

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASTHENOZOOSPERMİA OLGULARINDA
SEMEN ANALİZİ VE SPERM DEFEKTLERİNİN
FAZ KONTRAST MİKROSKOBU İLE
ORTAYA KONMASI**

DR. ELVAN OK

**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR

2005

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASTHENOZOOSPERMİA OLGULARINDA
SEMEN ANALİZİ VE SPERM DEFEKTLERİNİN
FAZ KONTRAST MİKROSKOBU İLE
ORTAYA KONMASI**

**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DR. ELVAN OK

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. DOĞAN ÖZYURT

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 99.3456.23 sayı ile desteklenmiştir.

Asthenozoospermia olgularında semen analizi ve sperm defektlerinin faz kontrast mikroskobu ile ortaya konması isimli bu tez 01.12.2005 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Yrd. Doç. Dr. Doğan ÖZYURT
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Zişan BULDAN
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Namık DEMİR
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Güven ERBİL
Jüri Üyesi

İÇİNDEKİLER

1. TABLO LİSTESİ.....	i
2. ŞEKİL LİSTESİ.....	ii
3. KISALTMALAR.....	iii
4. ÖZET.....	1
5. İNGİLİZCE ÖZET.....	3
6. GİRİŞ.....	5
7. GENEL BİLGİLER.....	6
7. 1 Spermium.....	8
7. 1. 1 Spermiumun Oluşumu.....	8
7. 1. 2 Seminal Plazma.....	8
7. 1. 3 Spermiumun Yapısı.....	9
7. 2 Semen Analizi.....	10
7. 2. 1 Semen Örneğinin Alınması.....	10
7. 2. 2 İlk Makroskopik Değerlendirme.....	10
7. 2. 3 İlk Mikroskopik Değerlendirme.....	10
7. 2. 4 İleri Mikroskopik Değerlendirme.....	11
7. 3 Sperm Motilitesini Etkileyen Faktörler.....	12
8. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	14
8. 1 Olgular.....	14
8. 2 Semen analizi.....	16
8. 2. 1 Makroskopik Değerlendirme.....	16
8. 2. 2 Mikroskopik Değerlendirme.....	16
8. 2. 3 İstatistikler.....	19
9. BULGULAR.....	20
10. TARTIŞMA.....	27
11. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	32
12. KAYNAKÇA.....	33
13. EKLER.....	37
EK 1 MAR (mixed antiglobulin reaction) Testi Ig G.....	37

EK 2 Diff-Quick Boyama Prosedürü.....	37
EK 3 Spermac Boyama Prosedürü.....	37
EK 4 Lökosit Boyası.....	38
EK 5 Eozin (Vital Screen) Testi.....	38
EK 6 HOS (Hyperosmolar Swelling) Testi.....	38

1. TABLOLAR

Tablo 1. Semen sınıflaması terminolojisi.....	7
Tablo 2. Semen parametreleri referans değerleri.....	8
Tablo 3. Araştırmaya alınan olguların mevsimsel dağılımı.....	15
Tablo 4. Olguların yaşlara göre dağılımı.....	15
Tablo 5. Sigara kullanan ve kullanmayan olguların yaş dağılımı	18
Tablo 6. Olguların sigara kullanımına göre dağılımı.....	19

2. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Sperm motilite bozukluğu olan olguların grafiksel olarak dağılımı.....	14
Şekil 2. Semen örneğinde sarı-kahve renkte gözlenen bir lökosit(Lökosidin boyası, X40).....	20
Şekil 3. Total motilite ile viskozite arasındaki ilişki.....	21
Şekil 4. İleri hızlı motilite ile viskozite arasındaki ilişki.....	21
Şekil 5. Akrozomu olmayan 2 sperm (Diff-Quick boyası, X1000).....	22
Şekil 6. Bir asthenozoospermia olgusunda baş, orta parça, kuyruk anomalisi gözlenen sperm (Diff-Quick boyası, X1000).....	23
Şekil 7. Bir asthenozoospermia olgusunda baş, orta parça, kuyruk anomalisi gözlenen sperm (Diff-Quick boyası, X1000).....	23
Şekil 8. Bir asthenozoospermia olgusunda baş, orta parça, kuyruk anomalisi gözlenen sperm (Spermac boya, X1000).....	24
Şekil 9. Normozoospermia olgusuna ait bir örmekte üstte normal sınırlarda bir sperm (Spermac boya, X1000).....	25
Şekil 10. Çift başlı bir sperm (Spermac boya, X1000).....	26

3. KISALTMALAR

MAR: Mixed Antiglobulin Reaction

WHO: World Health Organization

ATP: Adenosine triphosphate

HOS Testi: Hyperosmolar Swelling Test

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

4. ÖZET

ASTHENOZOOSPERMİA OLGULARINDA SEMEN ANALİZİ VE SPERM DEFEKTLERİNİN FAZ KONTRAST MİKROSKOBU İLE ORTAYA KONMASI

Dr. ELVAN OK

Amaç:

1. Asthenozoospermia (sperm motilite düşüklüğü) ile semenin hiperviskozitesinin, aglütinasyonun, lökosperminin ve sigara kullanımının bir ilişkisi olup olmadığının araştırılması

2. İki farklı canlılık testinin karşılaştırılması

3. Sperm morfoloji boyalarının karşılaştırılması

Çalışmanın Tipi: Kontrollü prospektif çalışma

Gereç ve Yöntemler: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran toplam 89 olgu (sperm motilite bozukluğu olan 36 olgu ile motilite bozukluğu olmayan 53 olgu) çalışma kapsamına alındı.

Semen örneği makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi. Sperm morfoloji bakışı Diff-Quick ve Spermac boyaları kullanılarak yapıldı.

Motilite bozukluğu olan 21 semen örneğine ise yukarıda sayılan testlere ek olarak; canlılık testleri olan Eozin ve HOS testi birlikte uygulandı. 2 örneğe ise sadece eozin testi uygulandı.

Sperm hareketliliği normal olan 44 olgu ile sperm hareketliliği düşük olan 25 olgu sperm morfolojisi yönünden değerlendirilirken Diff -Quick boyama yöntemi kullanıldı ve toplam orta parça ile kuyruk anomali yüzdesi ortalaması hesaplandı.

Motilitesi normal olup aglütinasyon saptanan 3 örneğe ve motilite bozukluğu olan 34 olguya MAR testi yapıldı.

Sperm motilitesi ve sperm konsantrasyonu Makler sayım kamerası kullanılarak WHO kriterlerine göre değerlendirildi.

Ayrıca her olgu sigara kullanımı yönünden de değerlendirildi.

Bulgular: Sperm motilite düşüklüğü ile hiperviskozite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

Sperm motilite düşüklüğü ile lökospermi, aglütinasyon ve sigara kullanımı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

İki ayrı canlılık testinin birbirine üstünlüğü olmadığı görüldü. Morfolojik boya testlerinin karşılaştırılmasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Hareketliliği düşük olan olgularda toplam orta parça defekti yüzdesi ortalaması, kontrol grubuna göre 2 kat daha yüksek oranda bulunurken; toplam kuyruk defekti yüzdesi ortalaması 0,6 kat daha yüksek oranda bulundu.

Sonuçlar: Hiperviskozite, düşük sperm motilitesi ile ve dolayısıyla erkek infertilitesi ile ilişkilidir.

Morfoloji ve canlılık testi için kullanılan boyaların birbirine üstünlüğünün olmaması, daha ekonomik olan boyaların tercih edilmesini gündeme getirmektedir.

Orta parça defektlerinin ve hareketlilikte önemli rol oynayan kuyruk anomalilerinin de sperm hareketliliğini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak basit ve invaziv olmayan semen analizi yapılarak erkek infertilitesi ile ilgili birçok veri elde edilebileceği görülmektedir. Doğru ve güvenilir bir semen analizi ile asthenozoospermianın etiolojisi aydınlatılıp, motilite tedavisinde önemli adımlar atılabilir.

Anahtar sözcükler: Asthenozoospermia, sperm motilitesi, semen analizi

5. İNGİLİZCE ÖZET

ABSTRACT

SEMEN ANALYSIS IN ASTHENOZOOSPERMIA CASES AND DETERMINATION OF SPERM DEFECTS BY PHASE CONTRAST MICROSCOPE

Dr. ELVAN OK

Purpose:

1. Survey of whether a relation between asthenozoospermia (sperm motility inadequacy) and semen hyperviscosity, agglutination, leukospermia and smoking, exist.
2. Comparison of two various survival tests.
3. Comparison of sperm morphology dyes.

Design: Prospective controlled study.

Materials and Methods: Thirty-six patients with sperm motility disorders who were admitted to Dokuz Eylul University IVF Center 2005 were included in the study. Fifty-three patients with normal semen analysis served as controls.

Semen samples were evaluated macroscopically and microscopically. Diff-Quick and Spermac dyes were used for sperm morphology assessment.

In 21 semen samples having motility disorders in addition to the tests mentioned above: survival tests Eozin and HOS tests were implemented together. For two samples only eosin test were applied.

While, 44 cases with normal sperm motility, 25 cases having decreased sperm motility were evaluated pertaining to sperm motility Diff-Quick dying method were carried out and total midpiece piece and tail anomaly percentage test average value were compared.

MAR test was carried out for 3 samples having normal motility and in which agglutination was found and for 34 cases having decreased sperm motility.

Sperm motility and sperm concentration were evaluated according to WHO criteria by means of using Makler counting chamber.

Also, each case was evaluated with regard to smoking.

Results: Statistical significance relation was found between decreased sperm motility and hyperviscosity ($p < 0,05$).

No significant relation was found between decreased sperm motility and leukospermia, agglutination and smoking.

It was found that both different survival tests were not superior to each other. In the comparisons of morphological dye tests no statistical significant variation was found.

While in the cases decreased sperm motility average midpiece defect percentage two fold higher compare to control group; total tail defect percentage average found in 0, 6 fold higher value.

Conclusion: Hyperviscosity is related to low sperm motility and therefore to male infertility.

No superior impact between dyes used for morphological and survival tests led to the usage of more costly dyes.

It is thought that midpiece defects and tail anomalies which have important role in motility may affect sperm motility.

As a result, it can be seen that plenty of data are available to provide related to male infertility by means of carrying out basic and not invasive semen analysis. By accurate and confidential semen analysis etiology of asthenozoospermia may be illuminated and important progress can be taken in motility treatment.

Key words: Asthenozoospermia, motility, semen analysis

6. GİRİŞ

Günümüzde yardımcı üreme tekniklerinin hızlı bir gelişme göstermesi ile infertilite nedenleri daha fazla araştırılmaya başlanmıştır. Eskiden sadece kadın odaklı olduğu düşünülen infertilite nedeninin son çalışmalarda yarıdan fazla oranda erkek faktörüne bağlı olduğu görülmüştür(1).

Erkek infertilitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda özellikle temel sperm parametrelerinin son derece önemli olduğu görülmektedir. Bu parametrelerden sperm motilitesi de oldukça önemli olup, infertil olgularda hastanın tüp bebeğe yönlendirilmesi açısından da büyük önem taşımaktadır. Asthenozoospermia veya düşük sperm motilitesinin erkek infertilitesinde en sık neden olduğu bildirilmektedir(2).

Asthenozoospermia olgularının mikroskopik olarak değerlendirilmesinin tüp bebek merkezinde yapılması, bu olgularda fertilizasyonun ne derece etkilendiğini gözlemek ve ileride hastaya uygulanabilecek olası yardımcı üreme tekniğinin sonucunu görmek açısından değer taşımaktadır.

Taze ejakulat, normalde koagülasyonu takiben 20–30 dakika içinde likefiye forma geçer. Bu süreç en fazla 30–45 dakika sürer. Likefaksiyonun zamanında tamamlanmaması viskozitede artışa neden olur(3).

Hipervisköz semen, infertilite tedavisi gören erkeklerde sık rastlanan bir olaydır(4).

Erkek infertilitesinde semen hiperviskozitesinin de fertilizasyonu etkileyen bir faktör olduğu bilinmektedir(4). Bu çalışmanın amaçlarından biri de, sperm motilite düşüklüğü ile semen hiperviskozitesi arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını gözlemlemektir.

Çalışmamızdaki temel amaç, faz kontrast mikroskobu kullanarak asthenozoospermia olgularını araştırmaktır. Bu araştırma ile çevresel koşullar, stres gibi pek çok etmenden etkilenebilen erkek infertilitesine yeni bir bakış açısı getirmek ve göreceli olabilen mikroskopik bakı aşamalarının aynı kişi tarafından değerlendirilmesi sağlanarak daha nesnel sonuçlara ulaşabilmek hedeflenmiştir.

Bu çalışmada asthenozoospermia ile semen ilişkisinin birçok parametre göz önüne alınarak değerlendirilmesi amaçlandı.

7. GENEL BİLGİLER

İnfertilite, çiftlerin çocuk sahibi olmayı istemelerine ve düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen en az bir yıl süreyle gebelik elde edememeleridir(5).

İnfertilite, sosyal, psikolojik ve maddi anlamda çocuk sahibi olmak isteyen çiftleri sıkıntıya sokan önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda özellikle daha az invaziv girişim gerektirdiği için basit bir semen analizi ile erkeğin değerlendirilmesi öncelik kazanmıştır. Temel semen parametreleri olan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisinde normalden sapmalar, olguyu tedaviye yönlendirmede büyük önem taşımaktadır. Ancak, bu sapmalarda etiolojinin aydınlatılması bir kısım hastada çözümü daha da kolaylaştırmaktadır.

“İnfertil erkekte azoospermia; oligozoospermia, asthenozoospermia, teratoospermia veya bunların kombinasyonu söz konusudur.”(6). Tablo 1’ de semen sınıflaması terminolojisi görülmektedir.

Normal şartlarda fertilizasyonun gerçekleşmesi için spermatozoa motilitesi en önemli parametrelerdendir(6).

Öncelikle asthenozoospermianın tanımını yapmak gerekmektedir. Tablo 2’ de görüldüğü gibi WHO standartları göz önüne alındığında toplam motilitenin % 50’nin ve ileri hareketliliğin ise % 25 ‘in altında olduğu durumlarda asthenozoospermia tanımlaması yapılmaktadır(6).

Tablo 1. Semen Sınıflaması Terminolojisi

Normozoospermi	Referans değerleriyle tanımlanmış normal ejakülat
Oligozoospermi	Referans değerinden daha az sperm konsantrasyonu
Asthenozoospermi	Referans değerinden daha az sperm motilitesi
Teratozoospermi	Referans değerinden daha az sperm normal morfolojisi
Oligoasthenoteratozoospermi	Her üç değişkenin bozukluğunu gösterir
Kriptoospermi	Ejakülatın bazal değerlendirmesinde hiç sperm yokken, santrifügasyon sonrası birkaç sperm elde edilmesi
Azoospermi	Santrifügasyon sonrası hiç sperm bulunmaması
Aspermi	Seminal plazma volümü= 0 ml
Polizoospermi	Yüksek sperm konsantrasyonu (>250 milyon/ml)

Türk Androloji Rehberi 2004, Günalp S, Orhon Esat, Özgür K, Seçkin B, Tarcan T.

Tablo 2. Semen Parametreleri Referans Değerleri

Parametre	Referans Değeri
Volüm	≥ 2.0 ml
pH	≥ 7.2
Sperm konsantrasyonu	$\geq 20 \times 10^6$ /ml
Total sperm sayısı	$\geq 40 \times 10^6$ /ml spermatozoa/ ejakülat
Motilite	Ejekülasyondan sonra 60 dak. içinde % 50 veya daha fazla progresif motilite (Grade A+B) veya $> \% 25'$ ten fazla hızlı progresif motilite (Grade A)
Morfoloji	Normal formlar $> \%5$
Vitalite	% 75 veya daha fazla canlı sperm (boya almayan)
Beyaz küreler	$< 2 \times 10^6$ /ml
MAR test	Motil spermelerde $< \% 50'$ sinden azında yapışkan partiküller

Türk Androloji Rehberi 2004, Günalp S, Orhon Esat, Özgür K, Seçkin B, Tarcan T

7.1 Spermium

7.1.1 Spermiumun oluşumu:

Spermium testislerdeki seminifer tübüllerde üretilir. Diploid spermatogonyalar, transformasyona ve mayotik bölünmeye uğrayarak haploid kromozom yapısına sahip spermatidi oluşturur. Bu olaya spermatogenezis denir ve yaklaşık 10 haftalık bir süreçtir. Son aşama ise gelişim aşamasıdır. Haploid yuvarlak yapıdaki spermatid, motil ve kuyruk yapısına sahip spermiuma dönüşür. Bu olaya da spermiyogenezis denir(6).

7.1.2 Seminal plazma:

Spermiumlar glikojenden zengin epididimde depolanır. Burada olgunlaşıp fertilizasyon yeteneğine sahip motil sperme dönüşürler. Ejekülasyonla elde edilen seminal plazma epididimal ve yardımcı üreme bezlerinin salgılarından oluşur. Sekresyona önce prostat salgısı daha sonra seminal veziküllerin salgıları eklenir. Prostat salgısı asidiktir ve fibrinolizin içerir. Bu enzim de likefaksiyonda görev yapar. Alkali veziküler seminal sıvı ise semen volümünün % 70'ini oluşturur ve koagülasyonda görev yapan enzimleri içerir(7).

7. 1. 3 Spermiumun yapısı:

Spermium, baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur(8, 9, 10, 11, 12).

Baş: Nükleus, nükleer membran ve akrozomdan oluşur. Akrozom, spermiyogenezis sırasında Golgi aygıtından farklılaşmıştır ve oosit hücre membranına penetre olmaya yarayan enzimler içerir(8, 9, 10,11, 12).

Kuyruk: Yaklaşık 45–50µm uzunlukta olup 4 parçadan oluşur(8, 9, 10, 11, 12).

1- Boyun

2- Orta parça

3- Esas parça

4- Son parça

Kuyruğun merkezinde bir çift, periferinde ise 9 çift mikrotübüler yapı bulunur. Bu yapıya aksonem adı verilir. Aksonem 9 adet kalın yoğun dış fibrillerle çevrelenmiştir(8, 9, 10,11,12).

Bu yoğun dış fibriller kuyruğa diklik, aksonem ise hareketlilik sağlar. Spermatozoa flagellum (kuyruk) hareketi ile ilerler(8, 9, 10, 11, 12).

Kuyruğun arka kısmında fibrilleri çevreleyen fibröz bir kılıf bulunur. Bu fibröz kılıfla fibriller kuyruk iskeletini oluşturur. Kuyruk da plazma membranı ile çevrilidir(8, 9, 10,11,12).

Boyun: Uzunluğu yaklaşık 0,3 µm olup, yapısında segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriol bulunur(8, 9, 10, 11,12).

Orta parça: Çapı yaklaşık 1 µm ve uzunluğu 7 µm' dir. Yapısında aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibriller ve mitokondrial tabaka yer alır(8, 9, 10, 11, 12).

Esas parça: : Çapı yaklaşık 0,5 µm ve uzunluğu 40 µm' dir. Yapısında aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibriller, fibröz tabaka ve plazma membranı bulunur(8, 9, 10, 11, 12).

Son parça: Kuyruğun son kısmına 5–7 µm. kala kalın fibriller ve fibröz tabaka kaybolur(8, 9, 10,11,12).

Spermin baş kısmında bulunan akrozom, fertilizasyon için gerekli enzimleri içermektedir. Orta parçada yer alan mitokondri, spermin hareketliliği için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Kuyruk yapısında yer alan aksonem hareketliliğin sağlanmasında önemlidir(8, 9, 10, 11, 12).

Sonuç olarak sperm hücresi oosit hücrelerini fertilize edip, genetik materyalini oosite aktarmak için özelleşmiştir (8, 9, 10, 11, 12).

7. 2 Semen analizi:

Erkek infertilitesini araştırırken fizik muayene ve anamnezden sonra ilk yapılan noninvaziv laboratuvar tetkikidir.

7. 2. 1 Semen örneğinin alınması:

Semen örneği 3 – 4 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyonla alınır(13).

7. 2. 2 İlk makroskopik değerlendirme:

Semen; koagülasyon, likefaksiyon, görünüm, hacim, viskozite ve pH açısından değerlendirilir(13).

Koagülasyon: Örnek ilk alındığında semende normal olarak koagulum gözlenir(13).

Likefaksiyon: Semen genellikle ilk 15 dakika içinde likefiye olur. Bazen bu süre 60 dakikaya kadar uzayabilir. Ancak bu süreç 60 dakikayı aşarsa bu durum belirtilmelidir(13).

Görünüm: Normalde semen homojen, gri, opelasan görünümündedir(13).

Hacim: Semen hacmi 2 ml ve üstünde olmalıdır(13).

Viskozite: Viskozite semen akışkanlığına karşı oluşan direnç veya yapışkanlık demektir. Likefaksiyonu başlatan proteolitik enzimler prostatta bulunur ve seminal veziküllerden salgılanan maddeler semeni koagüle eder. Yetersiz likefaksiyon hipervisköz semene yol açar(3).

Yüksek viskozite spermi olumsuz etkilemektedir. Özellikle motiliteyi, konsantrasyonu ve spermin antikorla kaplanmasını etkileyebilmektedir(14, 15).

pH: pH kâğıdı ile semen pH' ı ölçülür. Azoospermili olgularda pH: 7' den küçükse ejakulatuar kanallarda tıkanıklık veya konjenital bilateral vaza deferens yokluğu araştırılmalıdır(14, 15).

7. 2. 3 İlk mikroskopik değerlendirme:

Motilite, ileri motilite, konsantrasyon, aglütinasyon ve yuvarlak hücreler saptanır.

Bu amaç için çeşitli sayım kameraları mevcuttur. (Makler, Neubauer)(14, 15).

Aglütinasyon: Motil spermlerin baş-başa, kuyruk-kuyruğa veya baş-kuyruğa birbirlerine yapışarak kümeleşmelerine aglütinasyon denir. İmmotil spermlerin birbirlerine veya motil spermlerin sperm dışı hücrelere yapışıklığı ise nonspesifik bir aglütinasyon olarak değerlendirilmelidir. Aglütinasyonun varlığı immünolojik infertilite yönünden araştırmayı gerektirir(14, 15).

7. 2. 4 İleri mikroskopik değerlendirme:

Sperm canlılık testi: Canlı sperm yüzdesinin saptanması için çeşitli testler mevcuttur. Başlıca testler; HOS testi (Hyperosmolar swelling test) ve eozin testidir. 200 adet sperm faz kontrast mikroskopta sayılarak canlılık yönünden değerlendirilir(14, 15).

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi:

Sperm morfolojisi değerlendirmesi için de çeşitli boyalar mevcuttur. Tüp bebek merkezlerinde çoğunlukla Diff- Quick ve Spermac boyaları kullanılmaktadır(14,15).

Sperm morfolojisinin kesin kriterleri:

Sperm başı ovoid ve düzgün konturlu olmalı, iyi sınırlanmış bir akrozomal kılıf içermelidir.

Baş boyutları, 4–6 mikron X 2–3 mikron X 1,5 mikron olmalıdır.

Akrozom, baş alanının %40–70' ini kaplamalıdır.

Akrozom altında kalan bölümlerin konturları düzgün olmalıdır.

Boyun, orta parça ve kuyruk anomalisi olmamalıdır.

Orta parça silindirik ve baş ile aksiyel olmalıdır.

Orta parça eni 1 mikron, uzunluğu baş uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır.

Orta parça sitoplazmik artık içermemelidir.

Kuyruk uniform, orta parçadan daha ince ve 45–55 mikron uzunluğunda olmalıdır(16).

Kesin kriterlere göre morfolojik değerlendirmede dikkat edilecek noktalar:

Sperm tütünün morfolojik yapısı değerlendirilmelidir.

Değerlendirme 1000X büyütme alanında yapılmalıdır.

Değerlendirme esnasında hücre kümelerinin bulunduğu bölgelerdeki sperm dikkate alınmamalıdır.

Preparatın değişik bölgelerinde minimum 200 hücre değerlendirilmelidir(16).

Antisperm antikor testleri: Antisperm antikorlar serumda, sperm yüzeyinde veya seminal plazmada bulunabilmektedir. Semende var olan sperm antikorlarının çoğu IgG ve IgA sınıfındadır(14, 15).

Semende antikor bakışı için de çeşitli testler mevcuttur(14, 15).

Immunobead testi: Direkt ve indirekt testler mevcuttur(14,15). Direkt testle sperm yüzeyindeki antikorlar belirlenir. Eğer % 50 ve üzerinde sperm immunobeadlerle kaplı ise test pozitifdir(14, 15).

MAR(mixed antiglobulin reaction) testi: Bu testlerin de 2 tipi vardır. MAR IgG testi ve MAR IgA testi

Bu testler her zaman birbiri ile uyumluluk göstermez. Ancak bu testler pozitif olduğunda ek testlere başvurulur. (sperm servikal mukus kontakt testi, sperm servikal mukus kapiller testi) (14, 15, 17).

MAR testi: Bu testin uygulanabilirliği için semen örneğinde yeterli sayıda sperm olmalıdır. Eğer %50 ve üzerinde sperm partiküllere bağlanırsa immünolojik infertilite araştırılmalıdır (13, 14, 15).

Antisperm antikorlara aşağıdaki durumların varlığında bakılmalıdır:

1. Semende aglütinasyon varlığında
2. Asthenozoospermia olgularında
3. Lökospermi varlığında
4. Açıklanamayan infertilitede.

MAR testleri, immünolojik infertilite tanısında yardımcı testlerdir(17).

Semende lökosit bakısı:

Semende lökosit bakısı için özel testler mevcuttur. Özel lökosit boyası ile sarı-kahverengi hücreler lökosit olarak değerlendirilir. Semende 1 milyon/ml' nin üzerinde lökosit varlığı lökospermi olarak tanımlanır. (13, 17)

7. 3 Sperm motilitesini etkileyen faktörler:

7.3. 1 Sperm motilitesini olumsuz yönde etkileyen iç faktörler:

Sperm motilitesi, yeterli miktarda ATP (adenosine triphosphate), normal bir iyon ortamı ve fonksiyonel aksonemal dynein ATP' azları gibi çeşitli iç hücresel etmenlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Bu etkileşimi engelleyen her türlü dış faktör sperm motilitesini bozabilmektedir(18).

7. 3. 2 Sperm motilitesini olumsuz yönde etkileyen dış faktörler:

Enfeksiyon, bakteri ve bakteri ürünleri_(örneğin E. Coli, geçirilmiş kabakulak enfeksiyonu)

Sitokinler

Erkek genital sisteminin içerdiği ve lokal immun yanıtlara ait humoral ve hücrel immünite ürünleri IL-1, IL-6 ve TNF-a

Semende bulunan bazı hücreler (lökosit ve anormal spermatozoa)

Semende serbest oksijen radikalleri salgılatan faktörler

Testiküler travma, cerrahi girişim

Ciddi alerjik reaksiyon

Sıcaklık artışı: Skrotumda küçük sıcaklık yükselmelerinin bile sperm motilitesini olumsuz etkileyebileceği gözlenmiştir.

Çevresel faktörler: Radyasyon, meslek

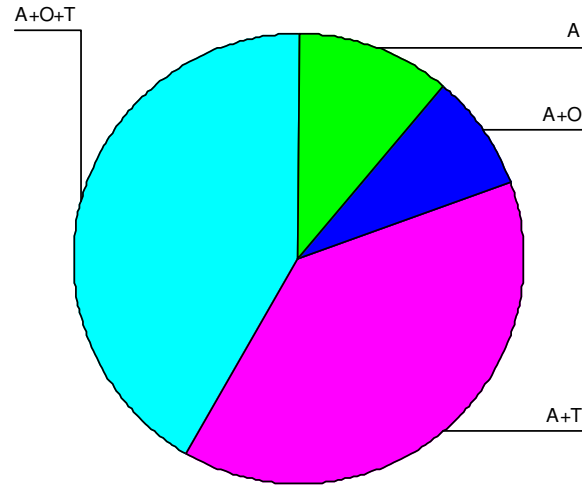
Alkol, uyuşturucu madde, sigara, ilaçlar(18, 19).

8. GEREÇ ve YÖNTEMLER

8.1 Olgular

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezine 15 Kasım 2004 ile 5 Nisan 2005 tarihleri arasında başvuran toplam 89 olgu (sperm motilite bozukluğu olan 36 olgu ile motilite bozukluğu olmayan 53 olgu) çalışma kapsamına alındı(Şekil 1). Kontrol grubunun yaş ortalaması 34.4 ve yaş aralığı 24–45 idi. Motilite bozukluğu olan grubun ise yaş ortalaması 34.6 ve yaş aralığı 24–52 idi. Olguların infertilite süreleri ise 24 aydır.

Merkeze başvuran olguların yaş grupları ve mevsimsel dağılımı Tablo 3 ve Tablo 4’ de görülmektedir.



Şekil 1. Sperm motilite bozukluğu olan olguların grafiksel olarak dağılımı

A: Asthenozoospermia (4, % 11, 1)

A+O: Asthenozoospermia +Oligozoospermia (3, % 8, 3)

A+T: Asthenozoospermia + Teratozoospermia (14, % 38, 8)

A+O+T: Asthenozoospermia +Oligozoospermia+ Teratozoospermia (15, % 41,6)

Tablo 3. Araştırmaya alınan olguların mevsimsel dağılımı

MEVSİM	OLGU			
	sperm hareketliliği normal	A	A+O A+T A+O+T	Toplam
Aralık-Ocak-Şubat	37	2	22	61
Mart-Nisan-Mayıs	0	2	7	9
Haziran-Temmuz-Ağustos	2	0	0	2
Eylül-Ekim-Kasım	14	2	1	17
Toplam	53	6	30	89

Tablo 4. Olguların yaşlara göre dağılımı

	YAŞ			Toplam
	29 yaş ve altı	30-40 (30 ve 40 yaş dahil)	40 yaş üstü	
sperm hareketliliği normal	7	40	6	53
astheno+kombine	5	27	4	36
Toplam	12	67	10	89

Astheno: asthenozoospermia

Kombine: A+O: Asthenozoospermia +Oligozoospermia

A+T: Asthenozoospermia + Teratozoospermia

A+O+T: Asthenozoospermia +Oligozoospermia+ Teratozoospermia

8. 2 Semen Analizi

Semen örnekleri mastürbasyon yöntemi ile 4 günlük ideal cinsel perhiz sonrası elde edildi. Mastürbasyonla elde edilen semen örneği steril ve geniş ağızlı bir kaptan toplandı.

Semenin likefaksiyonu için 30 dakika beklendi.

Tüm olgulara makroskopik değerlendirme yapıldıktan sonra mikroskopik değerlendirme ile sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi değerlendirildi. Ayrıca lökositin boyası ile semende lökosit miktarı belirlendi. Aglütinasyon saptanan semen örneklerine ise IgG MAR testi uygulandı.

8. 2. 1 Makroskopik değerlendirme:

Renk, koku, viskozite, aglütinasyon ve koagülasyona bakıldı.

Semen örneği viskozitesi semikantitatif olarak şu şekilde ölçüldü:

Viskozitenin değerlendirilmesi için 5 ml lik pipet kullanıldı. Likefaksiyondan sonra ejakülat 5 ml' lik pipetle aspire edildi ve bir damla semenin kendi ağırlığı ile pipetten damlamasına izin verildi. 2 cm' den fazla ipliksi bir şekilde uzayan semen damlaları hiperviskozite olarak değerlendirildi. Viskozite, sübjektif olarak 4 dereceli bir skalada değerlendirildi:

+1: viskozite normal,

+2: biraz artmış viskozite (yoğun),

+3: orta derecede artmış viskozite(pipete alınması zor) ve

+4: oldukça artmış viskozite (pipete alınamamaktadır).

Geçerli viskozite 30 dakikalık likefaksiyon sonrası +1 derece olarak kabul edildi.

PH ölçümü ise, bir damla semenin pH kâğıdı üzerine damlatılması ile yapıldı.

Semen volümü dereceli pipetle ölçülerek saptandı.

8. 2. 2 Mikroskopik Değerlendirme:

Faz kontrast mikroskobu ile değerlendirme yapıldı.(Olympus,CH40)

Sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdesinin belirlenmesi için Makler Sayım Kamerası kullanıldı.

Semen örnekleri 37° C 'de bekletildi ve motilite değerlendirmesi ejakülasyondan sonra 1 saat içinde oda sıcaklığında yapıldı. Sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdesi WHO kriterlerine göre belirlendi. 200 sperm sayıldı. Her bir spermin motilitesi 4 kategoride skorlandı:

- Hızlı ileri hareketli
- Yavaş ileri hareketli

- Yerde hareketli
- Hareketsiz (immotil)

Mikroskop alanını lineer motilite ile geçen spermiler ileri hareketli olarak değerlendirildi. Lineer motilitesi olmayan spermilerle, lineer motilitesi olan spermilerin toplam yüzdesi ise toplam hareketlilik olarak belirlendi.

Semende lökosit bakışı için lökositin boyası Leucoscreen (Ferti Pro N.V) kiti kullanıldı(Ek 1).

Sperm morfolojisi bakışında Diff-Quick ve Spermac boyaları kullanıldı. Toplam 65 olguya her iki boya yöntemi de uygulandı. 4 olgu sadece Diff-Quick, 2 olgu ise sadece Spermac boya ile boyandı(Ek 2 ve Ek3).

Sperm hareketliliği normal olan 44 olgu ile sperm hareketliliği düşük olan 25 olguda sperm morfolojisi bakılırken Diff- Quick boyama yöntemi ile toplam orta parça anomali yüzdesi ve toplam kuyruk anomali yüzdesi ortalaması hesaplandı.

Motilitesi normal olup aglütinasyon saptanan 3 örneğe ve motilite bozukluğu olan 34 olguya MAR Testi IgG yapıldı(Ek 4).

Motilite bozukluğu olan 21 semen örneğine ise yukarıda sayılan testlere ek olarak; canlılık testleri için Eozin (Vital Screen) ve HOS testi birlikte uygulandı. 2 örneğe ise sadece eozin testi uygulandı(Ek 5 ve 6).

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde, Krüger kriterleri ve diğer parametreler için WHO kriterleri kullanıldı.

Ayrıca her olguya sigara içip içmediği ve sigara içenlere günde kaç paket içtiği soruldu(Tablo 5 ve Tablo 6).

Tablo 5. Olguların sigara kullanımı

	OLGU			
	sperm hareketliliği normal	A	A+O A+T A+O+T	Toplam
Sigara içmeyenler	27	4	17	48
1 paketin altında sigara içenler	10	0	4	14
1 paket ve üstünde sigara içenler	16	2	9	27
Toplam	53	6	30	89

A: Asthenozoospermia

A+O: Asthenozoospermia +Oligozoospermia

A+T: Asthenozoospermia + Teratozoospermia

A+O+T: Asthenozoospermia +Oligozoospermia+ Teratozoospermia

Tablo 6. Sigara kullanan ve kullanmayan olguların yaş dağılımı

SİGARA		YAŞ			
		29 yaş ve altı	30-40 (30 ve 40yaş dahil)	40 yaş üstü	TOPLAM
Sigara içmeyenler	sperm hareketliliği normal	2	23	2	27
	astheno+kombine	2	17	3	22
	TOPLAM	4	40	5	49
Sigara içenler	sperm hareketliliği normal	5	17	4	26
	astheno+kombine	3	10	1	14
	TOPLAM	8	27	5	40

Astheno: asthenozoospermia

Kombine: A+O: Asthenozoospermia +Oligozoospermia

A+T: Asthenozoospermia + Teratoospermia

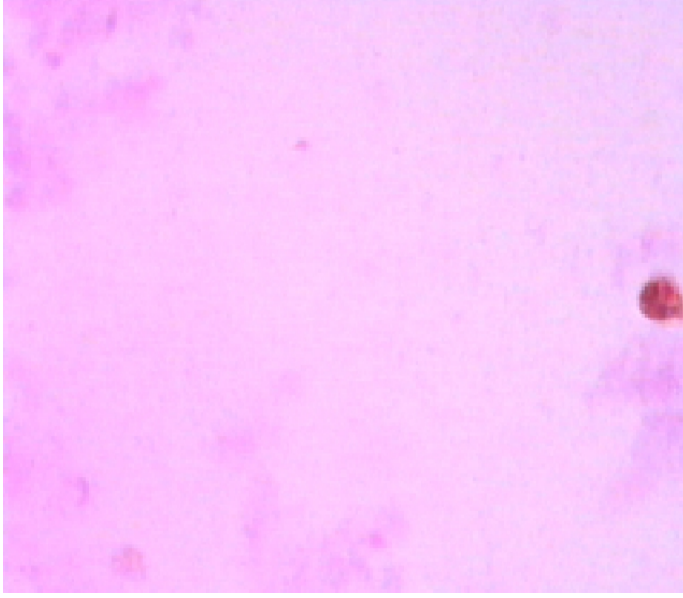
A+O+T: Asthenozoospermia +Oligozoospermia+ Teratoospermia

8. 3 İSTATİSTİKLER

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 11 programı (Statistical Package for the Social Sciences) ve ki -kare testleri kullanıldı. Boyaların ve canlılık testlerinin karşılaştırılması Binomial (sign) testi ile yapıldı(20).

9. BULGULAR:

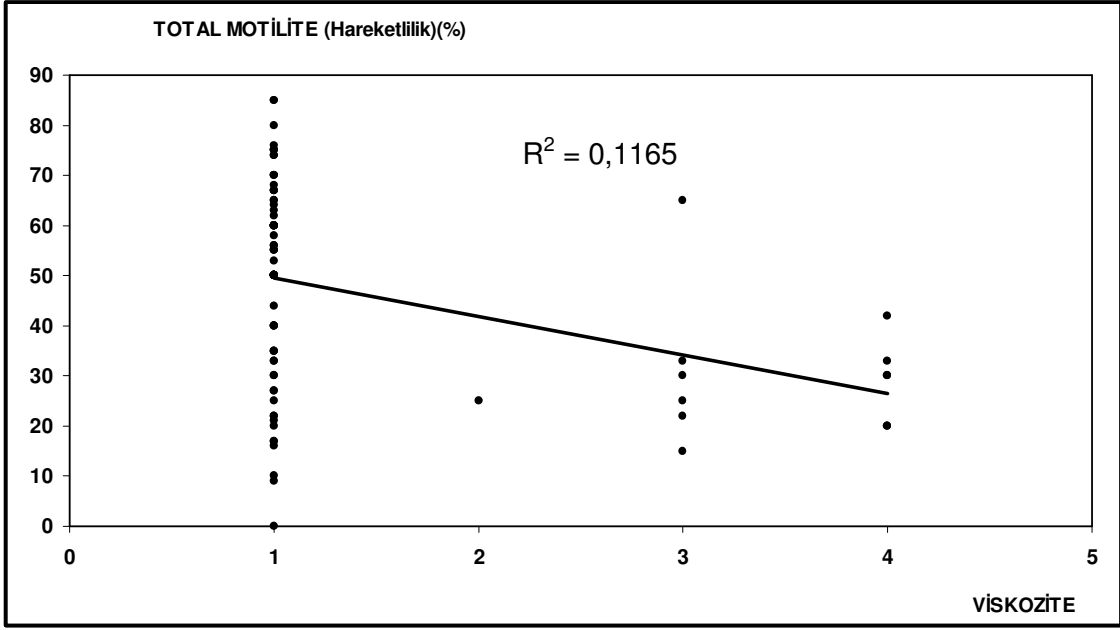
Sperm hareketliliği normal olan 53 semen örneği ile düşük hareketli sperme sahip 36 semen örneği üzerinde yapılan bu çalışmada lökosperti ile sperm hareketliliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı(Şekil 2).



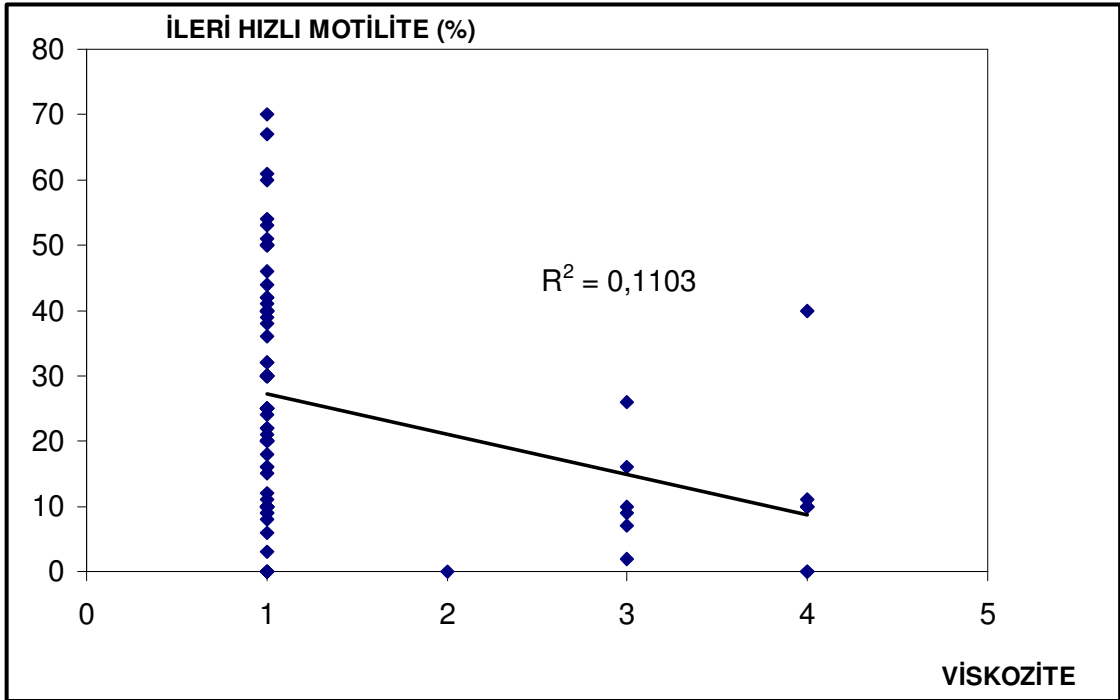
Şekil 2. Semen örneğinde sarı-kahve renkte gözlenen lökosit(Lökositin boyasıX400)

Hareketliliği normal olan 53 semen örneğinde toplam motilite ortalaması % 61,22, ileri hızlı hareketlilik % 36, 73 iken, motilite bozukluğu olan 36 olguda toplam motilite ortalaması % 26, 47, ileri hızlı hareketlilik ise % 8, 94 idi. Hareketliliği normal olan 53 olgunun 4'ünde hiperviskozite saptanırken (3 olguda +3 ve 1 olguda +4 viskozite); sperm motilite düşüklüğü olan 36 olgunun 12' sinde hiperviskozite saptandı. Hiperviskozite saptanan 12 olgunun 6'sında +4, 5'inde +3, 1' inde + 2 viskozite bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirmede hiperviskozite ile sperm motilite düşüklüğü arasında anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p=0.016$). Hiperviskozite ile düşük total sperm motilitesi ve hızlı progresif motilite arasında negatif bir korelasyon bulundu. ($p<0.05$, $R= -0,3$)(Şekil 3 ve 4).

37 olguda yapılan antisperm antikor Ig G testlerinde olguların hepsinde test negatif sonuç verdi. Anti sperm antikor IgG testi negatif olduğu için, olgulara antisperm antikor IgA testi uygulanmadı.



Şekil 3. Total motilite ile viskozite arasındaki ilişki



Şekil 4. İleri hızlı motilite ile viskozite arasındaki ilişki

Sigara içimi ile semen sperm parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0.05$).

Canlılık testlerinin karşılaştırılmasında 21 olguya HOS ve Eozin testleri birlikte uygulandı. 10 olguda her iki testte de pozitif sonuç alınırken 4 olguda ise negatif sonuç elde edildi. 7 olguda ise HOS testi sonucu negatifken, Eozin testi pozitif olarak saptandı. Yapılan binomial (sign test) istatistiksel değerlendirmede testlerin güvenilir olduğu saptandı.

Toplam 67 olguya Diff-Quick ve Spermac boyaları birlikte uygulandı. Diff-Quick ile boyanan 3 örnekte baş, orta parça ve kuyruk anomalisi gözlenen 4 sperm fotoğraflandı(Şekil 5, 6,7) ve bu örneklerden birinde az rastlanan baş anomalilerinden olan akrozom yokluğu iki spermde görüntüledi(Şekil 5). Spermac ile boyanan bir örnekte ise baş, orta parça ve kuyruk anomalisi gözlenirken(Şekil 8); bir başka örnekte normal sınırlara yakın bir sperm fotoğraflandı(Şekil9). Yine Spermac boya ile immatürite işareti olarak kabul edilen çift başlı bir sperm görüntüledi(Şekil10).



Şekil 5. Akrozomu olmayan 2 sperm(Diff-Quick boyası, X1000)



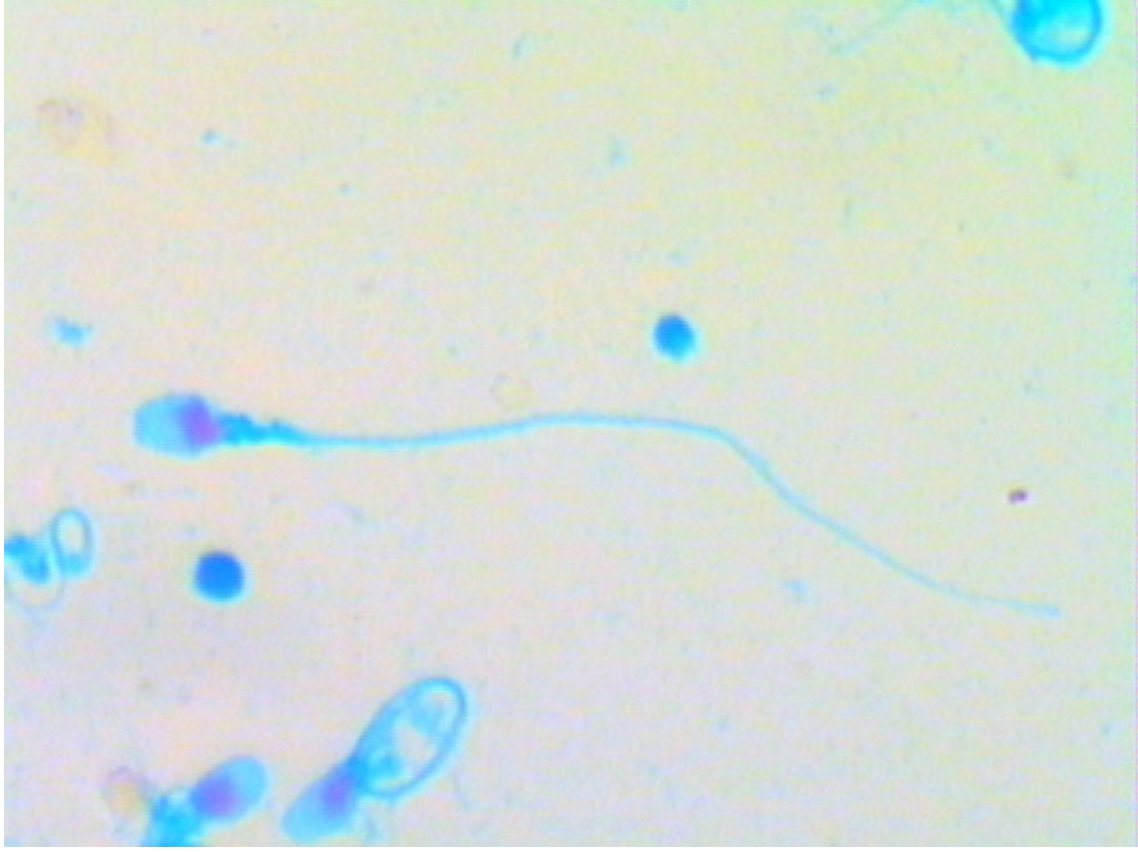
Şekil 6. Bir asthenozoospermia olgusunda baş, orta parça, kuyruk anomalisi gözlenen sperm(Diff-Quick boyası, X1000)



Şekil 7. Bir asthenozoospermia olgusunda baş, orta parça, kuyruk anomalisi gözlenen sperm (Diff-Quick boyası, X1000)

Toplam 57 olguda test sonuçları paralellik gösterdi. Test sonuçları paralellik gösteren 32 olguda sperm morfolojisi her iki testte de normal bulunurken 23 olguda morfoloji yüzdesi düşük bulundu. Geri kalan 10 olgunun ise 7' sinde sperm morfolojileri Diff-Quick boya ile normal yüzdede bulunurken Spermac boya ile anormal bir yüzde saptandı. 3 olguda ise

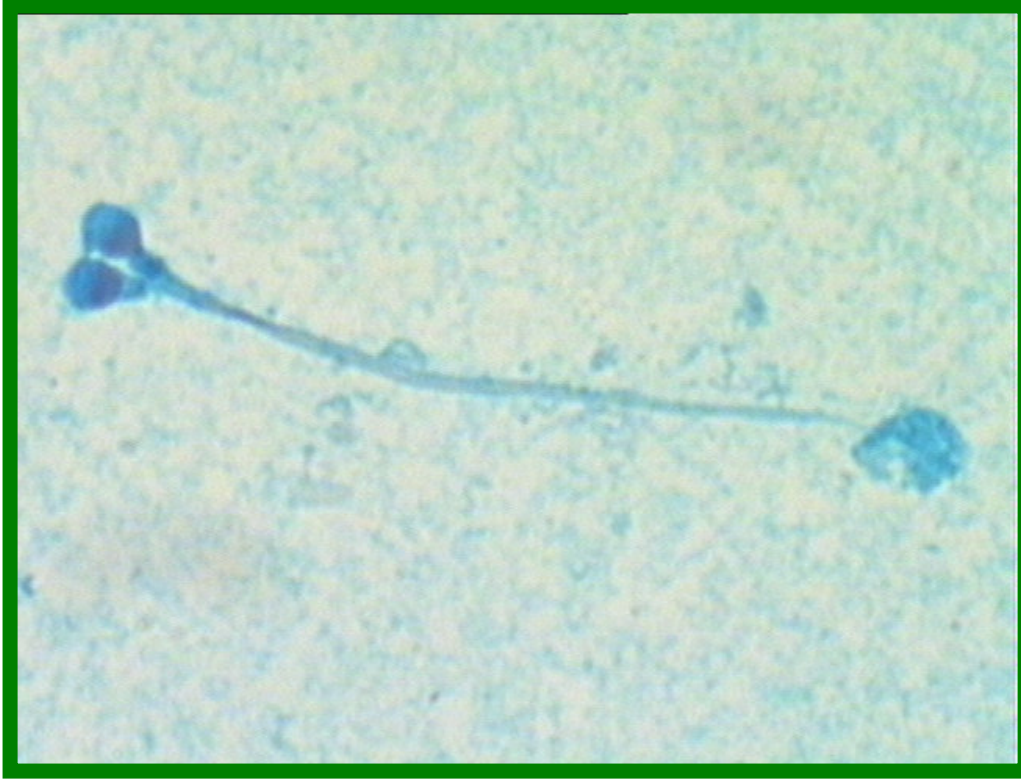
Spermac boya ile sperm morfolojisi normal sınırlarda gözlenirken Diff-Quick boya ile anormal sperm morfolojisine rastlandı. Yapılan binomial (sign test) istatistiksel değerlendirmede testlerin güvenilir olduğu saptandı.



Şekil 8. Bir asthenozoospermia olgusunda baş, orta parça, kuyruk anomalisi gözlenen spermler (Spermac boya,X1000)



Şekil 9. Normoozoospermia olgusuna ait bir örnekte üstte normal sınırlarda bir sperm (Spermac boya,X1000)



Şekil 10. Çift başlı bir sperm(Spermac boya,X1000)

Sperm hareketliliği normal olan 44 olgu ile sperm hareketliliği düşük olan 25 olguda sperm morfolojisi bakılırken Diff- Quick boyama yöntemi ile toplam orta parça anomali yüzdesi hesaplandı. Toplam orta parça defekti yüzdesi ortalaması, hareketliliği düşük olan olgularda kontrol grubuna iki kat daha yüksek oranda bulunurken (%9 ve %18); toplam kuyruk defekti yüzdesi ortalaması 0,6 kat daha yüksek bulundu(%21,3 ve %34,8).

10. TARTIŞMA:

Günümüzde yardımcı üreme tekniklerinin yaygınlaşması ile infertilite nedenleri daha çok araştırılmakta ve fertilizasyonda önemli rolü olan sperm motilitesindeki düşüklük, birçok çalışmada yer almaktadır.

Retrospektif bir çalışmada infertil erkeklerde tek başına asthenozoospermia prevalansının %18.71 olduğu ve bu oranın oligo ve/veya teratozoospermia ile birlikte %81.84' e çıktığı saptanmıştır(21). Bu yüksek oran konuyu özellikle tüp bebek merkezleri açısından daha önemli kılmaktadır.

Lökospermi ile asthenozoospermia arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalara baktığımızda yapılan bir çalışmada lökospermi ile asthenozoospermia arasında direkt bir ilişki saptanmadığı görülmektedir(21).

Diğer bir çalışmada özellikle orta parça anomalileri olan anormal spermatozoa oranındaki yüksekliğin beyaz kan hücrelerindeki artışla ilişkisi gösterilmiştir.(22).

Bazı yayınlarda ise insan semeninin fertilizasyon potansiyeli ile beyaz kan hücreleri arasındaki ilişkinin henüz açıklığa kavuşmadığı ancak, semende lökosit varlığının reaktif oksijen mediatörleri üretiminde etkili olduğu bildirilmiştir(23).

Bu çalışmada ise lökospermi ile asthenozoospermia arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0.05$).

Ancak semende lökosit varlığının serbest oksijen radikalleri üretimine yol açtığı bilinmektedir(21). Serbest oksijen radikalleri de sperm motilitesini olumsuz etkilemektedir(18, 19). Bu konuda daha fazla hasta grubu ile çalışılması daha doğru sonuçlar verecektir.

Hiperviskozite ile sperm motilitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalara baktığımızda literatürde viskozite testlerinin tek test yerine semen analizinin bir parçası olarak değerlendirildiği görülmektedir(2, 3, 4, 24). Bu çalışmada ise hiperviskozite ile motilite ilişkisi prospektif bir çalışma ile değerlendirilmeye çalışıldı ve olası deneysel hatalar analizlerin bir kişi tarafından yapılması sağlanarak en aza indirildi.

Asthenozoospermia ile ilgili yapılan retrospektif çalışmalarda semen hiperviskozitesi ile motilite arasında negatif bir ilişki gözlenmiştir(2, 4, 24). Bu çalışma ise aynı ilişkiyi prospektif bir çalışma ile göstermeyi hedefledi.

Düşük sperm motilitesi olan grubun kontrol grubuna göre daha yüksek oranda hiperviskozite gösterdiği görüldü. Aynı ilişki total hareketlilik ve hızlı ileri hareketlilik ile hiperviskozite arasında da gözlemlendi.

De Celis ve arkadaşlarına göre; kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında hidrokarbona maruz kalan grupta hiperviskozite ve gecikmiş likefaksiyona daha fazla rastlanmıştır(25).

Diğer bir çalışmada ise semenden visköz kitlenin uzaklaştırılması ile motilitenin az da olsa arttırılabileceği saptanmıştır(26).

Bu çalışmada da sperm motilitesinin hiperviskoziteden etkilenebileceği gösterildi. Üstelik hiperviskozite sadece total hareketliliği değil, hızlı ileri hareketliliği de etkilemekteydi. Bu da özellikle fertilizasyonda önemli olan hızlı ileri hareketliliğin etkilenmesi açısından önemli bir konudur.

Yapılan bir çalışmada mevsimsel farklılıkların sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, semen volümü ve ileri hareketli sperm yüzdesi üzerinde belirgin istatistiksel değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir(27).

Diğer bir çalışmada kışın sperm konsantrasyonun arttığı, yaz ve sonbaharda belirgin olarak ortalama baş defekti yüzdesinde artış olduğu ve yine aynı çalışmada normal morfoloji ortalama yüzdesinin kışın belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Sperm konsantrasyonunun sonbaharda en az, normal morfoloji yüzdesinin ise yazın en az olduğu gözlenmiştir(28).

2004 yılında yayınlanmış bir başka çalışmada ise diğer mevsimlere oranla ilkbaharda daha yüksek sperm konsantrasyonu, daha yüksek motilite ve daha yüksek normal morfoloji yüzdesi elde edilmiştir(29).

Bu çalışmada ise mevsimsel hasta dağılımının özellikle kış aylarında yoğunlaştığı gözlemlendi. Somut veriler elde etmek için yeni olgular eklenerek mevsim ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin tekrar değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Literatüre bakıldığında fertilitte sorunu olan çiftlerde özellikle kadın odaklı yaş faktörünün araştırıldığı görülmektedir. Ancak fertilizasyonda erkek yaşının önemi konusunda çok fazla çalışma bulunmamaktadır.

Chen ve arkadaşlarının 2003 yılında 551 olguda yaptığı bir çalışmada semen volümü, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, motilite ve normal morfolojili sperm sayısının yaşla azaldığı saptanmıştır(28). Yine Chen ve arkadaşlarının 306 olgu üzerinde mevsim yaş ve sigara kullanmanın semen parametreleri üzerine etkisini araştıran bir başka çalışmasında yaş grupları ile semen volümü, sperm konsantrasyonu, motilite yüzdesi ve normal morfoloji yüzdesi arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir(29). Ancak Eskenazi ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı bir çalışmada semen kalitesinde yaşa bağlı belirgin bir azalma saptanmıştır. Özellikle bu durum semen volümü ve sperm motilitesi konusunda daha belirgin olarak gözlemlenmiştir(30).

Bu çalışmada ise yaş grupları ile sperm motilitesi düşüklüğü arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0.05$). Bulgulara bakıldığında çalışmaya dahil edilen 89 olgunun 67'sinin 30-40 yaş arası gruba dahil olduğu gözlemlendi. Tüp bebek merkezine başvuran olguların 10'unun 40 yaş üstünde olduğu saptandı. Yaş faktörü ile sperm parametreleri arasındaki ilişki değerlendirmesinin üroloji klinikleri gibi ileri yaş erkeklerin başvurduğu kliniklerin verileriyle birlikte değerlendirilmesi daha somut veriler sağlayacaktır.

Sigara ve sperm parametreleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bir kısım yayınlar sperm parametrelerinin sigara kullanımından etkilendiğini savunurken, yapılan bazı çalışmalarda ise sigara ile sperm parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Bir çalışmada semen volümü, total sperm sayısı, HOS testi ile sigara kullanımı arasında direkt bir ilişki saptanamamış, ancak motilite ve morfoloji bozukluklarının sigara içenlerde daha fazla olduğu gözlenmiştir(31). Yine aynı çalışmada sigara içenlerde semende lökosit konsantrasyonunun içmeyenlere göre daha fazla olduğu saptanmıştır.

Alkol ve sigaranın semen parametreleri üzerine etkisini araştıran bir başka çalışmada ise alkol veya sigara tüketiminin semen parametrelerini etkilemediği, ancak her ikisini birlikte kullananlarla kullanmayanlar karşılaştırıldığında semen volümü, sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdesinde belirgin bir azalma ve motil olmayan canlı spermelerde belirgin bir artma gözlenmiştir. Böylece bu iki alışkanlığın sinerjik veya aditif etkisi tartışılmıştır(32).

İnfertil Türk erkeklerinde yapılan bir çalışmada günde 20 adet ve daha fazla sigara içenlerde sperm kuyruk defektlerinin daha fazla olduğu gözlenmiş, ancak ilginç olarak günde 20'nin üzerinde sigara içenlerde hafif içicilere göre ileri hareketliliğin daha fazla olduğu saptanmıştır(33). Ancak İsveç erkeklerinde yapılan çalışmada semen volümü ve total sperm konsantrasyonu dışında semen kalitesi ile sigara içimi arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır(34).

Buna karşın Trummer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonucunda sigara içiminin semen parametrelerini etkilemediği, ancak yuvarlak hücre ve lökosit oranını anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir(35).

Antisperm antikörlerinin sigara içenlerde daha fazla oranda gözlemlendiği çalışmalar da bulunmaktadır(36).

Bir diğer ilginç çalışma sigara içenlerde sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, motilite ve total motil sperm yüzdesinde belirgin mevsimsel değişiklikler olduğunu ve bu parametrelerin daha sıcak mevsimlerde düştüğünü göstermektedir. Ancak sigara içmeyenlerde artan sıcaklıkla böyle bir etki görülmemiştir(37).

Sigara içmeyenlerin sperm kalitesinin daha iyi olduğunu bildiren pek çok yayın bulunmaktadır(30, 38, 39). Ayrıca bir yayında sigara içenlerin seminal plazmasına konulan sigara içmeyenlerin sperm canlılığında belirgin azalma; bununla beraber sigara içmeyenlerin seminal plazmasına veya Ham's F-10 mediumuna maruz bırakılmış sigara içenlerin sperm canlılığında anlamlı artış saptanmıştır(39).

Bu çalışmada sigara ile semen sperm parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0.05$).

Ancak yapılan daha geniş kapsamlı çalışmaların incelendiği bir derlemede sigara ile infertilite arasındaki ilişki değerlendirilirken, sperm motilitesinin sigaradan olumsuz etkilendiği de gösterilmiştir(40)

Bu çalışmanın yapıldığı merkezde yapılan bir diğer poster çalışmasında da sperm hareketliliği ile sigara arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir(41).Çok değişik görüşlerin olduğu bu konunun daha geniş kapsamlı retrospektif çalışmalarla incelenmesi gerekmektedir. Bu çalışma yeni eklenen olgularla devam edecektir.

Bir başka çalışmada sperm bağlı antikorların normal gruba göre asthenozoospermia olgularında daha yüksek oranda olduğu ve antisperm antikorlarının varlığının fertilizasyonu etkileyebileceği gözlenmiştir(42).

Bazı sperm bağlı antikorların fertilizasyonu olumsuz yönde etkileyebileceğini savunan bir başka çalışmada bu durumun ASA(antisperm antikorlar) ile erkek immünolojik infertilitesi arasındaki ilişkiye bağlı olabileceği düşünülmüştür(43).

Bu çalışmada ise 37 olguya antisperm antikor testi Ig G uygulandı ve test negatif sonuç verdi. Daha fazla olguda motilite ile antisperm antikor ilişkisinin tekrar değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Sperm canlılık testi değerlendirmesi özellikle tüp bebek merkezlerinde olgunun ICSI (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) için yönlendirilmesinde oldukça önemlidir. Yapılan bir çalışmada kullanılan 2 testten biri olan HOS testinin ciddi ve tam asthenozoospermia olgularında sperm viabilitesini gösterebilen bir test olduğu sonucuna varılmıştır(44).

Tartagni ve arkadaşlarının 2002 yılında yayınlanan bir çalışmasında normal semen parametreleri olan, ancak subnormal HOS testi skorlarına sahip erkeklerin eşlerinde çok düşük oranda gebelik olduğu görülmüştür.Bu çalışmada da HOS testinin önemi bir kez daha ortaya kondu(45).

Domuz ve boğa spermleri üzerinde yapılan diğer bir ilginç çalışmada, nükleik asit boyaları propium iodide veya Hoechst 33258 ile eozin karşılaştırılmış ve anlamlı farklılık

bulunmuştur. Propium iodide diğer boyalara göre daha fazla sayıda boyalı yani ölü hücre göstermiştir(46).

Canlılık testleri ejakülatta, epididimis ve testisten alınan dokularda veya dondurulup çözülmüş örneklerdeki canlı spermi belirlemede önemli testlerdir. Ancak Eozin-Y spermi öldürdüğü için ICSI sikluslarında kullanımı uygun değildir(47).

Bu çalışmada da HOS testi ile eozin testinin birbirlerinin yerine kullanılabilceği görülmüştür. Ancak HOS testinin toksik etkisinin olmaması nedeniyle özellikle ICSI girişiminde sperm seçiminde güvenle kullanılabilir bir test olabileceği sonucuna varılmıştır.

Sperm morfolojisi de erkek infertilitesinde büyük önem taşımaktadır ve asthenozoospermia olgularında morfoloji de değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde; sperm orta parça uzunluğunun kontrol gruplarına göre asthenozoospermik olgularda belirgin olarak kısa olduğu (48), açıklanamayan asthenozoospermia olgularında yapılan bir başka çalışmada da periaksonemal anomalilerle aksonemal defektlerin sıkı ilişkide olduğu ve azalan motilitede aksonemal anomalilerin tek neden olmadığı gözlenmiştir(49).

Bu çalışmada ise toplam orta parça defekti yüzdesi ortalaması hareketliliği düşük olan olgularda kontrol grubuna göre iki kat daha yüksek oranda bulundu. Ayrıca toplam kuyruk anomalisi yüzdesi ortalaması da düşük motiliteye sahip olan olgularda 0,6 kat kadar daha yüksek oranda gözlendi.

11. SONUÇ ve ÖNERİLER

Lökositin semende varlığının motiliteyi bozucu etkisi bu çalışmada kanıtlanamadı. Ancak lökositlerin semende serbest oksijen radikallerine yol açması ve serbest oksijen radikallerinin sperm motilitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu durumda erkek üreme sisteminin enfeksiyonu ile ilgili faktörler ve hücreler fertilitiyi bozucu etkiye sahip olabilirler. Ancak bu konuda daha çok sayıda hasta ile çalışılmasına gereksinim vardır.

Erkek infertilitesinde önemli bir yer tutan sperm motilite düşüklüğünün hiperviskozitenin giderilmesi ile bir ölçüde iyileştirilebilmesi söz konusu olabilir. Aksesuar bez patolojileri ile ilişkili olabilen hiperviskozite nedeni araştırılıp infertilite nedenlerinden biri olan asthenozoospermia tedavisine katkıda bulunulabilir.

Sperm morfoloji bakışı için kullanılan 2 testin birbirine olan üstünlüğünün saptanamaması nedeniyle, bu testlerden ekonomik olanın seçilerek maliyetin düşürülmesi sağlanabilir.

Canlılık testleri olan eozin ve HOS testlerinin de istatistiksel olarak paralel sonuçlar vermeleri özellikle daha ucuz ve daha güvenli olan HOS testinin tercihini gündeme getirmelidir. Semen analizinde çok önemi olmayan ancak özellikle ICSI uygulanacak olgularda hücreye zarar vermemesi açısından HOS testinin tercih edilmesi söz konusudur. Canlılık testi olarak HOS testinin, eozin testinden çok farklı sonuçlar vermemesi hem ekonomik hem de toksik olmaması açısından değer taşımaktadır.

Yapısında aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibriller ve mitokondriyal tabaka yer alan orta parça defektlerinin ve hareketlilikte önemli rol oynayan kuyruk anomalilerinin de sperm hareketliliğini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak basit ve invaziv olmayan semen analizi yapılarak erkek infertilitesi ile ilgili pek çok ipucu elde edinilebileceği görülmektedir. Doğru ve güvenilir bir semen analizi ile asthenozoospermianın etiolojisi aydınlatılıp motilite tedavisinde önemli adımlar atılabilir.

12. KAYNAKÇA

1. Brugh VM 3rd, Matschke HM, Lipshultz LI. Male factor infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003; 32(3):689–707.
2. Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR, et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl.* 2003; 49(5):343-9.
3. Zavos PM, Correa JR. Effect of treatment of seminal viscosity difficulties with α -chymotrypsin on the recovery of spermatozoa for assisted reproductive technologies: comparison between the SpermPrep TM filtration and Percoll gradient centrifugation methods. *Middle East Fertility Society Journal.* 1997; 2 (3).
4. Michailichenko V.V, Esipov A.S. Clinical significance of ejaculate viscosity in man. *Problems of reproduction;* 2000(4).
5. Işık AZ, Vicdan K, Alaybeyoğlu L.(çevirenler): Rainsbury PA, Viniker DA. *Üreme Tıbbına Pratik Yaklaşımlar.* Birinci baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık, 1998; 93.
6. Glover, TD and Barratt, CLR, eds. *Male Fertility and Infertility.* First edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1999;162.
7. Baker DJ. Performing a quality semen analysis in the clinical laboratory. *MLO Med Lab Obs.* 2000; 32(12): 20-29.
8. *Androloji Workshop kitapçığı.* Antalya; 1998.
9. Young B, Heath JW. *Wheater' s Functional Histology.* Fourth edition. Sydney: 2000; 328-340.
10. Ross MH, Kays GI, Romrell RJ, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas.* Third edition. Lippincott: Williams & Wilkins 1995; 682-712.
11. Drews U, *Renkli Embriyoloji Atlası,* Aytekin Y, Gürsoy E, ed. *Renkli Embriyoloji Atlası.* İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri ; 2000; 6
12. Moore KL, Persaud TVN. *İnsan embriyolojisi,* ed. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. Birinci baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2002; 18-23.
13. Vicdan K, Işık AZ. *In Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar.* Birinci baskı. Ankara: Çağdaş Medikal Kitabevi; 1999:79, 82-99.
14. WHO Laboratory Manuel for the Examination on Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Fourth edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1999: 4-33, 76.

15. WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi, çev. ed. Günalp S. Dördüncü baskı. Ankara: Tıp Teknik Kitabevi; 2002: 4–33, 76.
16. Enginsu ME, Günalp S, Orhon E. Sperm Morfoloji Atlası; Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları; 13.
17. Can C, Turgut M, İnfertilite açısından erkeğin genel olarak değerlendirilmesi, ed. Hassa H. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları, birinci baskı. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Basımevi, 2003: 141–145.
18. http://www.androloji.info/motilite_bozukluklari_dis_faktorler.php
19. Speroff L, Glass RH, Kase NK, Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite, çev. ed. Erk A. Beşinci baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 1996: 884–885.
20. Aksakoğlu G. Sağlıkta araştırma teknikleri ve analiz yöntemleri. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Matbaası; 2001.
21. Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. Arch Androl. 2003; 49(5):343-9.
22. Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S et al. Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. Hum Reprod. 1997 ; 12(11):2418-21.
23. Frazcek M, Sanocka D, Kurpisz M. Interaction between leucocytes and human spermatozoa influencing reactive oxygen intermediates release. International Journal of Andrology. 2004; 27(2):69.
24. Elzanaty S, Malm J, Giwercman A. Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. International Journal of Andrology. 2004; 27(2):94-100.
25. De Celis R Velasco F, Gonzales_Unzaga M, Torres-Calleja J, Pedron-Nuevo N. Semen quality of workers occupationally exposed to hydrocarbons. Obstetrical & Gynecological Survey, 2000; 55(7): 436-437.
26. Yin HZ, Pierce KE, Bar-Ami S, Seibel MM. Removing viscous mass from hyper viscous semen is useful during semen preparation. Fertility and Sterility. 1997; 1997(1001):240-240(1)

27. Malm G, Haugen TB et al. Reproductive Function during Summer and Winter in Norwegian Men Living North and South of the Arctic Circle. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism*. 2004; 89(9):4397-4402.
28. Chen Z, Toth T, Godfrey-Bailey L, Mercedat N, Schiff I et al. Seasonal Variation and Age-Related Changes in Human Semen Parameters. *Journal of Andrology*. 2003; 24 (2).
29. Chen Z, Toth T, Godfrey-Bailey L, Schiff I, Hauser R. Impact of seasonal variation, age and smoking status on human semen parameters: The Massachusetts General Hospital experience. *J. Exp. Clin. Assist Reprod*. 2004; 1:2.
30. Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA et al. *Human Reproduction*. 2003; 18(2); 447-454.
31. Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Derwich K, Depa M et al. The sperm quality in fertile smokers. *Przegl Lek*; 2004; 61(10): 1028-30.
32. Martini AC, Molina RI, Estofan D, Senestrari D et al.. Effects of alcohol and cigarette consumption on human semen quality. *Fertil Steril*. 2004; 82(2): 374-7.
33. Özgür K, İşikoğlu M, Seleker M, Dönmez L. Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Turkish population. *Arch Gynecol Obstet*. 2005 Feb;271(2):109-12. Epub 2003 Dec 18.
34. Osser S, Beckman-Ramirez A, Liedholm P. Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Swedish population. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1992 Apr;71(3):215-8.
35. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Human Reproduction*. 2002; 17(6): 1554-1559.
36. Ludwikowski G, Szymanski W, Szymanski M, Adamczak R et al. Influence of cigarette smoking on none sperm parameters in males with decreased fertility. *Prego Lek*. 2004; 61(10): 1031-2.
37. Künzle R, Mueller MD, Huber AW, Drescher H et al. Seasonality in human semen quality of smokers and non-smokers: effect of temperature. *Asian Journal of Andrology*. 2004; Sep; 6: 243-247.
38. Zavos PM, Correa JR, Antypas S, Zarmakoupis-Zavos PN et al. Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity. *Fertility and Sterility*. 1998; 69(3).
39. Wang S, Wang X, Chia S, Shen H et al. A Study on Occupational Exposure to Petrochemicals and Smoking on Seminal Quality. *Journal of Andrology*. 2001; 22(1).
40. Özyurt D, Ok E. Sigara ve İnfertilite. *DEU Tıp Fakültesi Dergisi*. 2003; 1: 65-69.

41. Ok E, Özyurt D, Karagöz F, Gülekli B et al. Sigaranın sperm motilitesi ve konsantrasyonu ile ilişkisi. Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacology Toksikoloji Özel Sayısı. 2003; 1(1): 101.
42. Madar J, Urbanek V, Chaloupkova A, Nouza K et al. Role of sperm antibodies and cellular autoimmunity to sperm in the pathogenesis of male infertility. Ceska Gynekol. 2002 Jan; 67(1):3-7.
43. Shibahara H, Shiraishi Y, Hirano Y, Suzuki T et al. Diversity of the inhibitory effects on fertilization by the anti-sperm antibodies bound to the surface of ejaculated human sperm. Hum. Rep. 2003 Jul; 18(7): 1469-73.
44. Buckett WM. Predictive value of hypo-osmotic swelling test to identify viable non-motile sperm. Asian J. Androl. 2003 Sep; 5: 209-212.
45. Tartagni M, Schonauer MM, Cicinelli E, Selman H et al. Subnormal Hypo-Osmotic Swelling Test Scores as an Important Cause of Cryptic Infertility. Journal of Andrology. 2002; 23(4).
46. Pintado B, de la Fuente J, Roldan ERS. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eozin : accuracy in the assessment of cell viability. Journal of Reproduction and Fertility. 2000; 118, 145-152.
47. Khalili MA, Mir-Rokni F, Kalantar SM. Application of Vitality tests on asthenozoospermic semen from infertile men. Iran. Biomed. J. 3 1999; (3 & 4): 77-81
48. Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. Hum. Reprod. 1995 Jan; 10(1):116-9.
49. Courtade M, Lagorce C, Bujan L, Caratero C et al. Clinical characteristics and light and transmission microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. Fertility and Sterility. 1998 August; 70(2).
50. <http://www.aksuvar.com/frameset.htm>

13. EKLER

EK 1

MAR Testi IgG

Kitlerin ve örneğin oda sıcaklığına gelmesi beklendi

Lam üzerine;

10 µl taze semen

10 µl MAR Lateks partikülleri

10 µl MAR Sperm MAR Antitest kondu.

Örnek ve Latex kiti bir lamın köşesi ile 5 kez karıştırıldı.

Antiserum bu karışıma eklendi.

Lamel kapatıldı.

400X büyütmede incelendi. (3 dak. Sonra inceleme yapıldı.)

Motil sperme bağlı lateks partikülleri gözlemlendi.

100 sperm sayıldı.

%40'ın üzerinde yapışıklık varsa immünolojik infertilite olasılığı yüksek olarak değerlendirildi(50).

EK 2

Diff-Quick Boyama Prosedürü

1. Diff-Quik fiksatifinde yaymalar fikse edildi.
 2. Solüsyon 1'de 5 saniye lamlar boyandı.
 3. Solüsyon 2'de 5 saniye lamlar boyandı.
 3. adım sonrası lamlar deiyonize su ile yıkandı ve böylelikle fazla boya uzaklaştırıldı.
- ◆ Lamlar kapatıcı ile kapatıldı (14, 15).

EK 3

Spermac Boyama Prosedürü

- ◆ 1 damla semen lama yayıldı.
- ◆ Lam fiksatife kondu. 5 dak. bekletildi.
- ◆ Sonra bir saat kadar preparat havada kurutuldu.
- ◆ Bir kap içinde bulunan distile suya 6–7 kez daldırılarak yıkandı.
- ◆ Suyun fazlası kurutma kâğıdı ile alındı ve biraz kuruması beklendi.
- ◆ A BOYASI-----1-2 dak----Yıkama (yukarıdaki gibi)
- ◆ B BOYASI-----1 dak----- Yıkama (yukarıdaki gibi)
- ◆ C BOYASI-----1 dak----- Yıkama (yukarıdaki gibi)

- ◆ Preparat havada kurumaya bırakıldı.
- ◆ 100 büyütmede immersiyon yağı ile incelendi(50).

EK 4

LÖKOSİT BOYASI

1 gün önceden şu solüsyon hazırladı: 1 ml Kit 1 ' e 30µl. Kit 2 eklendi.

Bu solüsyon hazırlandıktan sonra 1 gün bekletildi.

10 µl(1 damla) sperm, 10 µl(1 damla) bir gün önceden hazırlanmış solüsyon lam üzerine damlatılıp lam köşesi ile karıştırıldı.

İlk 2 dakikalık karıştırmadan sonra hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek lamel kapatıldı.

2 dakika sonra mikroskopta X400 ' de incelendi(50).

EK 5

EOZİN TESTİ

50 µl semen, 2 damla A boyası steril test tüpünde karıştırıldı.

30 sn sonra 3 damla B boyası eklendi. Dikkatlice karıştırıldı.

B boyasının eklenmesini izleyen 30 sn. içinde semen boya karışımından 1 damla bir lama kondu ve ince bir smear olarak yayıldı.

Yayıldıktan sonra üzerine lamel kapatıldı.

Mikroskopta X400 büyütmede incelendi.

100 sperm sayıldı.

Yorum:

Kırmızı veya total olarak beyaz görünmeyen hücreler ölü olarak kabul edildi

Sonuçlar canlı (beyaz) spermatozoonların yüzdesi olarak verildi(50).

EK 6

HOS TESTİ

Prosedür:

1ml HOS solüsyonu ılındırıldı (37 °C de 5 dak.)

Bu solüsyona 1ml likefiye semen eklendi ve pipetle dikkatlice karıştırıldı.

30 dak 37 °C de tutuldu.

Mikroskopta bakıldı.

100 sperm sayıldı.

Kuyruk kıvrılması olan spermler ölü; kuyruk kıvrılması olmayan spermler canlı kabul edildi(50).