kontrol grubunda normal sperm görüntüsü: Baş bölgesinin %50'sini kapsayan iyi belirlenmiş bir akrozomal bölge görülmekte (◄). Orta kısım ince uzun, başa aksiyel olarak bağlanmış durumda, sitoplazmik kalıntı içermediği görülmekte (→). Düz, düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 40–50 µm uzunluğunda düzgün kuyruk dikkat çekmekte (⇨). Spermac Boyası, x1000**



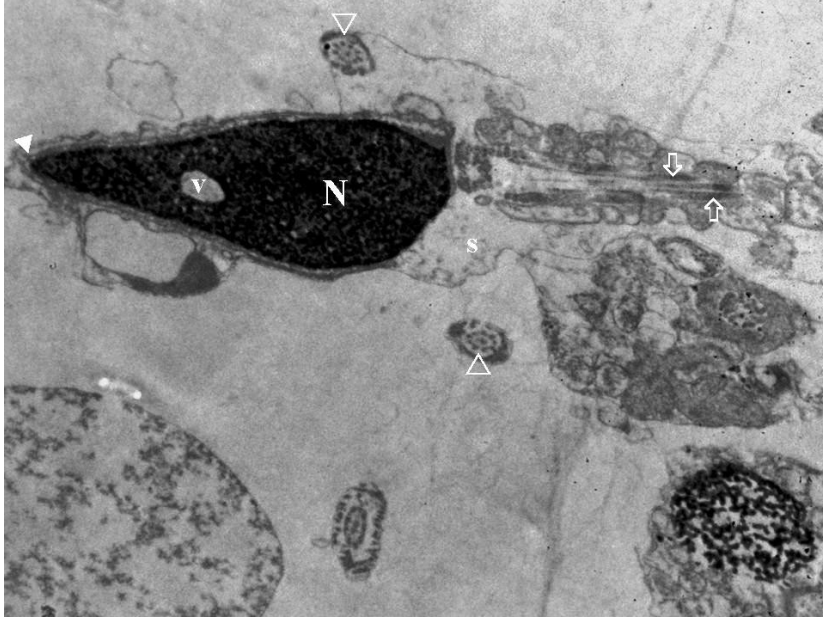
**Resim 2. Kontrol grubunun genel görüntüsü: Normal sperm morfolojisine sahip spermlerin (▽) yanında anormal morfolojili spermlerde mevcuttu (⇨). Bazı spermlerde normal baş alanının yarısından az miktarda sitoplazmik kalıntı vardı (→). Kontrol grubuna ait sperm morfoloji değerlendirmesi normal sınırlar içindeydi. Genel itibariyle birçok sperm normal veya normale yakın olması dikkat çekmekte (►). Spermac Boyası, x1000**



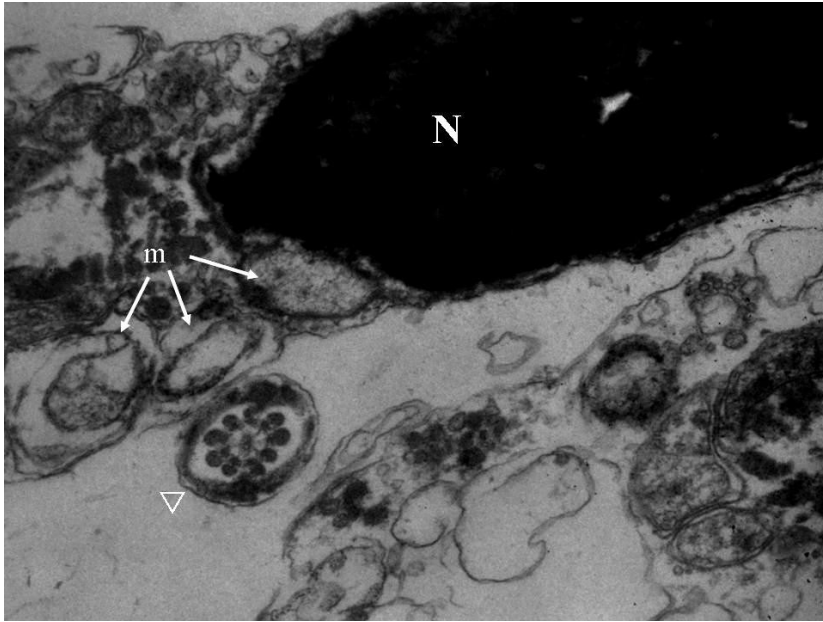
**Resim 3. Kontrol grubunda sperm görüntüsü: Sperm başının %4 ünden az küçük vakuoller izlenmekte (▼). Nükleus düzgün, simetrik ve oval şekilli olduğu görülmekte (\*). Boyun baştan aksiyel olarak çıkışlı ve sitoplazmik kalıntılar içermediği görülmekte (▲). Düz, orta kısımdan ince, kıvrılmamış düzgün biçimli ve boyutta kuyruk dikkat çekmekte (→). MSOME, x8050**



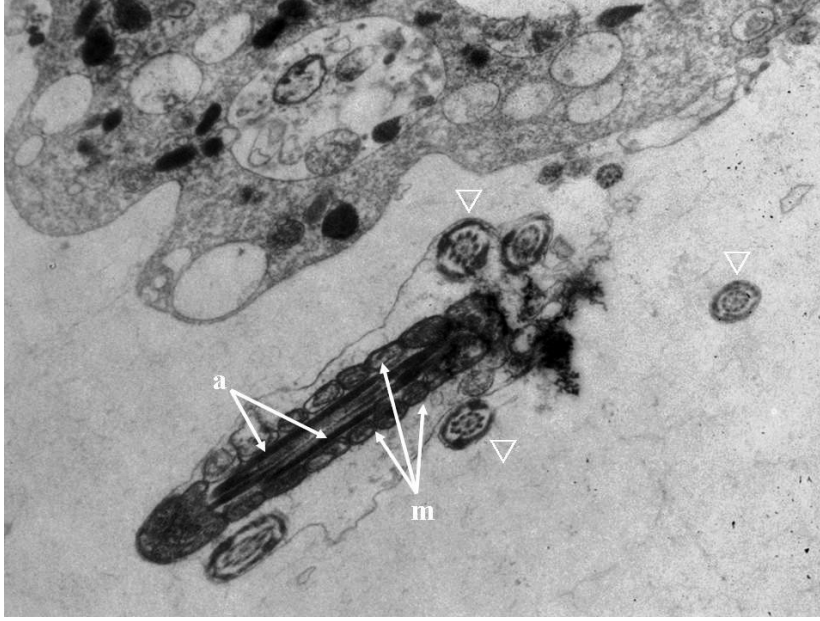
**Resim 4. Kontrol grubu genel görüntüsü: Kontrol grubunda vakuolsüz, normal spermlerin (▶) yanında anormal morfolojili (→) ve vakuollü, düzgün şekilli olmayan spermlerde gözlenmekte (⇒). Genel itibariyle birçok sperm normal veya normale yakın olması dikkat çekmekte (▽). MSOME, x8050**



**Resim 5. Kontrol grubunda normal sperm görüntüsü:** Akrozomal kep normal şekilli, devamlı olduğu görülmekte (▶). Nükleus normal şekilli, olgun kromatinli (N), küçük vakuol gözlenmekte (v). Sitoplazmik kalıntı çok az izlenmekte (s) Aksonemal yapı normal şekilli (⇔), gözlenen düzgün 9+2 mikrotübül yapıları dikkat çekmekte (▽). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x30000



**Resim 6. Kontrol grubunda normal sperm görüntüsü:** Nükleusun normal şekilli, olgun kromatinli olduğu izlenmekte (N), Mitokondrilerin düzgün ve simetrik yerleşimli olduğu izlenmekte (m). Enine kesitlerde gözlenen 9+2 düzenindeki mikrotübül yapıları içeren kuyruklar dikkat çekmekte (▽). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x50000



**Resim 7. Kontrol grubunda normal boyun görüntüsü: Mitokondrilerin normal şekilli ve boyunun her iki tarafında simetrik, düzgün yerleşimli oldukları izlenmekte (m). Aksonemal yapının düzgün şekilli olduğu görülmekte (a), gözlenen 9+2 düzenindeki mikrotübül yapıları dikkat çekmekte (▽). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x20000**

## **MEGALOHEAD GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Megalohead Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

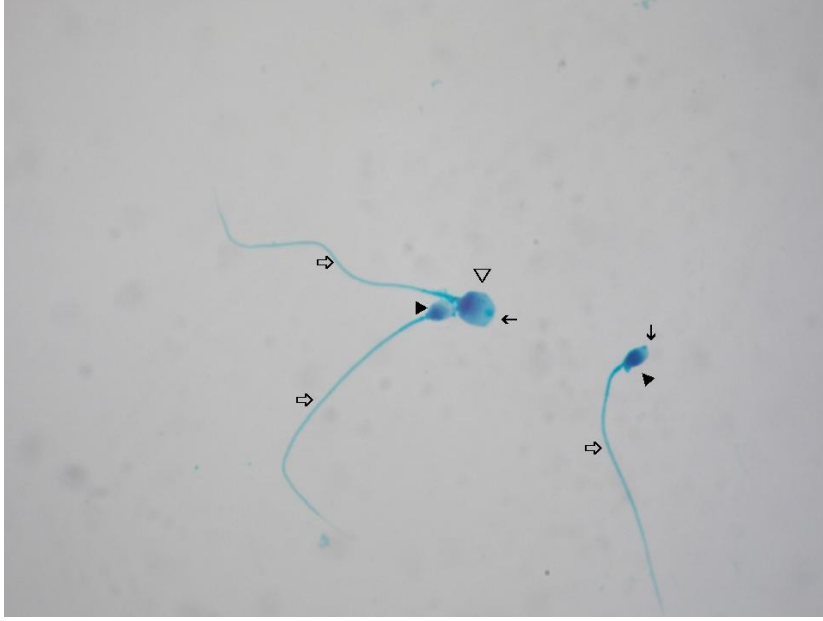
Megalohead grubuna ait hastalardan alınan semen örnekleri rutin spermac boyası ile boyanıp kruger kriterlerine göre değerlendirilen birçok sperm başının normal boyutlardan daha büyük olduğu görüldü. Bazı hastalarda normal boyutlu spermelerin arasında belirli yüzdelerde dikkat çeken düzenli yapıda büyük başlar mevcuttu. Bazı spermelerin akrozom kısımlarında akrozomal kistler görüldü (Resim 8). Megalohead spermelerle birlikte pinhead spermelerde mevcuttu. Değerlendirilen birçok sperm kuyruk problemleri de mevcuttu (Resim 9). Bazı spermelerde baş bölgelerini kaplayan dağınık akrozomal bölgeler mevcuttu. Orta kısımlar genellikle başa aksiyel bağlanmamıştı. Sitoplazmik kalıntılar birçok spermde gözlendi. Normal uzunlukta çoklu kuyruk yapıları gözlendi. Megalohead spermelerin morfolojisi değerlendirilirken çok nadir normal boyutlara yakın spermeler mevcuttu. Bu spermelerin yanında anormal morfolojili spermelerde yoğun bir şekilde mevcuttu. Megalohead spermeler birlikte çift başlı, çift kuyruklu spermeler ve birbirinden ayrılamamış morfolojili spermeler mevcuttu. Amorf başlı spermeler ile birlikte kuyruğunu kaybetmiş dev serbest başlar görüldü (Resim 10).

### **Megalohead Grubuna Ait MSOME Bulguları**

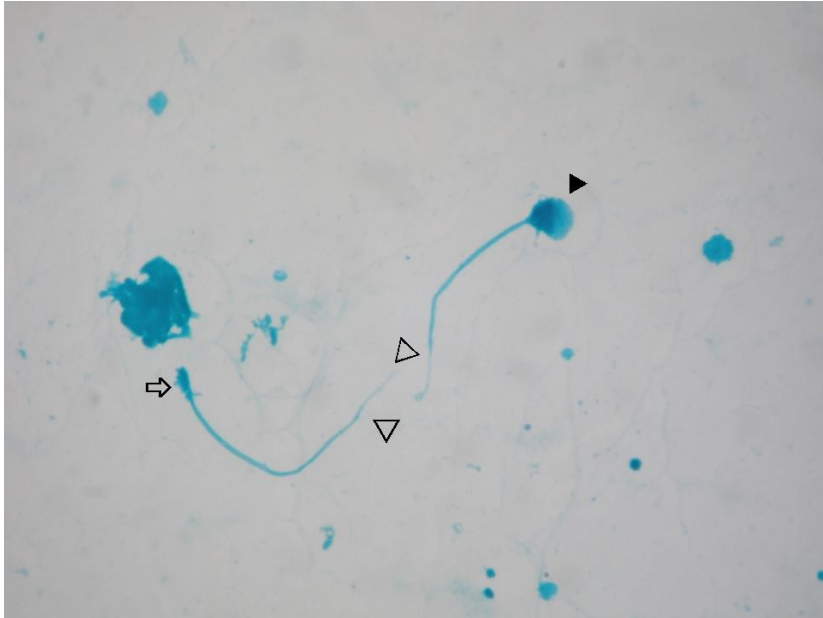
Megalohead grubunda yapılan MSOME işlemiyle değerlendirilen spermelerde boyun kısımları baştan aksiyel çıkışlı değildi ve büyük sitoplazmik kalıntılar içeriyordu (Resim 11). Mitokondriler dağınık yerleşimli ve mitokondri eksikliğini ve dağınıklığını gösterecek bozukluklar tesbit edildi. Kuyruklar genellikle çok kuyruk şeklinde ve normal uzunlukta idi (Resim 12). Nükleuslar genellikle şekilsiz ve bozuk konfigürasyonlu idi (Resim 13). Görülen spermeler normal sperm boyutunun yaklaşık iki katıydı. Nükleer bölgelerde yüksek oranda vakuolizasyon gözlemlendi (Resim 14).

### **Megalohead Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular**

Megalohead grubunda yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede genel itibariyle spermelerde nükleer yapı çift veya büyüktü. Birbirinden ayrılamamış iki nükleus tek baş içinde mevcut olması dikkat çekti. Bu durum megalohead spermelerde görülen yüksek diploidi oranını sebebinin açıklar nitelikteydi (Resim 15). Nükleusların normal şekline yakın olanlarında bile spermeler büyük boyutlu ve olgun kromatinliydi. İncelenen akrozomal kepler anormal şekilli, başların bazı kısımlarında mevcut bazı bölgelerinde ise parçalanmış ve yoğun içeriğe sahipti. Sitoplazmik kalıntı yüksek oranda mevcuttu. Çoklu kuyruk yapısına boyuna ve enine kesitlerde rastlanmıştır. Bu aksonemlerde 9+2 mikrotübül yapısından sapmalar da dikkat çekmiştir (Resim 16). Mitokondriler anormal şekilli ve dağınık yerleşimliydi (Resim 17). Tek bir sperme ait aynı sitoplazma içinde olan, aksonemal yapının normal şekilli fakat çoklu aksonem yapısında olması dikkat çekti (Resim 18).

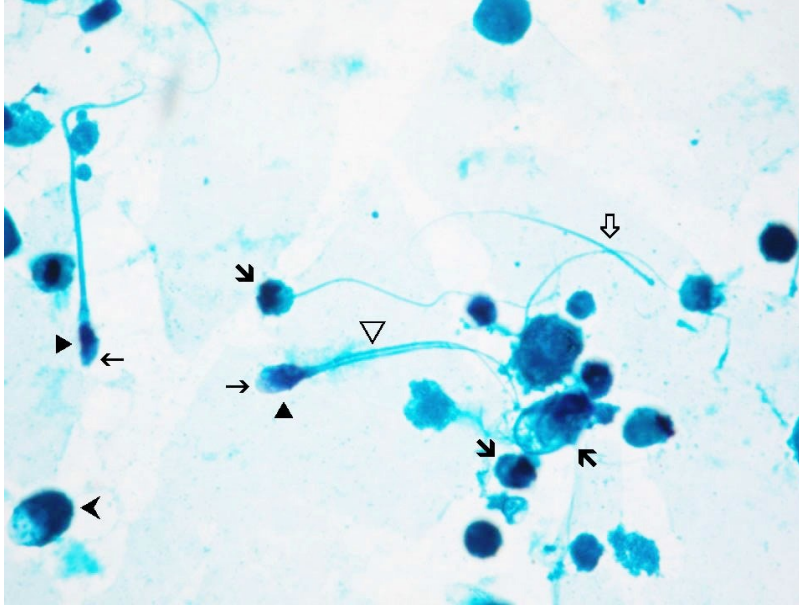


**Resim 8. Megalohead grubunun genel görüntüsü: Normal boyutlara sahip spermlerle birlikte (▶) düzgün şekilli fakat büyük boyutlu megalohead sperm görülmekte (▽). Bazı spermlerin akrozom kısımlarında kistler izlenmekte (→). Tüm spermlerde boyun ve kuyruk yapılarının normal olması dikkat çekmekte (⇒). Spermac Boyası, x1000**

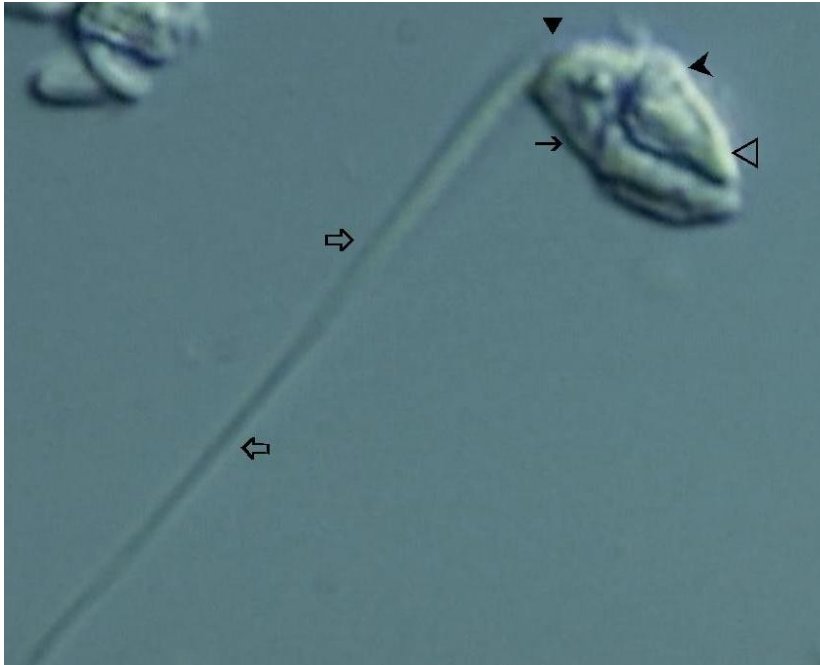


**Resim 9. Megalohead grubunun genel görüntüsü: Megalohead spermlerle (▶) birlikte pinhead spermlerin eşlik ettiği görülmekte (⇒). Bu spermlerin kuyruk problemlerinin olması dikkat çekmekte (▽). Spermac Boyası, x1000.**

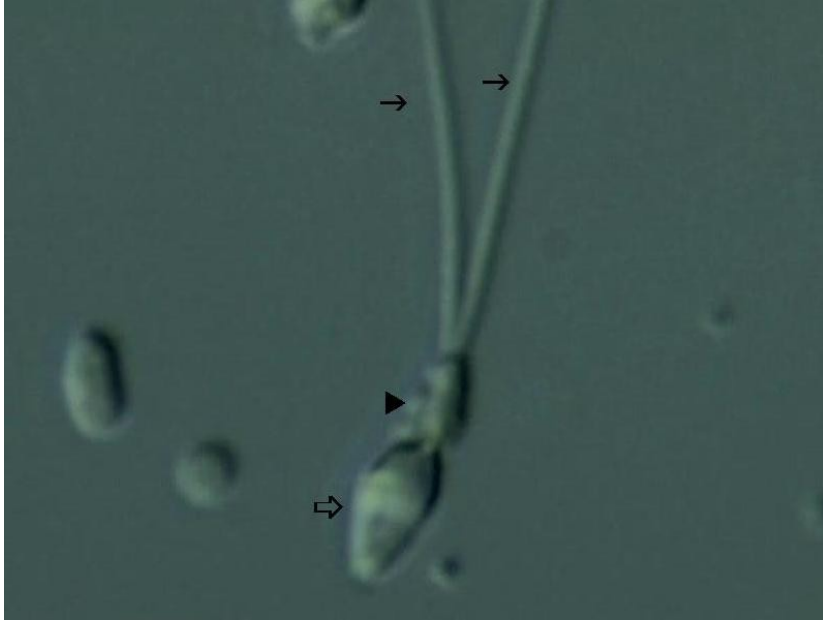




**Resim 10. Megalohead grubunun genel görüntüsü: Megalohead spermelerin başının normal boyutlardan daha büyük olduğu izlenmekte (▶). Baş bölgelerinde dağınık, belirli olmayan akrozomal bölgeler gözlenmekte (→). Amorf başlı spermle birlikte (⚡), pinhead sperm eşlik etmekte (⇔). Kuyruklar genellikle çoklu kuyruk olarak gözlenmekte (▽). Kuyruğunu kaybetmiş dev serbest başlar dikkat çekmekte (⤵). Spermac Boyası, x1000**



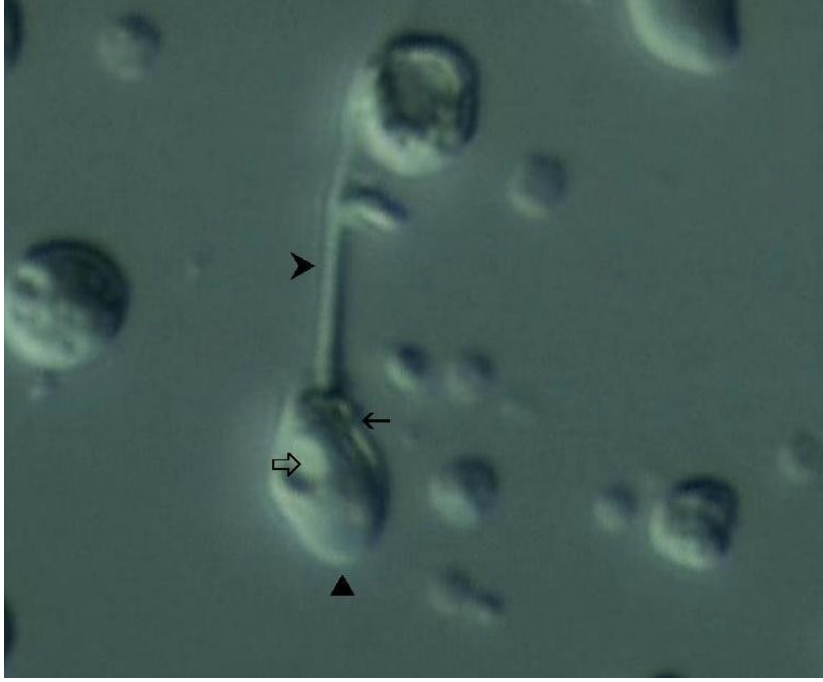
**Resim 11. Megalohead grubunda sperm görüntüsü: Kuyruk baştan aksiyel çıkışlı olmadığı (▶) ve büyük sitoplazmik kalıntılar izlenmekte (→). Düzgün kuyruk yapısı görülmekte (⇔). Akrozomal (▽) ve nükleer kısımların anormal şekilli olması dikkat çekmekte (⤵). MSOME, x8050**



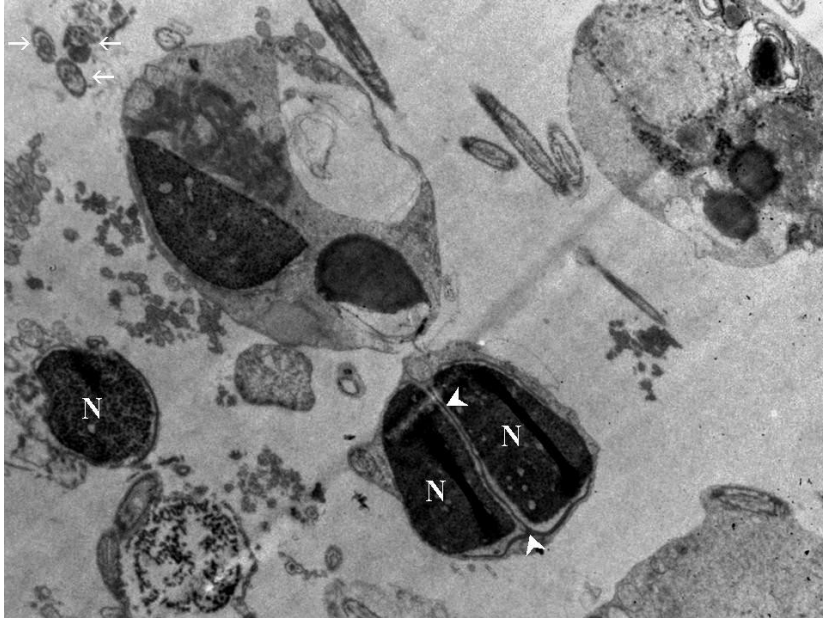
**Resim 12. Megalohead grubunda sperm görüntüsü: Sperm başı normale yakın şekilli, akrozom ve nükleer yapı normale yakın olduğu izlenmekte (⇒). Az miktarda sitoplazmik kalıntı ile gözlenmekte (▶). İki kuyruklu yapının olması dikkat çekmekte (→). MSOME, x8050**



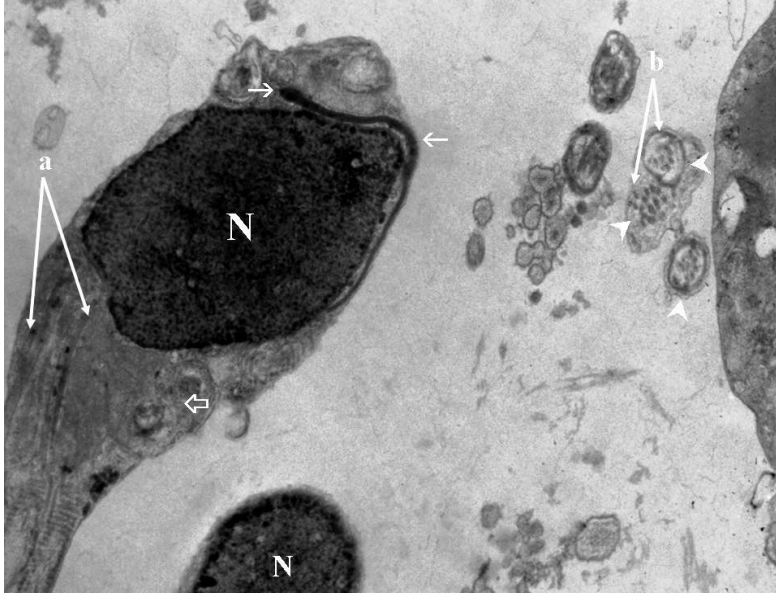
**Resim 13. Megalohead grubunda tipik sperm görüntüsü: Nükleus ve akrozom yapısı genellikle şekilsiz ve bozuk konfigürasyonlu izlenmekte (▶). Çoklu kuyruk yapısı gözlenmekte (→). Baştaki büyük vakuol dikkat çekmekte (▶). MSOME, x8050**



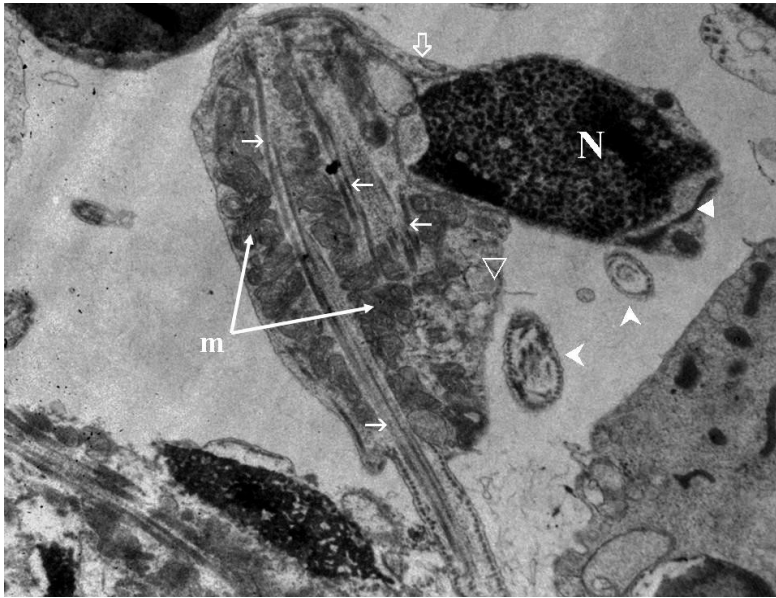
**Resim 14. Megalohead grubunda sperm görüntüsü: Akrozom başın ön kısmında, net bir şekilde seçilememekte (▶). Düzgün olmayan akrozomal sonrası lamina izlenmekte (→). Düzgün kuyruk yapısı gözlenmemekte (▶) Nükleer bölgenin büyük boyutlu vakuol içermesi dikkat çekmekte (⇨). MSOME, x8050**



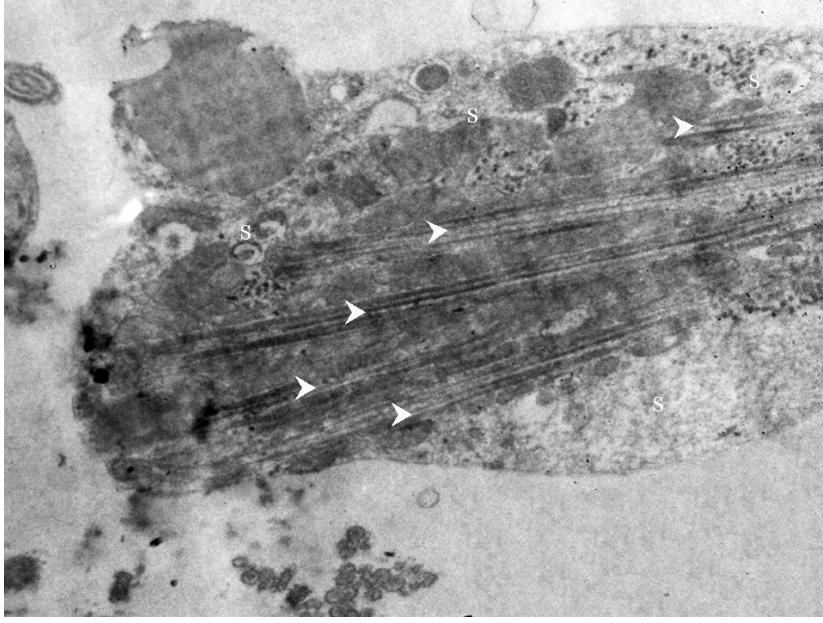
**Resim 15. Megalohead grubunda elektron mikroskobu görüntüsü: Değerlendirilen spermelerde nükleer yapının çift ve çok büyük olduğu (N), 9+2 mikrotübül yapısından sapmalar görülmekte (→). Birbirinden ayrılamamış şekilde iki nükleusun tek baş içinde mevcut olması dikkat çekmekte (▶). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x10000**



**Resim 16. Megalohead grubunda sperm görüntüsü: Nükleus büyük boyutlu ve olgun kromatinli izlenmekte (N). Akrozomal kep başın bazı kısımlarında mevcut bazı bölgelerinde ise parçalanmış olduğu gözlenmekte (→). Sitoplazmik kalıntının mevcut olduğu görülmekte (⇨). Aksonemlerde 9+2 mikrotübül yapısından sapmalar gözlenmekte. Poliaksone yapıları boyuna (a), enine (b) kesitlerde dikkat çekmekte (▶). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x20000**



**Resim 17. Megalohead grubunda sperm görüntüsü: Nükleus büyük boyutlu ve gevşek kromatinli gözlenmekte (N). Akrozomal kep başın bazı kısımlarında mevcut gözlenmekte (▶). Aksonemin çoklu yapısı izlenmekte (→). Sitoplazmik kalıntı (▽), dağınık mitokondriler (m) ile birlikte 9+2 mikrotübül yapısından sapmalar gözlenmekte (▶). Sperm başının aksiyel olmayan bağlantısı dikkat çekmekte (⇨). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x20000**



**Resim 18. Megalohead grubunda çoklu aksonem görüntüsü: Tek bir sperme ait aynı sitoplazma (s) içinde olan, aksonemal yapının normal şekilli fakat çoklu aksonem yapısında olması dikkat çekmekte (►). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x20000**

## **GLOBOZOOSPERMİ GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Globozoospermi Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

Globozoospermi grubuna ait hastalardan alınan semen örnekleri rutin spermac boyası ile boyanıp yapılan incelemede sperm örneklerinin tamamen yuvarlak başlı görülürken baş bölgelerinde akrozom da tesbit edilemedi. Spermilerin orta kısımları başa aksiyel olarak bağlanmış durumdaydılar. Sitoplazmik kalıntılar belirgin oranda mevcutken, bazı spermelerde de normal baş alanının yarısından az miktarda vardı. Kuyruklar düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve normal uzunluklardı (Resim 19). Yuvarlak başlı spermilerin yanında pinhead anomalili ve amorf spermelerde eşlik etmekteydi. Yuvarlak başlı spermilerin bazılarında vakuol görüldü. Çoğu spermün boyun kısmında bölgesel mitokondri kaybı görüldü (Resim 20). Tip II defekt taşıyan ayrı bir grup hastanın spermelerinde ise akrozom kalıntıları görüldü. Koni şeklinde bir nükleuslarla beraber başlarda bir miktar akrozom varlığı olduğu görüldü. Az oranda spermde sitoplazmik kalıntılar olduğu izlendi. Tip II round spermilerin yanında pinhead sperm anomalisi de eşlik etmekteydi (Resim 21).

### **Globozoospermi Grubuna Ait MSOME Bulguları**

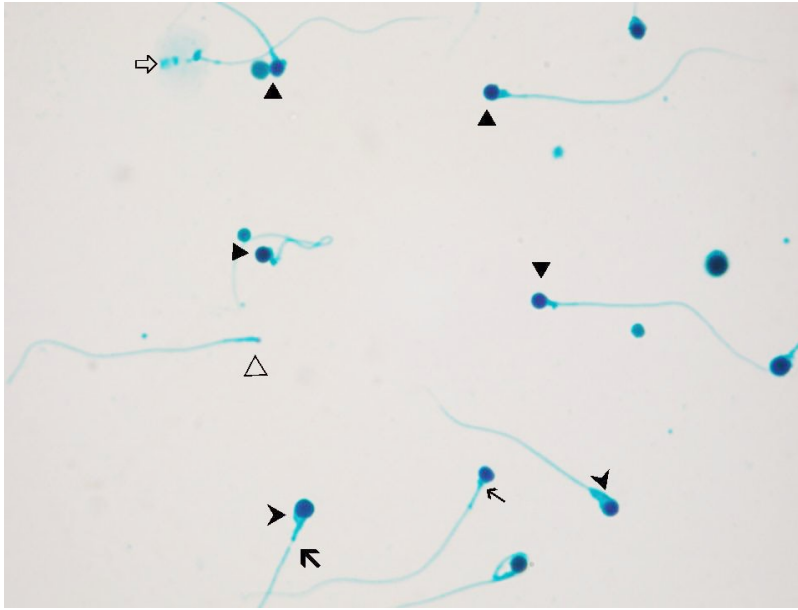
Globozoospermi grubunda yapılan MSOME işleminde sperm başları yuvarlak ve akrozom tesbit edilememiştir. Boyunlar baştan aksiyel olarak çıkışlı ve az oranda sitoplazmik kalıntılar içeriyorlardı (Resim 22). Mitokondriler spermilerin boyun kısımlarında düzgün yerleşimliydi. Bazın spermelerde boyun kısımlarında mitokondri eksikliğini ve dağınıklığını gösterecek bozukluklar tesbit edildi. Kuyruklar düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve normal uzunluğundaydı. Çoğu yuvarlak sperm başında büyük ve merkezi vakuol görüldü (Resim 23).

### **Globozoospermi Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular**

Globozoospermi grubunda yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede spermilerin başları yuvarlak ve akrozom tesbit edilemedi. Nükleuslar yuvarlak şekilli, kondanse kromatinliydi. Spermelerde sitoplazmik kalıntılar yoğun bir şekilde mevcuttu. Çoğu yuvarlak sperm başında büyük ve merkezi vakuol görüldü (Resim 24). Mitokondriler normal şekilli ve boynun her iki tarafında simetrik ve düzgün yerleşimliydi. Aksonemal yapılar düzgün şekilliydi (Resim 25). Dineyn kolları ve dış yoğun fibriller normal yapıdaydı. Gözlenen mikrotübül yapılarının bazılarında 9+2 yapısı görülürken bazılarında da 9+2 yapısından sapmalar da mevcuttu (Resim 26).

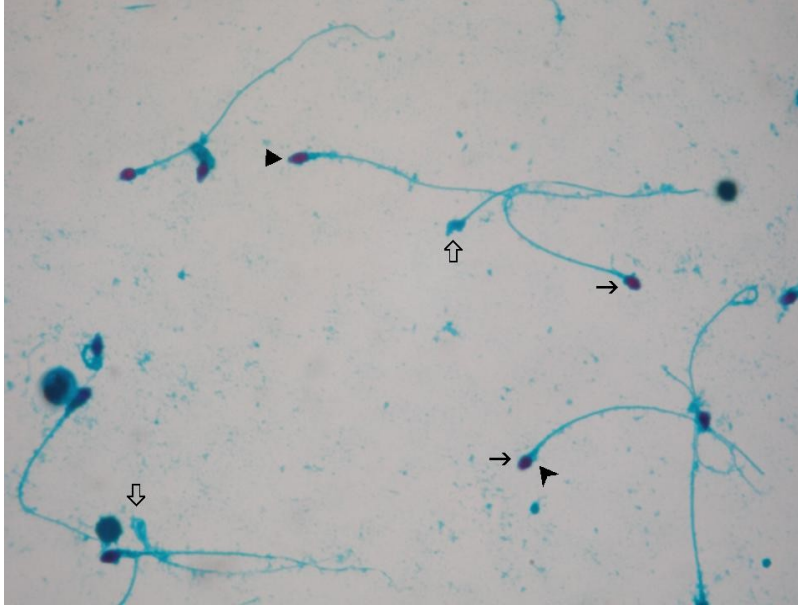


**Resim 19. Globozoospermi grubunun tipik sperm görüntüsü: Spermin başının tamamen yuvarlak olduğu izlenmekte. Baş bölgesinde akrozom tesbit edilememekte (▶). Orta kısım başa aksiyel olarak bağlanmış olduğu, düzgün kuyruk yapısı gözlenmekte (▶). Büyük oranda başı kaplayan sitoplazmik kalıntı dikkat çekmekte (→). Spermac Boyası, x1000**



**Resim 20. Globozoospermi grubunun genel görüntüsü: Değerlendirilen sperm başlarının tamamen yuvarlak olduğu ve akrozoma sahip olmadıkları izlenmekte (▶). Yuvarlak başlı spermelerin yanında pinhead sperm anomali (▽) ve amorf spermelerde eşlik etmekte (⇒). Spermilerin orta kısımları başa aksiyel olarak bağlandığı gözlenmekte (→). Birçok spermde sitoplazmik kalıntılar olduğu gözlenmekte (▶). Boyun kısmında bölgesel mitokondri kaybı dikkat çekmekte (↘). Spermac Boyası, x1000**



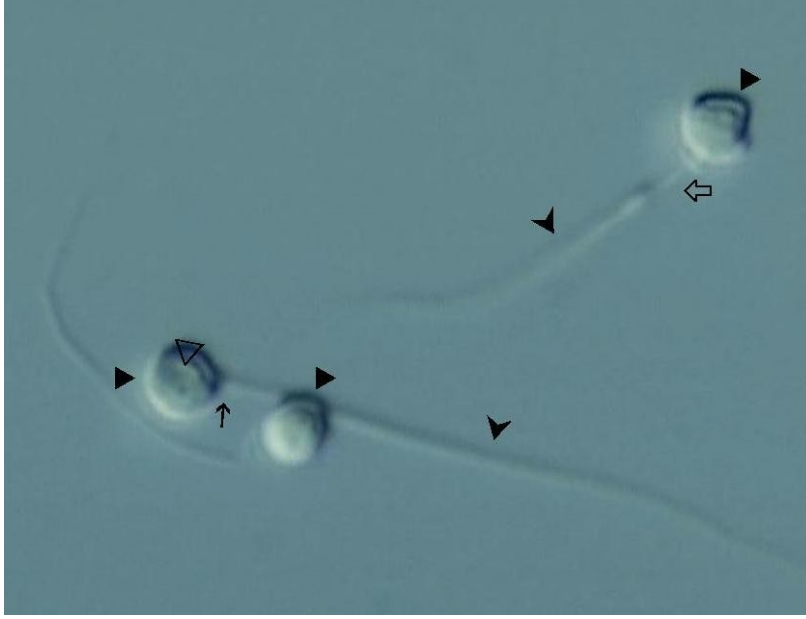


**Resim 21. Tip II Globozoospermi grubunun genel görüntüsü: Tip II round spermlerin tümünde akrozom kalıntıları gözlenmekte (▶). Az oranda sitoplazmik kalıntılar olduğu gözlenmekte (▷). Tip II round spermlerin yanında pinhead sperm anomalisi gözlenmekte (⇒). Tip II globozoospermi grubundaki spermlerde koni şeklinde bir nükleusla beraber bir miktar akrozom varlığı dikkat çekmekte (→). Spermac Boyası, x1000**



**Resim 22. Globozoospermi grubunun genel görüntüsü: Sperm başları yuvarlak ve akrozom varlığı gözlenmemekte (▶). Spermlerin boyun kısmında sitoplazmik kalıntılar izlenmekle birlikte (→), bu spermlerde mitokondri eksikliğini ve dağılımını gösterecek bozukluklar gözlenmemekte (▷). Kuyrukların düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış olması dikkat çekmekte (⇒). MSOME, x8050**

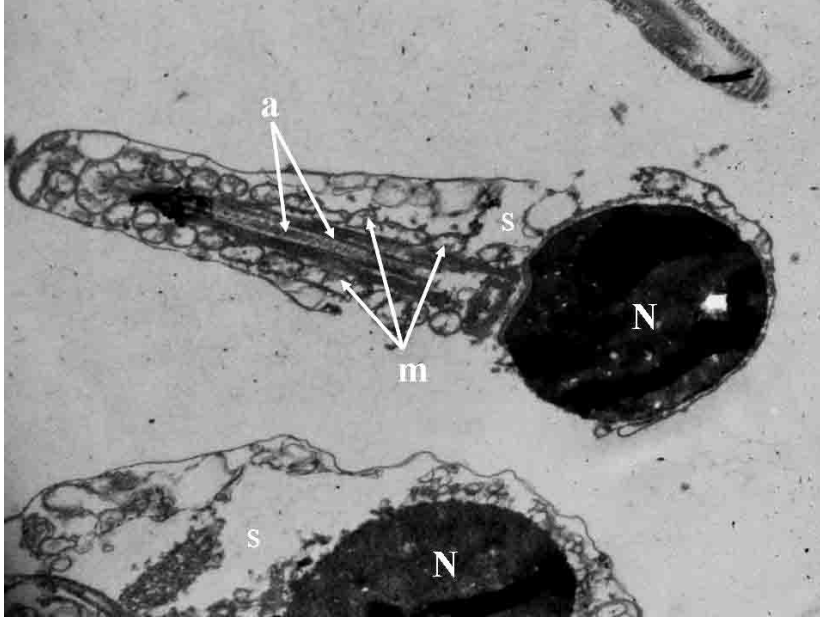




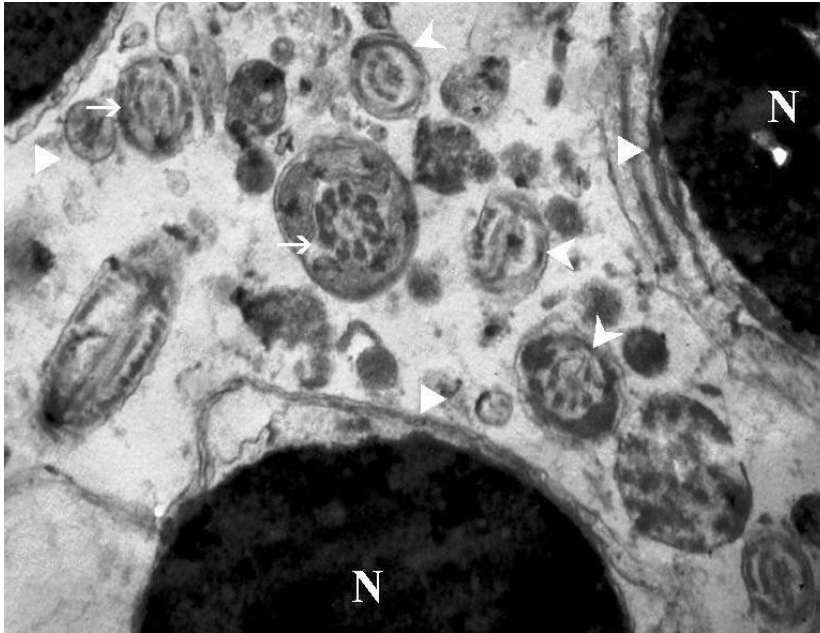
**Resim 23. Globozoospermi grubunun genel görüntüsü: Sperm başları yuvarlak ve akrozom varlığı gözlenmemekte (▶). Spermilerin boyun kısımları aksiyel çıkışlı olduğu görülmekte (→). Bazı spermilerin boynunda mitokondrilerin yokluğu gözlenmekte (⇨). Çoğu spermde büyük ve merkezi vakuol gözlenirken (▽), kuyrukların düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış olması dikkat çekmekte (▶). MSOME, x8050**



**Resim 24. Globozoospermi grubunun elektron mikroskop görüntüsü: Değerlendirilen spermilerin nükleusları yuvarlak şekilli, kondanse kromatinli olduğu izlenmekte (N). Çoğu spermde sitoplazmik kalıntı varlığı izlenirken (s), birçok spermde büyük ve merkezi vakuol dikkat çekmekte (v). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x20000**



**Resim 25. Globozoospermi grubunda elektron mikroskop görüntüsü: Sperm nükleusları yuvarlak ve akrozom varlığı gözlenmemekte (N). Aksonemal yapıların düzgün şekilli olduğu görülmekte (a). Sitoplazmik kalıntı birçok spermde gözlenmekte (s). Mitokondriler normal şekilli ve sperm boyun kısımlarının her iki tarafında simetrik yerleşimli görülmekte (m). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x20000**



**Resim 26. Globozoospermi grubunda elektron mikroskop görüntüsü: Sperm başları yuvarlak ve akrozom varlığı gözlenmemekte (►). Kondanse nükleuslar izlenmekte (N). Gözlenen 9+2 düzeninde mikrotübül yapıları ile birlikte (→). 9+2 mikrotübül yapısından sapmalar dikkat çekmekte (►). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x30000**

## **TAIL STUMP GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Tail Stump Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

Tail stump grubundaki hastalardan alınan semen örnekleri rutin spermac boyası ile boyanıp kruger kriterlerine değerlendirildiklerinde spermelerin baş şekilleri normal ve anormal şekilli olabilirken, bu spermelerin boyun, orta kısım ve kuyruk özelliklerinin anomaliler olduğu görüldü. Bazı spermelerde büyük sitoplazmik kalıntılar görüldü. Değerlendirilen birçok spermın kuyruk yapısının kısa olduğu görülmekle birlikte yoğunluklu olarak tail grubunun tipik morfolojisi olan kısa küt kuyruk yapıları dikkat çekti (Resim 27). Bazı spermelerde normal baş alanının yarısından az sitoplazmik kalıntı gözlemlendi. Serbest başların yoğun olarak eşlik ettiği gözlenirken nadiren de olsa normal boyutta kuyruklar görüldü (Resim 28). Genel olarak kısa kuyruk ve tail stump sendromunun tipik kısa küt biçimli kuyruk yapıları birlikte görüldü (Resim 29).

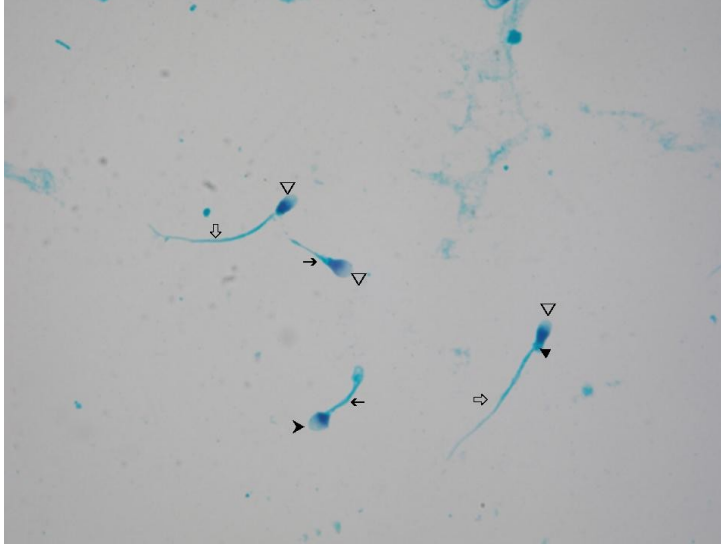
### **Tail Stump Grubuna Ait MSOME Bulguları**

Tail stump grubunda MSOME tekniğinin uygulanması zordur. Çünkü tail stump sendromunda hareketlilik yok denecek kadar azdır. Bu yüzden bu spermelerin değerlendirilmesi sadece yüksek büyütmede morfolojik analiz şeklinde incelenmiş oldu. MSOME ile değerlendirilen bu spermelerde akrozom başın ön kısmında, düzgün yapılı ve vakuol içermiyordu. Birçok boyun baştan aksiyel çıkışlı ve sitoplazmik kalıntılar içeriyordu (Resim 30). Kısa kuyruklu spermelerin yanında serbest başlı spermelerin eşlik ettiği görüldü. Mitokondriler spermelerin boyun kısmında dağınık yerleşimli, birçok spermın boyun kısmında mitokondri eksikliğini ve dağınıklığını gösterecek bozukluklar tesbit edildi. Bazı kuyruklar başa aksiyel olmayan pozisyonda bağlantılıydı (Resim 31). Tüm tail stump örneklerinde kısa kuyruk morfolojisi görülürken tail stump sendromunun tipik kısa küt biçimli kuyruk yapıları yoğunlukta vardı. Tail stump olarak değerlendirilen spermelerde bazı spermelerde vakuolizasyon gözlemlendi. Bazılarında da sperm başlarının genellikle yuvarlak ve akrozomsuz olması dikkat çekti (Resim 32).

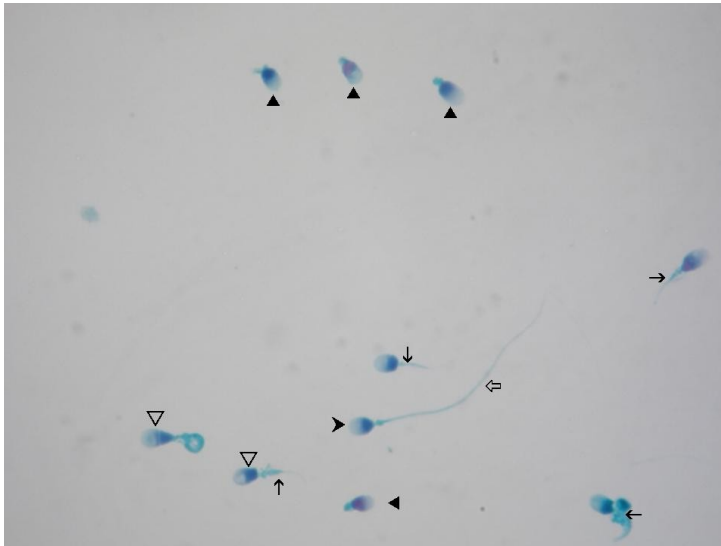
### **Tail Stump Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular**

Tail stump grubunda yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede; değerlendirilen spermelerin nükleusları normal şekilli ve olgun kromatinliydi. Birçok spermde sitoplazmik kalıntı yokken, mitokondriler yoğun ve dağınık yerleşimliydi (Resim 33). Fibröz kılıf yapısı değerlendirilebilen spermelerin fibröz kılıf yapısı bozuk ve parçalıydı (Resim 34). Birçok spermın akrozomal kep yapısının normal şekilli, devamlı, başın ön kısmını %50–65 oranında

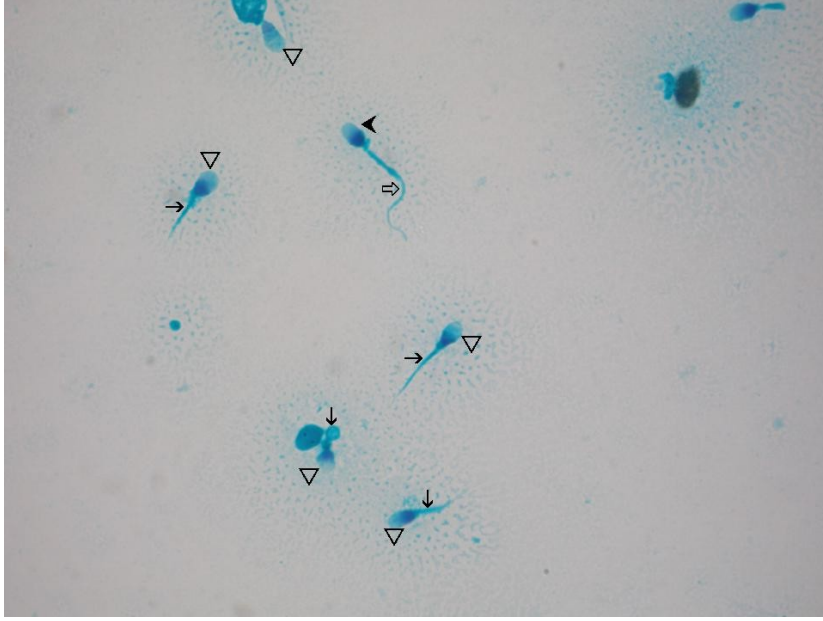
kaplayacak boyutlarda olduğu görüldü. Aksonemal yapıların birçoğu kısa olarak tesbit edildi (Resim 35). Gözlenen mikrotübül yapılarının dağınık yerleşimli ve 9+0, 8+0 mikrotübül yapısında olması dikkat çekti (Resim 36).



**Resim 27. Tail stump grubunun genel görüntüsü: Normal (▶) ve anormal şekilli sperm başları bir arada gözlenmekte (▽). Bazı spermelerde sitoplazmik kalıntılar gözlenmekte (▶). Kuyruk morfolojisi genellikle kısa kuyruk şeklinde (⇒) bununla birlikte tail stump sendromunun tipik kısa küt biçimli kuyrukları dikkat çekmekte (→). Spermac Boyası, x1000**



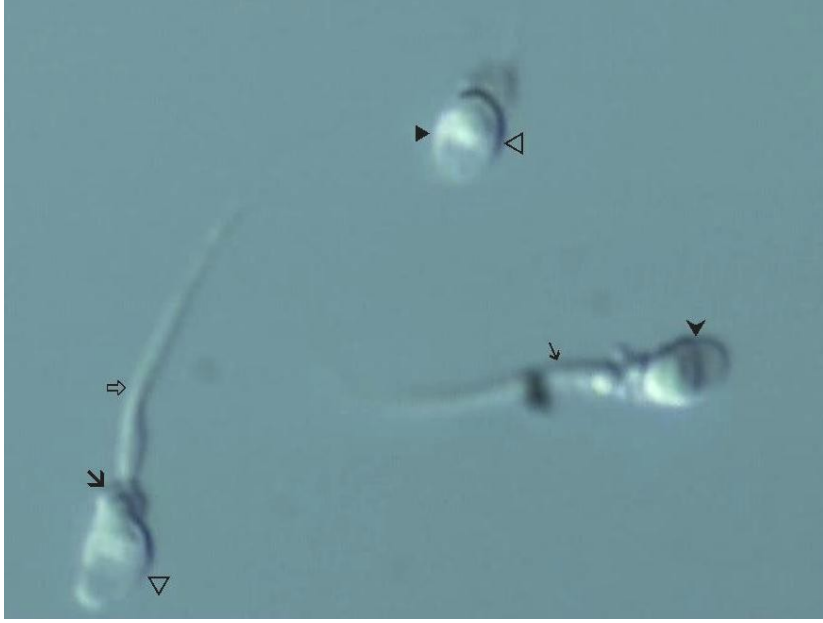
**Resim 28. Tail stump grubunun genel görüntüsü: Normal (▶) ve anormal şekilli sperm başları bir arada gözlenmekte (▽). Serbest başların yoğun olarak eşlik ettiği gözlenmekte (▶). Nadiren normal boyutta kuyruklar gözlenirken (⇒), tail stump sendromunun tipik kısa küt biçimli kuyrukları dikkat çekmekte (→). Spermac Boyası, x1000**



**Resim 29. Tail stump grubunun genel görüntüsü: Değerlendirilen sperm başlarının normal (▶) ve anormal şekilli olabildiği gözlenmekte (▽). Kuyruk morfolojisi genellikle kısa kuyruk şeklinde (⇔), bununla birlikte tail stump sendromunun tipik kısa küt biçimli kuyrukları dikkat çekmekte (→). Spermac Boyası, x1000**



**Resim 30. Tail stump grubunun genel görüntüsü: Normale yakın (▶) ve anormal sperm başları gözlenebilmekte (▽). Birçok spermın boyun kısmında sitoplazmik kalıntılar izlenmekte (▶). Değerlendirilen spermelerin genelinde kısa kuyruklar görülmekte (⇔) bununla birlikte yoğunluklu olarak kısa ve küt biçimli kuyruklar dikkat çekmekte (→). MSOME, x6000**

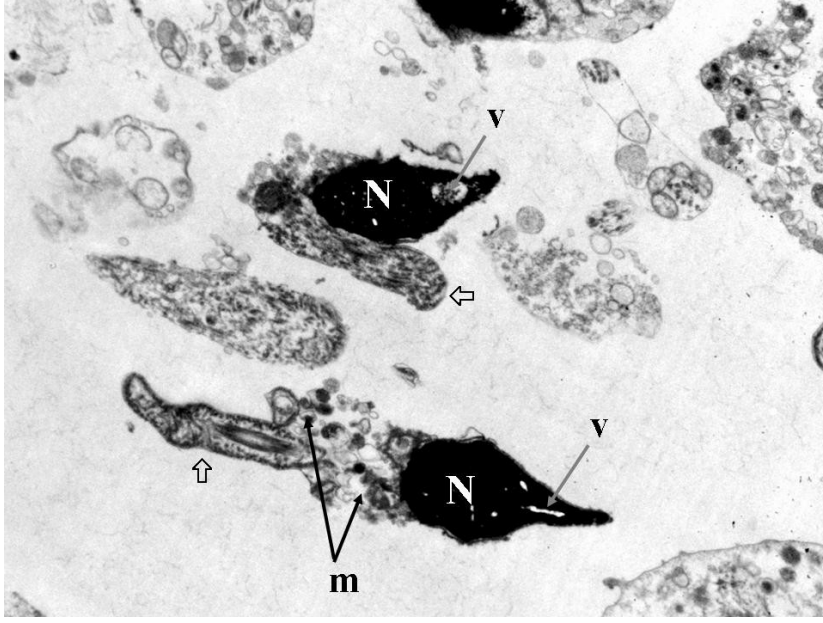


**Resim 31. Tail stump grubunun genel görüntüsü: Kuyruk başa aksiyel olarak bağlanmadığı izlenmekte (↘). Normale yakın (▶) ve anormal şekilli sperm başları bir arada gözlenirken (▽), serbest başlar da eşlik etmekte (▶). Kuyruk morfolojisi genellikle kısa kuyruk şeklinde (⇒) bununla birlikte tail stump sendromunun tipik kısa küt biçimli kuyrukları dikkat çekmekte (→). MSOME, x8050**

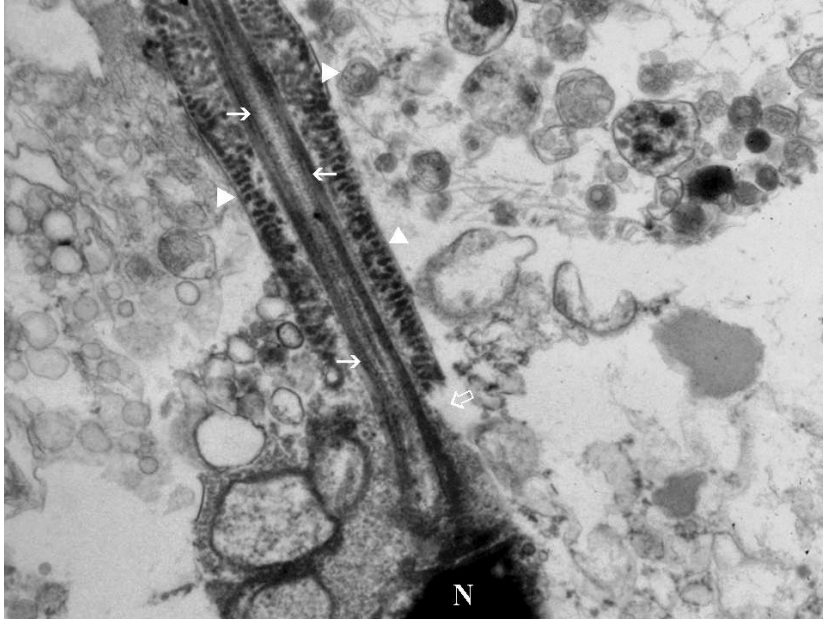


**Resim 32. Tail stump grubunun genel görüntüsü: Değerlendirilen bazı hastalarda sperm başları yuvarlak görülmekte (▶). Bu spermelerin boyun, orta kısım ve kuyruk özelliklerinin anormal olduğu izlenmekte. Tail stump sendromunun tipik kısa ve küt biçimli kuyruk yapılarında eşlik etmesi dikkat çekmekte (→). MSOME, x8050**

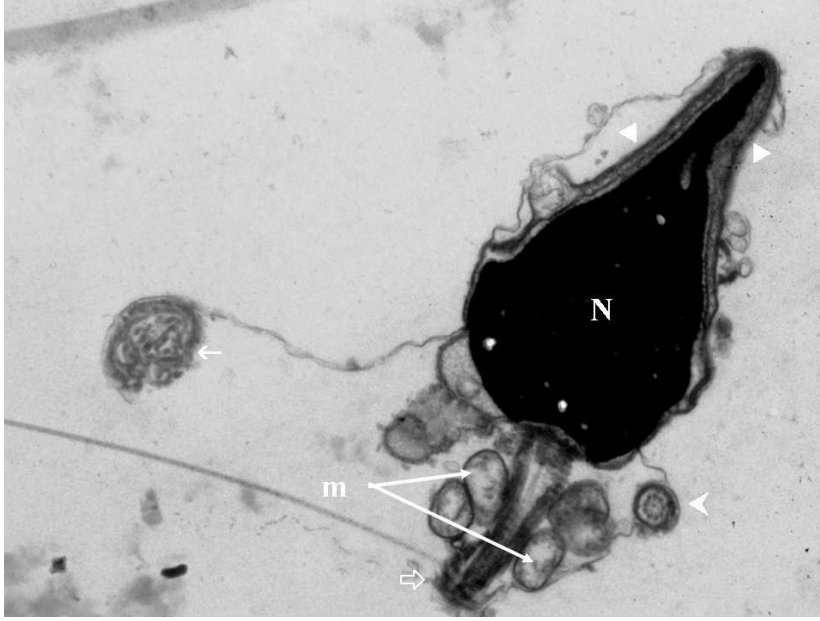




**Resim 33. Tail stump grubunda transmisyon elektron mikroskop görüntüsü: Değerlendirilen nükleusların birçoğunun normal şekilli, olgun kromatinli (N) ve vakuollü olduğu izlenmekte (v). Mitokondrilerin yoğun ve dağınık yerleşimli olması dikkat çekmekte (m). Aksonemal yapıların oldukça kısa olduğu gözlenmekte (⇨). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x10000**



**Resim 34. Tail stump grubunda fibröz kılıf görüntüsü: Düzgün aksonem yapısı gözlenmekte (→). Fibröz kılıf yapısının bazı bölgelerde düzgün (▶) bazı bölgelerde bozuk ve parçalı olması dikkat çekmekte (⇨). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x25000**



**Resim 35. Tail stump grubunda normal başlı sperm görüntüsü: Akrozomal kep normal şekilli, devamlı ve yoğun içeriğe sahip olduğu gözlenmekte (▶). Nükleus normal şekilli, olgun kromatinli ve vakuollü olarak izlenmekte (N). Sitoplazmik kalıntı yok ve mitokondriler normal şekilli ve düzgün yerleşimli görülmekte (m). Aksonemal yapı oldukça kısa izlenmekte (⇒). Gözlenen düzgün (▶) ve dağınık yerleşimli (→) mikrotübül yapıları dikkat çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, x20000**



**Resim 36. Tail stump grubunda mikrotübül görüntüleri: Gözlenen mikrotübül yapılarında 9+2 mikrotübül yapısından sapmalar mevcuttu. Dağınık yerleşimli 9+0 (▶), 8+0 (→) gibi mikrotübül yapıları dikkat çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, x40000**



## **TOTAL PİNHEAD GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Total Pinhead Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

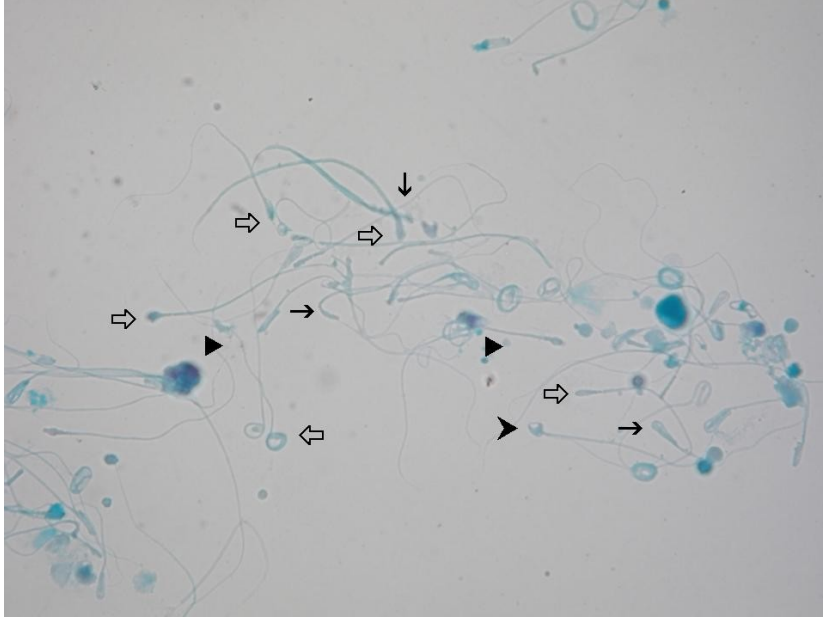
Total pinhead grubuna ait iki hastadan alınan semen örnekleri ve rutin spermac boyası ile boyanıp kruger kriterlerine göre değerlendirme yapıldığında bir hastada hiç başlı sperm gözlenmezken bir hastada çok nadir gevşek bağlantılı spermler gözlendi. Bu spermlerin boyun, orta kısım ve kuyrukları değişkenlik göstermekle birlikte normal aralıklarda olduğu görüldü. Pinhead spermlerin boyun kısmının ucunda sitoplazmik kalıntılar vardı (Resim 37). Başsız spermlerin çoğunda düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve normal uzunlukta kuyruk yapıları görüldü (Resim 38). Düzgün kuyruk yapıları ile birlikte boyun kısmında baş görüntüsü veren sitoplazmik kalıntılar dikkat çekti (Resim 39).

### **Total Pinhead Grubuna Ait MSOME Bulguları**

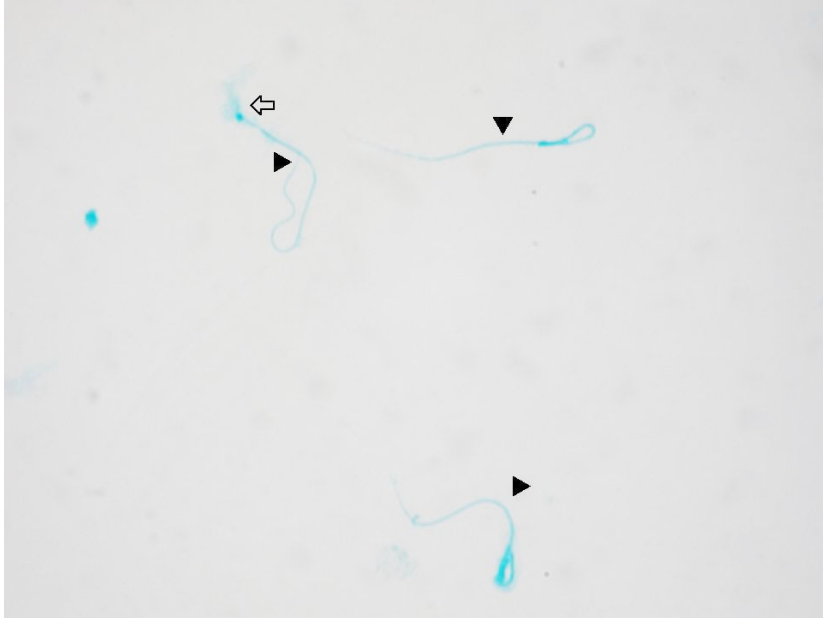
Total pinhead grubunda yapılan MSOME işleminde genellikle düzgün kuyruk yapılarına sahip başsız spermler görüldü. Çok nadir olarak boyun kısmına aksiyel olmayan ve gevşek bağlanmış baş içeren spermler de görüldü (Resim 40). Bir hastamızda baş içeren sperm gözlenmezken, düzgün kuyruk yapılarına ve boyun sahip başsız spermlerle gözlendi (Resim 41). Boyun kısmındaki baş görüntüsü veren sitoplazmik kalıntıyı içeren başsız spermler dikkat çekti (Resim 42).

### **Total Pinhead Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular**

Total pinhead grubunda yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede enine ve yatay olarak kesilmiş kuyruk parçaları dikkat çekti. (Resim 43). Değerlendirilen mikrotübül yapılarının 9+2 yapısında olduğu görüldü (Resim 44). Hastalarda normal kuyruk yapısı ve birkaç baş sonlanması ile birlikte hiçbir nükleer içerik gözlenmedi. Mitokondriler boyun kısmında simetrik ve düzgün yerleşimliydi. Nadiren bazı spermlerin boyun kısmında mitokondri eksikliğini ve dağılımını gösterecek bozukluklar tesbit edildi. Aksonemal yapılar genelde normal olması dikkat çekti (Resim 45).



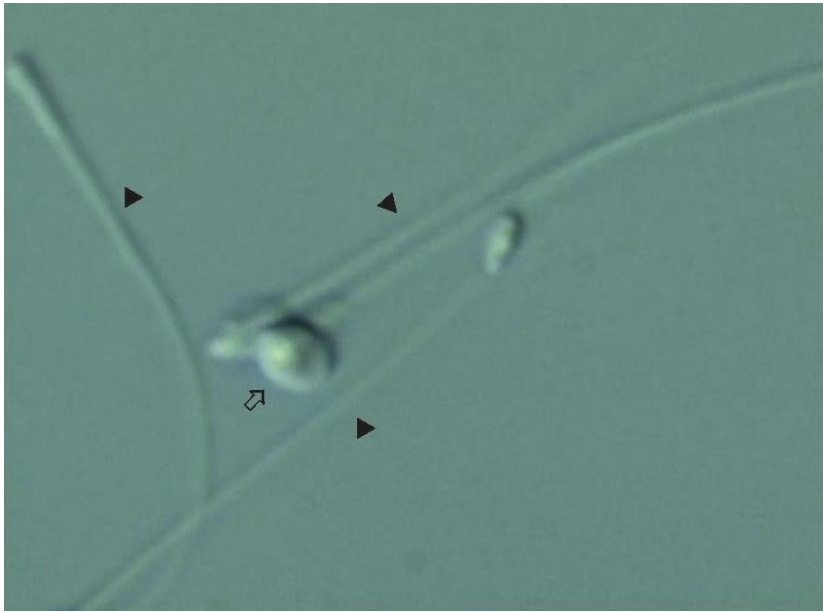
**Resim 37. Total pinhead grubunun genel görüntüsü: Yoğun başsız spermelerin (⇨) arasında nadir serbest başlar gözlenmekte (▶). Boyun, orta kısım ve kuyruk değişkenlik göstermekle birlikte normal aralıklarda olduğu izlenmekte (→). Boyun kısmının ucunda sitoplazmik kalıntılar dikkat çekmekte (▶). Spermec Boyası, x1000**



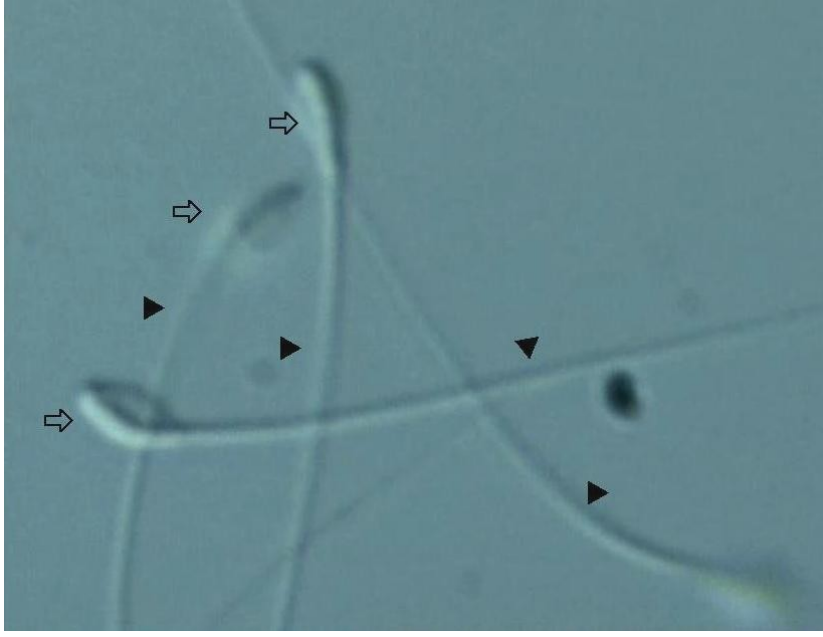
**Resim 38. Total pinhead grubunun genel görüntüsü: Başsız spermeler düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve normal uzunlukta kuyruklar şeklinde gözlenmekte (▶). Boyun kısmında sitoplazmik kalıntılar dikkat çekmekte (⇨). Spermec Boyası, x1000**



**Resim 39. Total pinhead grubunda sperm görüntüsü: Düzgün kuyruk yapısı ile birlikte (→) boyun kısmında baş görüntüsü veren sitoplazmik kalıntı dikkat çekmekte (▶). Spermac Boyası, x1000**



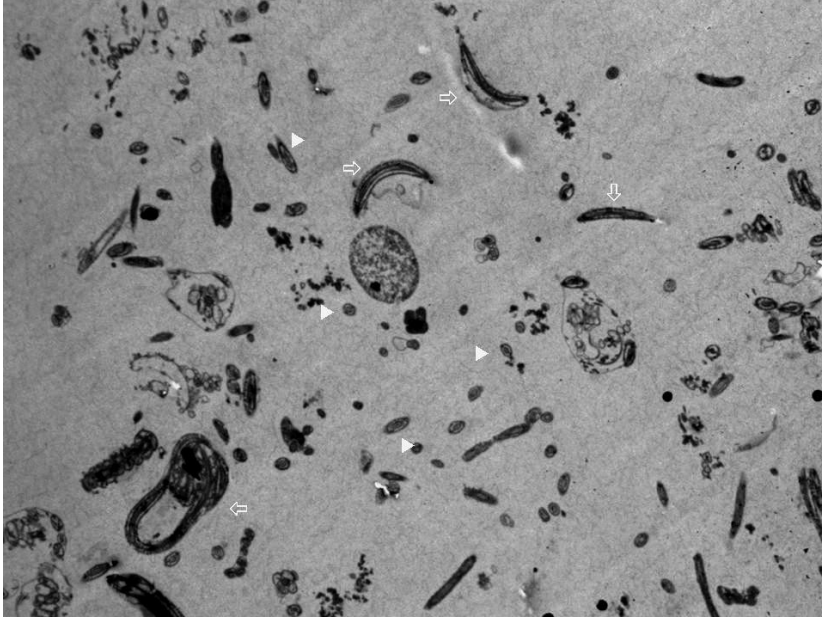
**Resim 40. Total pinhead grubunun genel görüntüsü: Düzgün kuyruk yapılarına sahip başsız spermlerle (▶) birlikte, boyun kısmına aksiyel olmayan ve gevşek olarak bağlanmış baş dikkat çekmekte (⇨). MSOME, x8050**



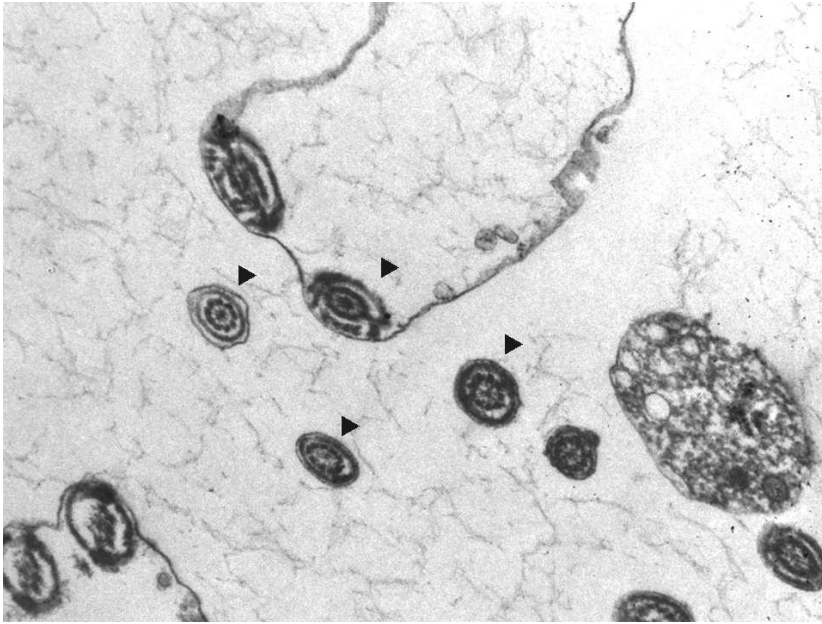
**Resim 41. Total pinhead grubunun genel görüntüsü: Düzgün kuyruk yapılarına sahip başsız spermlerle (▶) birlikte boyun kısmında baş görüntüsü veren sitoplazmik kalıntılar dikkat çekmekte (⇨). MSOME, x8050**



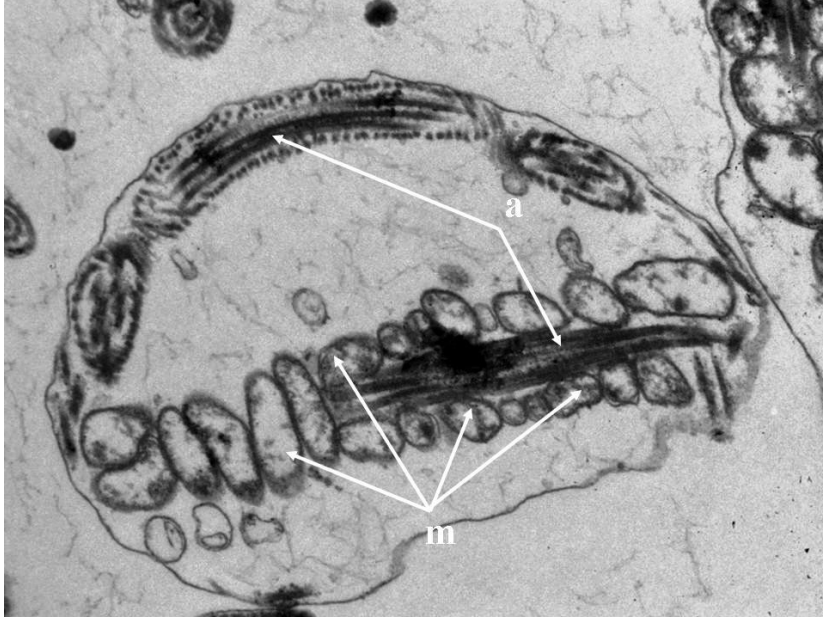
**Resim 42. Total pinhead grubunda sperm görüntüsü: Düzgün kuyruk yapısına sahip başsız spermin (▶) boyun kısmındaki baş görüntüsü veren sitoplazmik kalıntısı dikkat çekmekte (⇨). MSOME, x8050**



**Resim 43. Total pinhead grubunun elektron mikroskop görüntüsü: Enine (►) ve yatay (⇒) olarak kesilmiş kuyruk parçaları dikkat çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, x5000**



**Resim 44. Total pinhead grubunun mikrotübül görüntüleri: Gözlenen mikrotübül yapılarının düzgün ve 9+2 yapısında olması dikkat çekmekte (►). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x30000**



**Resim 45. Total pinhead grubunda boyun görüntüsü: Normal kuyruk ve birkaç baş sonlanması ile birlikte hiçbir nükleer içerik gözlenmemekte, bununla birlikte düzgün aksonem yapısı izlenmekte (a). Boyunda düzgün ve simetrik yerleşimli mitokondriler dikkat çekmekte (m). Uranil asetat-Kurşun sitrat, x30000**

## TARTIŞMA

İnfertilite en az bir yıl süre ile herhangi bir korunma yöntemi olmaksızın çiftlerin çocuk sahibi olamalarıdır. İnfertil çiftlerin yaklaşık yarısı erkeğe ait sebeplerle ortaya çıkmaktadır. Bunların %30-50'sinde de etiyoloji saptanamamaktadır. Etiyolojisi saptanamayan kişilere erkek infertilitesinin nedeninin tanımlanmasını sağlayacaksa ve tedaviyi yönlendirebilecekse yapılmalıdır (10). Semen analizi değerlendirmesi erkek infertilitesi ile ilgili değerli veriler elde etmemizi sağlamakta ve infertilite tedavisinde erkeğe yapılan ilk test olarak tedaviyi yönlendirmektedir (6,10).

Şiddetli erkek kısırlığına sebep olan morfolojik sperm anomalileri megalohead, tail stump, globozoospermi, total pinhead anomalilerine sahip spermler olduğu bilinmektedir. Bu spermlerde yapılan ICSI işlemlerinde ortak sonuç; düşük fertilizasyon oranları, kötü ve/veya yavaş embriyo gelişimi, yüksek anoploidi oranları, düşük implantasyon ve gebelik oranları olduğu, fertilitiyi çok ciddi etkilediği ve tüp bebek işlemlerinde başarı oranlarını ciddi derecede düşürdüğü bilinmektedir (29, 50, 61).

Çalışmamızda; şiddetli erkek kısırlığına sebep olan morfolojik sperm anomalilerine sahip hastalar ile son bir yıl içerisinde herhangi bir tedavi almadan doğal yolla canlı çocuk sahibi olan erkek bireylerin semen örneklerini kontrol grubu olarak incelenmeye aldık.

Çalışmamızda; şiddetli erkek kısırlığına sebep olan sperm morfolojilerinin, genel morfolojik değerlendirilmesinin yanında MSOME ile gerçek zamanlı spermin morfolojik değerlendirilmesi ve elektron mikroskopuyla da ultrastrüktürel yapıların hangi düzeyde etkilendiğine dair bilgiler elde etmeyi planladık. Böylelikle bu sperm morfolojilerinin anlaşılması, tedavinin yönlendirilmesi ve sperm morfolojisi değerlendirilirken kullanılan yöntemlerin birbirine olan avantaj ve dezavantajları ile üremeye yardımcı tedavi

merkezlerinin işlem sırasında sperm seçimi ve değerlendirmesi için önceden elde edilecek bilgilerle tedaviye yarar sağlamayı amaçladık.

Kruger ve arkadaşlarının (14) yaptığı ve hala en geçerli morfoloji değerlendirmesinde normal sperm; sperm baş bölgesinin %40-70'ini kapsayan iyi belirlenmiş bir akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım ince uzun ve genişliği 1 µm'den az, boyu baş uzunluğunun 1.5 katı ve başa aksiyel olarak bağlanmış olmalıdır. Sitoplazmik artıklar normal baş alanının yarısından az olmalıdır. Kuyruk düz, düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 45 µm uzunlukta olmalı ve bu sperm morfolojisine total spermlerin en az %4 ve üzeri oranda spermin uyması gerekir şeklinde tanımlanmıştır.

Çalışmamızda da fertil bireylerin spermac boyası ile boyanan sperm örnekleri Kruger kriterlerine göre değerlendirildiğinde normal sperm morfolojisi ile uyumlu bulgular bulduk. Anormal morfolojili gözlenen spermlerle birlikte birçok spermin normal veya normale yakın olduğunu gördük.

Bartoov ve arkadaşları (36) yaptıkları çalışmalarda gerçek zamanlı hareketli sperm hücrelerinin ayrıntılı morfolojik değerlendirmesine yönelik yeni bir metot geliştirmişlerdir. MSOME olarak tanımlanan bu metot, invert ışık mikroskopunda dijital görüntüleme ile 6300x – 8050x büyütme elde edebilmişlerdir. MSOME karakteristikleri ve ICSI sonucunun arasındaki ilişkiyi değerlendirmiş ve vakuollü spermlerin mikroenjeksiyonun erken abort ve düşük gebelik oranları ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir.

Çalışmamızın kontrol grubunda Bartoov ve arkadaşlarının (36) yaptıkları çalışmalarda MSOME işleminde elde ettiğimiz verilerin uyumlu olduğunu gördük. Görülen normal yapıdaki spermlerin kullanılabilmesini büyük bir avantaj olarak düşündük.

Eliasson ve arkadaşları (49, 50) normal spermin ultrastrüktürel yapısını yaptıkları tanımlamada; tümünün plazma membranı ile örtülü olduğu tek bir normal spermde akrozomal kepin devamlı ve normal pozisyonda, normal şekilli, boyutlarda ve yoğun içeriğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Nükleusun normal şekilli, olgun kromatinli yapısında olduğunu ve spermin sitoplazmik kalıntı içermediğini gözlemlemişlerdir. Mitokondrilerin normal şekilli ve aksonemin her iki tarafında düzgün yerleşimli olmasının yanında, kuyrukta dokuz çevresel mikrotübül çifti ile birlikte iki merkezi mikrotübül yapısını ( $9 \times 2 + 2$  yapısı) göstermişlerdir.

Yaptığımız elektron mikroskopik incelemenin kontrol grubunda akrozomal kepin normal şekilli, devamlı, başın ön kısmını %60 oranında kaplayacak boyutta gördük. Nükleus normal şekilli, olgun kromatinliyen, gözlenen mikrotübül yapılarının 9+2 yapısında olduğunu gördük. Mitokondrilerin normal şekilli ve boyun kısmının her iki tarafında simetrik yerleşimli olduklarını gözlemledik. Çalışmamızda literatürle ilgili benzer bulgular elde ettik.



Nistal ve arkadaşları (57) tarafından tanımlanan sperm şekil bozukluklarının çok özel bir türü olan megalohhead, düşük hareketliliğe sahip sperm varlığı, değişken sayıda kuyruk yapısı, düzensiz büyük boyutlu kafaların varlığı ile karakterize olduğunu, pinhead anomalili spermelerin yanında anormal morfolojili spermelerin çeşitli oranlarla eşlik ettiğini bildirmişlerdir. Kahraman ve arkadaşlarının (61) yaptıkları çalışmada megalohhead sperm örneklerinde, en önemli morfolojik belirtileri kuyrukları olmayan çok sayıda başa sahip sperm ve ejakülatta veya testiküler sperm ekstraksiyon solüsyonlarında bol miktarda olgunlaşmamış spermatid bulunduğunu bildirmişlerdir.

Megalohhead grubuna ait hastalardan alınan semen örneklerinin genel değerlendirmesinde, çoklu kuyruk yapısı, düzensiz büyük boyutlu sperm başları, çoğu örnekte gözlenen pinhead anomalisine sahip sperm, amorf veya düzensiz kafa şekilleri ile birlikte, akrozom kısımlarında akrozomal kistler gözledik.

Çalışmamızın megalohhead grubunda yapılan MSOME incelemesinde nükleer kısmı genellikle büyük, şekilsiz ve bozuk konfigürasyonlu iken vakuol içeren birçok sperm gördük. Yaptığımız çalışmada makrosefal spermelerin MSOME incelemesinde ışık değerlendirmesi ile benzer sonuçlar elde ettik. MSOME işleminde görülen normale yakın boyuttaki spermelerin kullanılabilmesini büyük bir avantaj sağlayabileceğini düşündük.

Escalier 1983'te (26) yaptığı çalışmada 6 infertil adamdan büyükbaşlı ve çok kuyruklu sperm hücrelerinin nicel bir morfolojisini tanımlamıştır. Megalohhead sperm hücrelerinin diğer elektron mikroskopik çalışmalarında (35,42), bu hücrelerin başında birkaç nükleus açıkça ayırt edebilmişlerdir, bunuda mayozun spermiogenez I veya spermatogenez II aşamasında oluşabilecek hatalardan dolayı meydana gelebileceğini fikrini ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda genel itibariyle tüm spermelerde nükleer yapının çift veya büyük olduğunu gördük. Çoklu kuyruk yapısına daha çok boyuna ve enine kesitlerde rastladık. Bu aksonemlerde 9+2 mikrotübül yapısından sapmalar gördük. Elektron mikroskopik değerlendirmemizin literatürle benzer sonuçlar verdiğini tesbit ettik.

Singh ve arkadaşlarının (90) yaptığı çalışmada globozoospermi'nin iki alt tipi tanımlanmıştır. Tip I globozoospermi'de akrozom içeriğinin tamamen yokluğu şeklinde tanımlanmıştır. Aksonem ve kuyruksu da mitokondri ve mikrotübüllerde yapısal bozukluklarla birlikte akrozomların olmadığını bildirmişlerdir. Globozoosperminin Tip II grubunda ise akrozom kalıntıları bulunabileceği ve koni şeklinde bir nükleusla beraber nükleus etrafında sitoplazmik halkacıklar olduğunu belirtmişlerdir (28).

Çalışmamızda, Tip I globozoospermi grubunda spermelerin başlarının tamamen yuvarlak olduğunu ve baş bölgesinde akrozomun olmadığını gördük. Sitoplazmik kalıntılar

belirgin iken, pinhead anomalisi ve şekilsiz spermlerin eşlik ettiğini gözledik. Globozoosperminin Tip II grubundaki spermlerde koni şeklinde bir nükleusla beraber bir miktar akrozom varlığı dikkat çekiciydi. Çalışmamızda literatürle uyumlu bulgular gözlemledik.

Globozoosperminin MSOME tekniğiyle incelenmesinde sperm başlarının yuvarlak olduğu ve sperm başlarının akrozom içermediğini gördük. Nükleer bölgelerde DNA hasarını olarak tahmin edilen büyük vakuoller gözledik.

Singh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (90), Tip I globozoospermide kromatinin sferik olarak dağıldığını ve akrozomun tamamen yokluğunu bildirmişlerdir. Aksonem, kuyruk, mitokondri ve mikrotübüllerde yapısal bozukluklar ile birlikte sperm başında büyük vakuollere rastlandığı belirtilmiştir.

Elektron mikroskopik incelemenin globozoospermi grubunda sperm başlarının akrozom içermediği, yuvarlak şekilli ve merkezi bir vakuol içerdiğini tesbit ettik. 9+2 yapısında ve 9+2 yapısından sapmalar içeren mikrotübül yapıları gördük. Elektron mikroskopik değerlendirmemizde literatürle benzer sonuçlar elde ettik.

Chemes ve arkadaşları (96) tarafından tanımlanan tail stump spermlerin total hareketsizliği ve sperm fibröz kılıf organizasyonunda ciddi sorunlara yol açmasıyla karakterize olduğunu bildirmişlerdir. Kuyruk özel bir şekilde kısa ve kalın kalmasına bağlı güdük kuyruk sendromu olarak belirtilmiştir.

Tail stump grubunda yaptığımız genel değerlendirmede kısa kuyruklar ile birlikte kısa küt biçimli kuyruk yapılarını gördük. Serbest başlarla birlikte nadir olarak normal boyutta kuyruklar da gördük.

Tail stump grubunda MSOME tekniği uygulanması hareketli sperm yüzdesi çok az olduğundan, yüksek büyütmede morfoloji değerlendirmesi yaptık. Kuyrukların genellikle kısa ve küt biçimli kuyruk yapılarını da yoğun olarak gördük. Yaptığımız çalışma sonucunda ışık değerlendirmesi ile benzer sonuçlar elde ettik. Bununla birlikte normale en yakın uzun kuyruklu sperm seçimi için IMSI yönteminin uygun olabileceğini düşündük.

Fibröz kılıf displazi veya tail stump sendromu Mitchell ve arkadaşları tarafından (101) 2006 yılında 6 farklı tipte tanımlanmıştır. Çalışmamızın tail stump grubunda yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede; fibröz kılıf yapısı bazı bölgelerde devamlı iken bazı bölgelerde bozuk ve parçalı olduğunu gördük. Mikrotübül yapılarının incelenmesinde; 9+2 yapısından sapmalar (9+0, 8+0) ile birlikte mikrotübül yapılarının dağınık yerleşimli olduğunu gördük.

Perotti ve arkadaşları (102), infertil bir hastada sperm hücrelerinin çoğunun hiçbir baş içermediği ve bu sperm hücrelerinin kafasının koptuğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızın total pinhead grubunun genel değerlendirmesinde, yoğun olarak boyun kısmında sitoplazmik kalıntı görülen başsız spermier gözledik. Bunun yanında çok nadir olmakla birlikte baş içeren spermier de mevcuttu. Bulgularımız daha önceki çalışmalarda elde edilen bulgularla benzer olduğunu gördük.

Total pinhead grubu MSOME yönteminde düzgün kuyruk yapılarına sahip başsız spermier görülmekle birlikte çok nadir olarak boyun kısmına gevşek bağlanmış baş içeren spermier de gördük. Çalışmamızda ışık mikroskobu değerlendirilmesiyle benzer sonuçlar verdiğini gördük. Görülen baş içeren spermierin kullanılabilir olması büyük bir avantaj sağlayacağını düşündük.

Chemes ve arkadaşları (103, 104) yaptıkları çalışmalarda pinhead spermierleri orta kısım bağlanma yapısındaki bozukluklardan kaynaklandığını göstermişlerdir. Çalışmamızın elektron mikroskopik değerlendirmesinde enine ve yatay olarak kesilmiş kuyruk parçaları gördük. Gözlediğimiz mikrotübüller yapılarının 9+2 yapısında olduğunu gördük.

Çalışmamızda; şiddetli erkek kısırlığına sebep olan morfolojik sperm bozukluklarına uygulanan genel morfolojik değeri lenmenin yanında MSOME ile gerçek zamanlı spermier morfolojik değeri lenilmesi ve elektron mikroskobunda yaptığımız değeri lenmelerde, grupların birbirinden bağımsız olarak daha önceki çalışmalarla benzer sonuçlar verdiğini ve her bir ayrı değeri lenirme yönteminin birbirini destekler bulgular verdiğini gördük.

Buna dayanarak MSOME yöntemi ile sperm morfoloji değeri lenmesinin bize yeterli bilgiyi verebileceğine, bu teknik gerçek zamanlı olduğundan tüp bebek ve kısırlık tedavisinde ICSI yerine IMSI metodunun kullanılması, tüp bebek merkezlerinin başarı yüzdelerini arttırabileceği kanaatine vardık.

## SONUÇ

Şiddetli erkek kısırlığına sebep olan morfolojik sperm anomalilerinin ışık mikroskobu, MSOME ve elektron mikroskobu gibi değişik yöntemlerle ve fertil bireylerin spermleri ile karşılaştırmalı incelenmesini araştırmak amacı ile planladığımız çalışmamızda, megalohead grubunda çoklu kuyruk yapıları, düzensiz ve büyük boyutlu sperm başları ile birlikte pinhead anomalisine sahip spermlerin de eşlik ettiği görüldü. Tip I globozoospermi grubunda sperm başlarının yuvarlak ve akrozomdan yoksun olduğu gözlenirken, globozoosperminin Tip II grubunda ise, koni şeklinde bir nükleus ve az bir miktar akrozom varlığı dikkatimizi çekti. Tail stump grubunda kısa ve küt biçimli kuyruk şekillerinin yanında, mikrotübül yapılarının dağılık ve 9+2 yerine 9+0 yapısında olduğu saptandı. Total pinhead grubunda ise çok nadir başlı spermler görülürken, mikrotübül yapısının 9+2 olması dikkat çekiciydi. Yapılan üç ayrı değerlendirme yöntemlerinde de birbirini destekler tarzda bulgular elde ettik.

Sonuç olarak denebilir ki, ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerin yanında, yeni bir teknoloji olan MSOME yöntemi ile sperm morfoloji değerlendirmesinin bize yeterli ve kısa sürede bilgi verebileceğine, bu teknikle incelenen spermin kullanılmasıyla geliştirilen IMSI metodunun ICSI'ye göre tüp bebek merkezlerinin başarı yüzdelerine önemli ölçüde katkı sağlayabileceği kanısına vardık.

## ÖZET

İn vitro fertilizasyon başarısının sınırlarını belirleyen en önemli faktörlerden biri erkek kısırlığıdır. İyi kalitede sperm enjeksiyonu ve ileri düzey sperm hazırlama prosedürlerine rağmen her enjekte edilen sperm dölleme sağlamamaktadır. Dölleme elde edilen embriyolarda da geç gelişim göstermekte ve in vitro fertilizasyon başarısını önemli derecede düşürmektedir.

Çalışmamızda şiddetli erkek kısırlığına sebep olan anomalili spermilerin ışık mikroskopunda genel değerlendirmesi, hareketli sperm organel morfolojisi değerlendirmesiyle 8050x gibi yüksek büyütmede gerçek zamanlı değerlendirmesi ve elektron mikroskopik değerlendirmeyle de bu spermilerin ince yapılarının ne düzeyde etkilendiğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu sperm morfolojileri ilk olarak bu çalışmada bir arada ve üç ayrı yöntemle değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışmamızın megalohhead grubunda çoklu kuyruk yapıları, düzensiz ve büyük boyutlu sperm başları ile birlikte pinhead anomalisine sahip spermilerin de eşlik ettiği görüldü. Tip I globozoospermi grubunda sperm başlarının yuvarlak ve akrozomdan yoksun olduğu gözlenirken, Tip II globozoospermi grubunda ise, koni şeklinde bir nükleus ve az bir miktar akrozom varlığı dikkatimizi çekti. Tail stump grubunda kısa ve küt biçimli kuyruk şekillerinin yanında, mikrotübül yapılarının dağınık ve 9+2 yerine 9+0 yapısında olduğu saptandı. Total pinhead grubunda ise çok nadir başlı spermeler görülürken, mikrotübül yapısının 9+2 olması dikkat çekiciydi. Yapılan 3 ayrı değerlendirme yöntemlerinde de bulgular birbirini destekler tarzda idi.

Sonuç olarak, ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerin yanında, yeni bir teknoloji olan hareketli sperm organel değerlendirmesinin, yeterli ve kısa sürede bilgi verebileceğine,

bu teknikle incelenen spermin kullanılmasıyla geliştirilen yüksek büyütmede seçilmiş sperm enjeksiyonunun mikroenjeksiyona göre tüp bebek merkezlerinin başarı yüzdelere önemli ölçüde katkı sağlayabileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar kelimeler:** Erkek kısırlığı, sperm anomalileri, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu, elektron mikroskobu, insan.

# **MORPHOLOGICAL ANALYSES OF SPERMS CAUSING SEVERE MALE INFERTILITY WITH LIGHT MICROSCOPY, MOTILE SPERM ORGANELLAR MORPHOLOGY EXAMINATION AND ELECTRON MICROSCOPY TECNICS**

## **SUMMARY**

Male infertility is one of the most important factor to determine success of in vitro fertilization. In spite of good-quality sperm injection and advanced sperm preparation procedures, every injected sperm may not achieve fertilization. Fertilized embryos may show growth problems and in vitro fertilization success decreases significantly.

In our study, overall assesment of abnormal sperm causing severe male infertility under a light microscope, real-time motile sperm organelle morphology assessment at 8050x high magnification and electron microscopic evaluation of the fine structure of sperm to determine degree of affect on this level is aimed. This is the first study to evaluate sperm morphology by these three different methods.

In our study, in megalohhead group, together with multi-flagellum structure, irregular and large sperm heads, pinhead sperm abnormalities have been found to be accompanied. In Globozoospermia type I group, sperm head were observed to be round and lacking acrosome, while in type II group, the cone-shaped nucleus and a small amount of acrosome were observed. In tail-stump group, sperm with short and blunt-shaped tail were also found to have scattered microtubules and 9+0 structure rather than 9+2. In pinhead group, some sperm with

the head were seen, even it was rare, and 9+2 microtubule structure was striking. For the three evaluation methods, results were found to be supporting each other.

As a result, we believe that, beside the light and electron microscopic techniques, the motile sperm organelle examination can offer information about sperm quality in a simple and quick way and by the intracytoplasmic morphologically selected sperm injection developed through the use of sperm selected by this technique can contribute to the success of in vitro fertilization centers.

**Key words:** Male infertility, sperm abnormalities, intracytoplasmic sperm injection, electron microscopy, human.



## KAYNAKLAR

1. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and Infertility in the United States: Incidence and trend, Fertil Steril 1991, 56:192
2. Barbieri RL. Female infertility. In Strauss FJ, Barbieri RL (ed), Reproductive endocrinology. Pennsylvania: Elsevier Inc. 5th ed. 2004, pp.663-668
3. Rutherford AJ, Strauss JF, Steirtegham AV. Implantation and Endometrial Function: Fauser BJ (ed) Molecular Biology in Reproductive Medicine Newyork, The Parthenon Publishing Group. 1999, 335
4. Elder K, Dale B. Preimplantation Genetic Diagnosis. In Vitro Fertilization, 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 1-33.
5. Tuarneye H. Gamete source and manipulation. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds). Current practices and controversies in assisted reproduction: Report of a WHO meetin Geneva. WHO 2002; pp 83 – 101
6. Orhon E. et al Sperm morfoloji atlası. Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları. 1996;4:8-17
7. Sadler T.W. Langman's Medical Embryology 10th Edition Lippincott reverend & Wilkins . 2006;p.3-4
8. Hafez ESE and Hafez SD, Atlas of Cilinical Andrology, 2004 pages: 7-9
9. T.C Sağlık Bakanlığı ana çocuk sağlığı ve aile planlanması. Ulusal Aile Planlaması Hizmet Rehberi, İnfertilite - Ek 9-B, Ankara: 2005; p.235- 238
10. Serdar Günalp, Kadın Doğum Hekiminin Erkek Faktörünün Araştırılması ve Değerlendirilmesindeki Yaklaşımı Ne Olmalıdır? TJOD 2004;1 – 2:129 – 140
11. MacLead J, Gold RZ. The Male factor infertility and infertility. VI: Semen quality and certain other factors in relation to ease of contraception. Fertil Steril 1953; 4: 10 – 33

12. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 2nd ed. 1987; Cambridge: Cambridge University Press.
13. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. 1992; Cambridge: Cambridge University Press.
14. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. 1999; Cambridge: Cambridge University Press.
15. Nikolettos N, Küpker W, Demirel LC et al. Fertilization potential of sperm with abnormal morphology. *Hum Reprod* 1999;14: 47-70
16. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112-7.
17. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human sperm according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990;5:586-92.
18. Kahraman et al. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Human Reproduction*. 1997, vol.12 no.6 p.1214–1217,
19. Dominick J. Carbone, Jr, James T. McMahon, Howard S. Levin, Anthony J. Thomas, Jr, and Ashok Agarwal. Role of electron microscopy of sperm in the evaluation of male infertility during the era of assisted reproduction. *Urology*. 1998;52 (2):301–305
20. Lauria Jane McKenzie et al. Pregnancy outcome of in vitro fertilization / intracytoplasmic sperm injection with profound teratospermia. *Fertil Steril*. 2004;82: 847- 49
21. Katz DF, Overstreet J W, Samuels SJ, Niswander PW, Bloom TD, Lewis EL. Morphometric analysis of sperm in the assessment of human male fertility. *J Androl* 1986;7:203-10.
22. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human sperm according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990;5:586-92.
23. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112-7.
24. Trevor G Cooper et al. WHO laboratory manual for the examination of human semen 5th ed. WHO Press. 2010, p.56–61
25. Kobayashi T, Jinno M, Sugimura K, Nozawa S, Sugiyama T, Iida E. Sperm morphological assessment based on strict criteria and in-vitro fertilization outcome. *Hum Reprod* 1991,6:983-6.

26. Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum Reprod Update* 1995,1:543-57.
27. Acosta AA, Kruger TF. Human sperm in assisted reproduction. New York: The Parthenon Publishing Company, 1996.
28. Walsh et al. *Campbell-Walsh Urology*, 2008, 9th ed. Pages: 1328 -1329
29. Aktaş H. Derin Teratozoosperminin ICSI'de gebelik sonuçları üzerindeki etkisi, (Uzmanlık Tezi), Süleymaniye kadın hastalıkları ve doğum eğitim ve araştırma hastanesi, İstanbul, 2007
30. Aytekin D.M, Turan O, Gülgün C, Özkara H. Methods on ultrastructural and biochemical analysis of sperm and their bearing capacity. *Turkish J. Medical Sciences*. 1995; Supp. p:62.
31. Blom, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.* 1973;25:283.
32. Bisop, M.W. H. Genetically determined abnormalities of the reproductive system. *Journal of Reprod. Fertil.* 1972 Suppl. 15-51.
33. Hafez E.S.E, Lea and Febiger. *Reproduction in farm animals*. 1987, Chap:22 458-466.
34. Özgüner M, Evirgen O. Ultrastructural analysis of a globozoospermia case, S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2007;14(1)/ 29-32
35. Bozkurt HH. Damızlık iki boğanın ejakülatlarında bulunan anormal yapıların ultrastruktürü *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*. 1998;22 p.49-52
36. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl.* 2002 Jan-Feb,23(1):1-8.
37. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod.* 2006 Jul,21(7):1787-90
38. Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online.* 2006 May,12(5):634-8.
39. Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL, Petersen CG, Nicoletti AP, Baruffi RL, Franco JG Jr. Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria. *Reprod Biomed Online.* 2009 Mar,18(3):320-6.
40. Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod Biomed Online.* 2009,19 Suppl 3:45-55. Review.
41. Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD, Franco JG Jr. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle

morphology examination and sperm DNA damage. *Fertil Steril*. 2010 Feb 26. (Epub ahead of print)

42. Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, Ducot B, De Ziegler D, Poirot C, Wolf J. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod Biomed Online*. 2010 Jan,20(1):132-7. Epub 2009 Oct 30.
43. Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, Nabeshima H, Suzuki K, Yaegashi N. The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function. *J Assist Reprod Genet*. 2010 Feb,27(2-3):75-81. Epub 2009 Dec 12.
44. Chelli MH, Albert M, Ray PF, Guthauser B, Izard V, Hammoud I, Selva J, Vialard F. Can intracytoplasmic morphologically selected sperm injection be used to select normal-sized sperm heads in infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome? *Fertil Steril*. 2010 Mar 1,93(4):1347.e1–5. Epub 2008 Dec 4.
45. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online*. 2008 Jun,16(6):835–41.
46. Dieterich K, Rifo RS, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid sperm and causes male infertility. *Nat Genet* 2007, 39, 661–65.
47. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*, (Çev. Ed.: Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu, Prof. Dr. Yener Aytekin), Nobel kitabevi 2006, S. 6–8
48. Carlon N, Navarro A, Giorgetti C, Roulier R. Quantified ultrastructural study of sperm in unexplained failure of in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*. 1992 Oct,9(5):475-81.
49. Kuehnel, *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*. Thieme, 2003; p. 386-387
50. Johannes A. G, Rhodin M.D. *An Atlas of Ultrastructure*, W.B. Saunders Company, 1963. p.108-109
51. Sturgess JM, Chao J, Wong J, Aspin N, Turner JA. Cilia with defective radial spokes: a cause of human respiratory disease. *N Engl J Med*. 1979 Jan 11,300(2):53-6.
52. Jouannet P, Escaller D, Serres C, David G. Motility of human sperm without outer dynein arms. *J Submicrosc Cytol*. 1983 Jan,15(1):67-71.
53. Feneux D, Serres C, Jouannet P. Sliding sperm: a dyskinesia responsible for human infertility? *Fertil Steril*. 1985 Oct,44(4):508-11.
54. Singh G. Ultrastructural features of round-headed human sperm. *Int J Fertil*. 1992 Mar-Apr,37(2):99-102.
55. Stone S, O'Mahony F, Khalaf Y, Taylor A, Braude P. A normal livebirth after

intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation: case report. *Hum Reprod.* 2000 Jan,15(1):139-41.

56. Toyama Y, Iwamoto T, Yajima M, Baba K, Yuasa S. Decapitated and decaudated sperm in man, and pathogenesis based on the ultrastructure. *Int J Androl.* 2000 Apr, 23(2):109–15.
57. Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed sperm in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977, 26, 111–18.
58. Escalier D. Human sperm with large heads and multiple flagella: a quantitative ultrastructural study of 6 cases. *Bio Cell* 1983;8, 65-74.
59. In't Veld PA, Broekmans JM, de France HF et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomal abnormal sperm. *Hum. Reproduc.* 1997;2, 752-54.
60. Pieters MH, Speed RM, de Boer P, Vreeburg JT, Dohle G, In't Veld PA. Evidence of disturbed meiosis in a man referred for intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1998;51, 957-64.
61. Kahraman S, Akarsu C, Cengiz G, Dirican K Sozen E. Fertility of ejaculated and testicular megalohed sperm with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14, 726-730.
62. Lewis-Jones I, Aziz N, Sheshadri S, Douglas H, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphological deformities. *Fertil Steril* 2003; 79, 212-5.
63. Heller CG and Clermont Y. Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. *Science* 1963; 140, 184-186.
64. Weissenberg R, Aviram A, Golan R, Lewin LM, Levron J, Madgar I, et al. Concurrent use of flow cytometry and fluorescence in-situ hybridization techniques for detecting faulty meiosis in a human sperm sample. *Mol Hum Reprod* 1998;4, 61–6.
65. Fawcett, D.W. The mammalian sperm. *Dev. Biol* 1975; 44, 394–436
66. Escalier D. Genetic approach to male meiotic division deficiency: The human macronuclear sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8, 1-7.
67. Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod* 2002; 17, 1292–8.
68. Mori C, Allen JW, Dix DJ, Nakamura N, Fujioka M, Toshimori K. Completion of meiosis is not always required for acrosome formation in HSP70-2 null mice. *Biol Reprod* 1999;61, 813–22.
69. Escalier D. What are the germ cell phenotypes from infertile men telling us about spermatogenesis? *Histol Histopathol* 1999;14, 959–71.
70. Escalier D, In de Brabender M, De Mey J. Microtubular disorder in human sperm.

Microtubules and Microtubule Inhibitors 1985;345-52.

71. Perotti, ME and Giorgia M. Fine structure and morphogenesis of 'headless' human sperm associated with infertility. *Cell Biol. Int. Rep* 1981;5, 113–117.
72. Chemes EH, Crizza C, Scarinci F. Lack of a head in human sperm from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization. *Fertil. Steril* 1987a;47, 310–316
73. Chemes EH, Carrere C, Brugo S. Dysplasia of the Fibrous sheath: an ultrastructural defect of human sperm associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertil. Steril* 1987b;48, 664–669.
74. Benzacken B, Gavelle FM, Martin-Pont B, Dupuy O, Lievre N, Hugues JN, Wolf JP. Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure: case report. *Hum Reprod* 2001;16(12), 2646-51.
75. Maines J, Wasserman S. Regulation and execution of meiosis in *Drosophila* males. *Curr Top Dev Biol* 1998;37, 301–32.
76. Fuller MT. Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998;9, 433–44.
77. Hackstein JHP, Hochstenbach R, Pearson PL. Towards an understanding of the genetics of human male infertility: lessons from flies. *Trends Genet* 2000;16, 565–72.
78. Grootegoed JA, Baarends WM, Roest HP, Hoeijmakers JHJ. Knockout mouse model and gametogenic failure. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145, 161–6.
79. Cram DS, O'Bryan MK, de Kretser DM. Male infertility genetics the future. *J Androl* 2001;22,738–46.
80. Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 2002, (Suppl 4), s41–9.
81. Escalier D. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update* 2006;12, 449–61.
82. Aitken RJ, Kerr L, Bolton V et al. Analysis of sperm function in globozoospermia: implications for the mechanism of sperm-zona interaction. *Fertil Steril* 1990;54:701-707
83. Schill WB. Some disturbances of acrosomal development and function in human sperm. *Hum Reprod* 1991;6:969-978.
84. Meyhofer W. Contribution to the cytophotometric evaluation of pathologically changed sperm with special reference to round-shaped sperm following Feulgen and fast green staining. *Z Haut Geschlechtskr* 1965;39:174-182.
85. Schirren CG, Holstein AF, Schirren C. Über die morphogenese rund-kopfiger spermatozoen des menschen. *Andrologia* 1971;3: 117-125.
86. Holstein AF, Schirren C, Schirren CG. Human spermatids and sperm lacking acrosomes. *J Reprod Fertil* 1973;35:489- 491.

87. Holstein AF, Schirren C, Schirren CG. Human spermatids and sperm lacking acrosomes. *J Reprod Fertil.* 1973 Dec,35(3):489-91. No abstract available.
88. Baccetti B, Renieri T, Rosati F, Selmi MG, Casanova S. Further observations on the morphogenesis of the round headed human sperm. *Andrologia.* 1977 Jul-Sep,9(3):255-64.
89. Longo FJ, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian sperm and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J Cell Biol.* 1987 Sep,105(3):1105-20.
90. Singh G. Ultrastructural features of round-headed human sperm. *Int J Fertil* 1992; 37:99-102.
91. Lamprecht IA, Kotzur B, Schopf E. Round-headed human sperm. *Fertil Steril* 1976; 27,685-693.
92. Blanchard Y, Lescoat D, Lannou DL. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human sperm. *Andrologia* 1990;22:549–555.
93. Carrell DT, Emery BR, Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;71:511–516.
94. Lalonde L, Chapdelaine A, Langlais J, Roberts KD, Antaki P, Bleau G. Male infertility associated with round-headed acrosomeless sperm. *Fertil Steril* 1988;49:316-321.
95. Taşkiran Ç, Başaran A, Günalp S. Globozoospermi: Erkek infertilitesinde son nokta, *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 2005; Cilt: 2 Sayı: 4 Sayfa: 273-278
96. Chemes HE, Brugo S, Zanchetti F, Carrere C, Lavieri JC. Dysplasia of the Fibröz sheath: an ultrastructural defect of human sperm associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertil Steril.* 1987 Oct,48(4):664-9.
97. Chemes HE, Morero JL, Lavieri JC. Extreme asthenozoospermia and chronic respiratory disease: a new variant of the immotile cilia syndrome. *Int J Androl.* 1990 Jun,13(3):216-22.
98. Rey RA, Campo SM, Bedecarrás P, Nagle CA, Chemes HE. Is infancy a quiescent period of testicular development? Histological, morphometric, and functional study of the seminiferous tubules of the cebus monkey from birth to the end of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 May,76(5):1325-31.
99. Mitchell V, Rives N, Albert M, Peers MC, Selva J, Clavier B, Escudier E, Escalier D. Outcome of ICSI with ejaculated sperm in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum Reprod.* 2006 Aug,21(8):2065-74. Epub 2006 Apr 27.
100. Chemes HE, Carizza C, Scarinci F, Brugo S, Neuspiller N, Schwarsztein L. Lack of a head in human sperm from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization. *Fertil Steril.* 1987 Feb,47(2):310-6.
101. Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, Olmedo SB, Zanchetti F, Hermes R.

Acephalic sperm and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod.* 1999 Jul,14(7):1811-8.

- 102.** Baccetti B, Burrini AG, Collodel G, Magnano AR, Piomboni P, Renieri T, Sensini C. Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. *Gamete Res.* 1989 Jun,23(2):181-8.
- 103.** Olmedo SB, Rawe VY, Nodar FN, Galaverna GD, Acosta AA, Chemes HE. Pregnancies established through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using sperm with dysplasia of fibrous sheath. *Asian J Androl.* 2000 Jun,2(2):125-30.
- 104.** Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003 Sep-Oct,9(5):405–28. Review



## RESİMLEMELER LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Resim 1.</b> Kontrol grubu, Spermac Boyası, x1000.....	35
<b>Resim 2.</b> Kontrol grubu, Spermac Boyası, x1000.....	35
<b>Resim 3.</b> Kontrol grubu, MSOME, x8050 .....	36
<b>Resim 4.</b> Kontrol grubu, MSOME, x8050 .....	36
<b>Resim 5.</b> Kontrol grubu, TEM, x50000 .....	37
<b>Resim 6.</b> Kontrol grubu, TEM, x20000 .....	37
<b>Resim 7.</b> Kontrol grubu, TEM, x30000 .....	38
<b>Resim 8.</b> Megalohead grubu, Spermac Boyası, x1000 .....	40
<b>Resim 9.</b> Megalohead grubu, Spermac Boyası, x1000 .....	40
<b>Resim 10.</b> Megalohead grubu, Spermac Boyası, x1000 .....	41
<b>Resim 11.</b> Megalohead grubu, MSOME, x8050.....	41
<b>Resim 12.</b> Megalohead grubu, MSOME, x8050.....	42
<b>Resim 13.</b> Megalohead grubu, MSOME, x8050.....	42
<b>Resim 14.</b> Megalohead grubu, MSOME, x8050.....	43
<b>Resim 15.</b> Megalohead grubu, TEM, x10000 .....	43
<b>Resim 16.</b> Megalohead grubu, TEM, x20000 .....	44
<b>Resim 17.</b> Megalohead grubu, TEM, x20000 .....	44
<b>Resim 18.</b> Megalohead grubu, TEM, x20000 .....	45
<b>Resim 19.</b> Globozoospermi grubu, Spermac Boyası, x1000 .....	47
<b>Resim 20.</b> Globozoospermi grubu, Spermac Boyası, x1000 .....	47
<b>Resim 21.</b> Globozoospermi grubu, Spermac Boyası, x1000 .....	48

<b>Resim 22.</b> Globozoospermi grubu, MSOME, x8050.....	48
<b>Resim 23.</b> Globozoospermi grubu, MSOME, x8050.....	49
<b>Resim 24.</b> Globozoospermi grubu, TEM, x20000.....	49
<b>Resim 25.</b> Globozoospermi grubu, TEM, x20000.....	50
<b>Resim 26.</b> Globozoospermi grubu, TEM, x30000.....	50
<b>Resim 27.</b> Tail stump grubu, Spermac Boyası, x1000.....	52
<b>Resim 28.</b> Tail stump grubu, Spermac Boyası, x1000.....	52
<b>Resim 29.</b> Tail stump grubu, Spermac Boyası, x1000.....	53
<b>Resim 30.</b> Tail stump grubu, MSOME, x6000.....	53
<b>Resim 31.</b> Tail stump grubu, MSOME, x8050.....	54
<b>Resim 32.</b> Tail stump grubu, MSOME, x8050.....	54
<b>Resim 33.</b> Tail stump grubu, TEM, x10000.....	55
<b>Resim 34.</b> Tail stump grubu, TEM, x25000.....	55
<b>Resim 35.</b> Tail stump grubu, TEM, x20000.....	56
<b>Resim 36.</b> Tail stump grubu, TEM, x40000.....	56
<b>Resim 37.</b> Total Pinhead grubu, Spermac Boyası, x1000.....	58
<b>Resim 38.</b> Total Pinhead grubu, Spermac Boyası, x1000.....	58
<b>Resim 39.</b> Total Pinhead grubu, Spermac Boyası, x1000.....	59
<b>Resim 40.</b> Total Pinhead grubu, MSOME, x8050.....	59
<b>Resim 41.</b> Total Pinhead grubu, MSOME, x8050.....	60
<b>Resim 42.</b> Total Pinhead grubu, MSOME, x8050.....	60
<b>Resim 43.</b> Total Pinhead grubu, TEM, x5000.....	61
<b>Resim 44.</b> Total Pinhead grubu, TEM, x30000.....	61
<b>Resim 45.</b> Total Pinhead grubu, TEM, x30000.....	62

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Mardin'in Midyat ilçesinde doğdum. Ortaöğretimimi Nusaybin Lisesi'nde tamamladıktan sonra, 1999 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2003 yılında biyolog unvanı alarak mezun oldum. Mezun olduktan sonra İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, Hücre ve Doku Kültürü laboratuvarında çalıştım. 2005 yılında askerlik görevimi Hatay ili İskenderun ilçesinde tamamladıktan sonra 2006 yılının Ocak ayında özel bir androloji ve biyokimya laboratuvarında çalışmaya başladım. 2007 Temmuz ayında Memorial Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarında çalışmaya başladım. 2008 yılı Şubat ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı'nda Prof. Dr. Mehmet KANTER danışmanlığında yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Memorial Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarında çalışmaktayım.