T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİ HOST UYGULAMASI SONUCU SPERM MEMBRAN FONKSİYONEL BÜTÜNLÜĞÜNÜN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOP DÜZEYDE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Yekbun TUTŞİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat AKKUŞ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
2009

Bu tez DÜBAP tarafından desteklenmiştir.

(Proje No: 07.02.04)

III

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

"Anti-HOST uygulaması sonucu sperm membran fonksiyonel bütünlüğünün ışık ve elektron mikroskop düzeyde incelenmesi" başlıklı doktora tezi 09.10.2009 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat AKKUŞ
Tezi Teslim Eden : Yekbun TUTŞİ

Jüri Üyesinin Unvanı, Adı Soyadı	**Üniversitesi**
Başkan: Prof. Dr. Yusuf NERGİZ	Dicle Üniversitesi
Üye: Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL	Gazi Üniversitesi
Üye: Prof. Dr. Yılmaz BİLGİN	Dicle Üniversitesi
Üye: Prof. Dr. Murat AKKUŞ	Dicle Üniversitesi
Üye: Prof. Dr. Ayda DEMİRANT	Dicle Üniversitesi

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

09 / 10 / 2009

Prof. Dr. Yusuf NERGİZ
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında değerli bilgileri ile yol gösteren ve bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Murat AKKUŞ' a, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Yusuf NERGİZ' e, tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Muzaffer TAŞ, Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ, Yrd. Doç. Dr. Özlem BARAN, Dr. Yasemin NASIR, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görevli diğer öğretim elemanlarına, istatistiksel analizleri yapan Prof. Dr. Ömer SATICI' ya ve doktora tez projemi mali yönden destekleyen Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Yekbun TUTŞİ

Diyarbakır, 2009

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
İÇ KAPAK	**II**
ONAY SAYFASI	**III**
TEŞEKKÜR	**IV**
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	**V**
ŞEKİLLER DİZİNİ	**VIII**
TABLOLAR DİZİNİ	**XIII**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	**XIV**
ÖZET	**XVI**
ABSTRACT	**XVII**
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Primordiyal Germ Hücrelerinin Gelişimi	4
2.2. Testis Anatomisi	5
2.2.1. Tunika Vajinalis Testis	6
2.2.2. Dessensus Testis	7
2.2.3. Tunika Albuginea	7
2.2.4. Tunika Vaskulosa	8
2.2.5. Testisin Damar ve Sinirleri	8
2.3. Testisin Histolojisi	8
2.3.1. Spermatogenezis	10
2.3.1.1. Spermatositogenezis	11
2.3.1.2. Spermiyogenezis	13
2.3.1.2.1. Akrozom Oluşması	14
2.3.1.2.2. Kuyruk Gelişmesi	14
2.3.1.2.3. Çekirdek Şekil ve Büyüklüğünün Değişmesi ile Birlikte Kromatin Yoğunlaşması	15
2.3.1.2.4. Artık Spermatid Sitoplazmasının Atılması	15

2.3.1.3. Spermiyumun Ultrastrüktürel Yapısı 16
2.4. Semen Analizi 24
2.4.1. İnsan Semenin Genel Yapısı ve Semen Örneğinin Alınması 25
2.4.2. Semenin Makroskobik İncelemesi 26
2.4.3. Semenin Mikroskobik İncelenmesi 27
2.4.3.1. Sperm Motilitesi 27
2.4.3.2. Sperm Konsantrasyonunun Hesaplanması 28
2.4.3.3. Ölü-Canlı Tayini (Eozin Y) 28
2.4.4. Morfolojik İnceleme 29
2.4.4.1. Spermac Boyama 29
2.4.5. Sperm Fonksiyon Testleri 30
2.4.5.1. Hipoosmotik Şişme (HOS) Testi 31
2.4.5.2. HOS Solüsyonu 31
2.4.5.3. Testin Uygulanışı 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 33
3.1. Araştırma Grubu Bireyleri 33
3.1.1. İnfertil Vakaların Çalışmaya Alınma Kriterleri 33
3.1.2. Fertil Vakaların Çalışmaya Alınma Kriterleri 33
3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 34
3.3. Solüsyonların Hazırlanması 34
3.3.1. Hipoozmotik Şişme (HOS) Solüsyonunun Hazırlanması 34
3.3.2. Eozin Y Boyasının Hazırlanması 34
3.3.3. Anti-HOST Medyumunun Hazırlanması 34
3.4. Morfolojik Değerlendirme 34
3.4.1. Işık Mikroskobu için Spermac Boyama Metodu 34
3.5. Eozin Y Boyama 35
3.6. Faz Kontrast Mikroskobu için Preparat Hazırlanması (HOST) 35
3.7. Anti-HOST Uygulaması 36
3.8. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) için Takip ve Grid Hazırlanması 36
3.9. İstatistiksel Analiz 38
4. BULGULAR 39

4.1. Işık Mikroskobu Bulguları 39
4.1.1. Eozin Y Bulguları 39
4.1.2. HOST Bulguları 41
4.1.3. Anti-HOST Bulguları 44
4.1.3. Sperm Morfolojisi Değerlendirilmesi 45
4.2. Transmission Elektron Mikroskopik (TEM) Bulgular 48
4.2.1. Fertil Grubu TEM Bulguları 48
4.2.1.a. Normospermi Sham Grubu TEM Bulguları 48
4.2.1.b. Normospermi HOST Grubu TEM Bulguları 50
4.2.1.c. Normospermi Anti-HOST Grubu TEM Bulguları 52
4.2.2. İnfertil Grubu TEM Bulguları 54
4.2.2.1.a. Oligoastonospermi Sham Grubu TEM Bulguları 54
4.2.2.1.b. Oligoastenospermi HOST Grubu TEM Bulguları 57
4.2.2.1.c. Oligoastenospermi Anti-HOST Grubu TEM Bulguları 59
4.2.2.2.a. Astenospermi Sham Grubu TEM Bulguları 61
4.2.2.2.b. Astenospermi HOST Grubu TEM Bulguları 63
4.2.2.2.c. Astenospermi Anti-HOST Grubu TEM Bulguları 65
5. TARTIŞMA **71**
6. SONUÇ VE ÖNERİLER **76**
KAYNAKLAR **77**
EKLER **83**
EK-1 BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU 84
EK-2 HASTA DEĞERLENDİRME FORMU 85
EK-3 HASTA DEĞERLENDİRME FORMU 86
ÖZGEÇMİŞ **87**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Erkek genital sistem organları ve testisin şematik yapısı (25). **6**

Şekil 2: Seminifer tubüllerin histolojik yapısı (20,28). **9**

Şekil 3: Testiste spermatogenik hücrelerin görünümü (28). **10**

Şekil 4: Spermiyogenezin evreleri ve olgun spermatozoon yapısı (34). **16**

Şekil 5: Spermatozoonun morfolojik yapısı (37). **20**

Şekil 6: HOS testi sonucu değişik şekiller almış sperm kuyruk örnekleri görülmektedir. (a) normal, (b-g) değişik şekillerdeki kıvrılma tipleri (9). **31**

Şekil 7: Fertil gruba ait spermiyumlar. ✱: ölü spermiyumlar ✚; canlı spermiyumlar (Eozin Y boyama, X200). **39**

Şekil 8: Fertil gruba ait spermiyumlar. ✱: ölü spermiyumlar ✚; canlı spermiyumlar (Eozin Y boyama, X200). **40**

Şekil 9: Hipoozmotik şişme gösteren ve kuyrukları kıvrılan canlı spermler ile şişme göstermeyen ve kuyrukları kıvrılmayan cansız spermlerin faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri. → :Kıvrılmış kuyruk, ✱: kıvrılmamış kuyruk (X400). **41**

Şekil 10: Hipoozmotik şişme gösteren ve kuyrukları kıvrılan canlı spermlerin faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri. → : Kıvrılmış kuyruk (X400). **42**

Şekil 11: Hipoozmotik şişme gösteren ve kuyrukları kıvrılan canlı spermler ile şişme göstermeyen ve kuyrukları kıvrılmayan cansız spermlerin faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri. → :Kıvrılmış kuyruk, ✱: kıvrılmamış kuyruk (X400). **43**

Şekil 12: Hipoozmotik şişme gösteren ve kuyrukları kıvrılan canlı spermlerin faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri. → :Kıvrılmış kuyruk (X400). **44**

Şekil 13 a-f: Fertil gruba ait spermiyum görüntüleri. ✱:Normal spermiyum ←: Spermiyum başı, ➘: Boyun, ↓ : Kuyruk (Spermac boyama, X1000). **45**

Şekil 14 a-d: İnfertil grubuna ait anormal spermiyumlar. **a:** Kalın boyun, **b:** Baş ve boyun anomalisi, **c:** Elonge baş, **d:** Mikst anomali (Spermac boyama, X1000). **46**

Şekil 15 a-d: İnfertil grubuna ait anormal spermiyumlar. **a:** Büyükbaş anomalisi, **b:** Uzamış baş anomalisi **c:** Bend anomalisi **d:** boyunda sitoplazmik droplet (Spermac boyama, X1000). **47**

Şekil 16: Normospermi sham grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, **⇈:** akrozom, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **48**

Şekil 17: Normospermi sham grubu. **Ç:** enine geçmiş kesitte spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **S:** sitoplazma, **M:** mitokondriyon, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **49**

Şekil 18: Normospermi HOST grubu. **Ç:** çekirdekte dejeneratif vakouler yapılar, ➔**:** akrozomal bleb **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, **V:** lameller formda residuel cisimcik, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **50**

Şekil 19: Normospermi HOST grubu. **Ç:** enine geçmiş kesitte spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **S:** sitoplazma, ➧**:** sitoplazmik artıklar, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **51**

Şekil 20: Normospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **52**

Şekil 21: Normospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, ➔: çekirdekte vakuoler dejenerasyon, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **53**

Şekil 22: Oligoastenospermi sham grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, ⇈**:** akrozom, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **54**

Şekil 23: Oligoastenospermi sham grubunda boyun anomalisi gözlenen bir spermiyum. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, ⇈**:** akrozom, **+:** sitoplazmik artık içeren boyun bölgesi, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **55**

Şekil 24: Oligoastenospermi sham grubunda gözlenen bir spermiyum. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, **⇈:** hücre zarı, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **56**

Şekil 25: Oligoastenospermi HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **V:** vakuolar oluşum, **♦:** şişmiş boyun bölgesi, ✱: oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **57**

Şekil 26: Oligoastenospermi HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait enine ve boyuna kesitlerde heterokromatik çekirdek, **⇈:** sperm plazma membranı ve akrozom, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **58**

Şekil 27: Oligoastenospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma heterokromatik çekirdek ve vakuol, **⇈:** akrozom, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **59**

Şekil 28: Oligoastenospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **60**

Şekil 29: Astenospermi sham grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, ⇈: sperm plazma membranı ve akrozom, **M:** mitokondriyal kılıf, +: boyun anomalisi gösteren spermiyum, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları, **Kb:** küçük başlı spermiyum (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **61**

Şekil 30: Astenospermi sham grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇈:** akrozom, **M:** anormal mitokondriyal kılıf, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları, **Sp:** spermatid (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **62**

Şekil 31: Astenospermi HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇈:** akrozom, **♦:** şişmiş boyun bölgesi, ✱: oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **63**

Şekil 32: Astenospermi HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇈:** sperm plazma membranı, ✱: enine ve oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları, (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **64**

Şekil 33: Astenospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇈:** sperm plazma membranı ve akrozom, **M:** mitokondriyon, **♦:** boyun bölgesinde dejeneratif değeişiklikler, ✱: enine ve oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları, (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **66**

Şekil 34: Astenospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **Bb:** büyük başlı spermiyum, **⇈:** sperm plazma membranı, **M:** mitokondriyal kılıf, ✱: enine ve oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları, (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **67**

Şekil 35: Astenospermi Anti-HOST grubu. **Ç**: spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇈:** belirgin sperm plazma membranı, **♦:** boyun bölgesinde dejeneratif değeişiklikler, ✱: enine ve oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları, (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000). **68**

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Spermatogenezis sürecinde meydana gelen olaylar. **13**

Tablo 2: Semen Sınıflaması Terminolojisi (56). **24**

Tablo 3: WHO kriterlerine göre semen parametreleri referans değerleri (4). **26**

Tablo 4: Alınan semen örnekleri tablodaki sıraya göre işleme tabi tutuldu. **37**

Tablo 5: Gruplar arası ilişkiler. **69**

Tablo 6: Tanımlayıcı istatistikler. Fertil ve infertil bireylere ait Pearson Korelasyon Analizi **69**

Tablo 7: Grup arasındaki korelasyonlar (Pearson Korelasyon Analizi). **70**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

WHO: World Health Organization / Dünya Sağlık Örgütü

HOST: Hypoosmotic Swelling Test / Hipoosmotik şişme testi

ART: Assisted Reproductive Techniques / Yardımcı Üreme Teknikleri

YÜT: Yardımla Üreme Teknikleri

IU: İnternational unit / Uluslararası birim

IVF: İn Vitro Fertilization

SDI: Sperm deformity index / Sperm bozukluk indeksi

SPA: Sperm penetration assay / Sperm penetrasyon testi

WBC: White blood cell / Beyaz küre

ICSI: İntracytoplasmic sperm injection / İntrasitoplazmik sperm enjeksiyon

PGH: Primordiyal germ hücresi

S: Sperm

Sz: Spermatozoa

Sp: Spermatid

Sg: Spermatogonia

ST: Seminifer tübül

GE: Germinal epitelyum

GnRH: Gonadotropin salgılayıcı hormonun

FSH: Follikül Stimülan Hormon

LH: Luteinizan Hormon

TDF: Testis Determining Factor / Testis belirleyici faktör

SRY: Sex Determining Region of Y / Y kromozomu cinsiyet belirleyici faktör

ABP: Androjen bağlayıcı hormon

SER: Granülsüz endoplazmik retikulum

GER: Granüllü endoplazmik retikulum

TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu

IM: Işık Mikroskobu

nm: Nanometre

mOsm/kg: Miliosmol/ kilogram

µm: Mikrometre

µL: Mikrolitre

^{o}C: Santigrad derece

dk: Dakika

sn: Saniye

X± Sd: Ortalama ± Ortalamanın Standart Hatası

ÖZET

Anti-HOST uygulaması sonucu sperm membran fonksiyonel bütünlüğünün ışık ve elektron mikroskop düzeyde incelenmesi

Bu çalışmada, fertil ve infertil hastalardan elde edilen semen örneklerine HOST ve Anti HOST uygulanarak sperm membran bütünlüğünde meydana gelen değişikliklerin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

İnfertilite, korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen en az bir yıl süre ile çocuk sahibi olunamaması olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde her on çiftten biri infertilite problemi ile karşılaşmaktadır. Erkek infertilitesinin yaygın nedenleri; düşük spermiyum sayısı, spermiyum hareket bozukluğu, morfolojik bozukluklar, spermiyum üretiminde azalma ya da hiç olmaması ve erkek genital boşaltım yollarının tıkanıklığı olarak sayılabilir. Günümüzde erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde birçok yeni yöntemler geliştirilmiştir. ICSI' da daha iyi spermiyum seçmek amacıyla sperm fonksiyon testlerinden, in vivo fertilite düzeyi ile daha yakın bir korelasyona sahip olan "hipoozmotik şişme testi" (HOST) yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, 10 fertil ve 29 infertil erkekten alınan semen örneklerine, standart semen analizi uygulandı. İnfertil grup kendi içerisinde konsantrasyon, motilite ve morfolojik bütünlüğe göre üç alt gruba ayrıldı. İki adet hazırlanan, 1ml HOST solüsyonu içerisine, 100 µL semen örneği eklendi. İnkübatörde 37 ˚C'de, 30 dk süre ile bekletildi. Birinci örnek HOST grubu olarak değerlendirildi. İkinci örnek ise HOST sonrası santrijüj edilerek izotonik ortama alındı. İzotonik ortamda 37 ˚C'de ve 30 dk süre ile inkübe edilip, Anti-HOST grubu olarak değerlendirildi. Her iki gruba ait spermiyum örnekleri Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile incelendi. İstatistiksel analiz için ise fertil ve infertil grubuna ait bulgular, Student's t testi ve ANOVA kullanılarak değerlendirildi.

Sonuç olarak, HOST uygulamasının sperm ultrastrüktüründe dejeneratif sayılabilecek değişikliklere neden olmadığı bilakis Anti-HOST uygulamasının ise sadece astenospermik vakalarda dejeneratif değişikliklere neden olduğunu gözledik.

Anahtar Sözcükler: İnfertilite, Sperm membran fonksiyonel bütünlüğü, HOST, Anti-HOST, Semen analizi.

ABSTRACT

A Light and Electron Microscopic Investigation on Functional Sperm Membrane Integrity After Consequence of Anti-HOST Technic.

In this study, it was aimed to investigate the changes on the sperm membrane integrity by light and electron microscop via practicing HOST and Anti-HOST Technic on the semen samples which obtained from the fertil and infertil patients.

The descriptive of the infertility is couldn't be able to become pregnant after at least 1 year of regularly unprotected sex. At the present time, each one person of ten experiences the infertility problem. The general causes of the male infertiliy consider as; low sperm count, failure of the sperm motility, morphological defects, either reduction of the sperm production or none and the obstruction of the male genital excretion ducts. Plenty of the new techniques have been improved in the assessment of the male infertility nowadays. In Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) the aim of to select the better sperm in all of the functional sperm tests, the "Hypoosmotic Swelling Test" (HOST) is used widely in close correlations with in vivo fertility level.

In this study, standart semen analysis was performed on the semen samples which were obtained from 10 fertil and 29 infertil men. The infertil group were divided into three subgroups due to their concentration, motility and morphological integrity.

100 µL semen sample was added into 1ml HOST solution of which was two number prepared. These were waited in incubator for about 30 minutes in 37 ^{o}C. The first sample was evaluated as HOST group. The second sample was centrifuged and taked into isotonic medium after HOST technic. It was evaluated as Anti-HOST group when incubated in the isotonic medium in 37°C for about 30 minutes. The sperm samples of each group were examined under Transmission Electronmicroscope (TEM). The findings of fertil and infertil groups were estimated by using Student's t test and ANOVA for the statistical analysis.

In conclusion we observed that the HOST technic didn't cause any degenerative changes on the sperm ultrastructure contrariwise Anti-HOST technic caused degenerative changes only in the astenospermic cases.

Keywords: İnfertility, Functional Sperm Membrane İntegrity, HOST, Anti-HOST, Semen Analysis.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen en az bir yıl süre ile çocuk sahibi olunamaması olarak tanımlanmaktadır. Daha önce hiç gebelik oluşmamışsa primer infertilite, canlı doğumla sonuçlansın veya sonuçlanmasın en az bir gebelik olmuşsa sekonder infertilite olarak sınıflandırılmaktadır (1).

İnfertilitenin sıklığı ve nedenleri toplumlara göre değişmektedir. Günümüzde çeşitli faktörlere bağlı olarak (stres, alkol, sigara, madde bağımlılığı, enfeksiyonlar vb.) infertilite sıklığının arttığını gösteren çalışmalar vardır. Bununla birlikte sperm üretiminde ve fonksiyonlarındaki anomaliler, tek başına veya diğer faktörlerle birlikte toplumdaki infertilite nedenlerinin % 35-50' sini oluşturmaktadır. Uzun yıllardır birçok infertilite tanı ve tedavi yöntemi kadın faktörü üzerine yoğunlaşmış ve erkek faktörü yönünden yaklaşımlar ihmal edilmiştir (2). Oysa erkeğe bağlı infertilitenin araştırılması nispeten daha kolay olup genel olarak anamnez, fizik muayene ve semen analizine dayanmaktadır (3).

Spermatozoon, ilk olarak 17. yüzyılda Leeuwenhoek tarafından keşfedildi. 1902' de Edward Martin tarafından semen analizinin rutin olarak yapılması önerildi. 1928 yılına kadar ejekulattaki spermiyum miktarının önemi bilinmemekteydi ve 1928 yılından sonra sperm testlerinin ve parametrelerinin araştırılması ve geliştirilmesi ile birlikte bu konuda ilk adımlar atıldı. 1942' de Mc Leod, 1953' de Gold, 1971' de Eliasson ve 1976' da Hellinga semen analizinin alt yapısını oluşturdular. İnsan semen örneklerinin inceleme ve araştırmalarının hızlı ilerlemesi ile bu konuda bir standartizasyon yapılmasına gereksinim duyuldu. İlk kez 1980 yılında semen örneklerinin değerlendirilmesi ile ilgili olarak Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) "İnsan Semeni ve İnsan Semeni Servikal Mukus Etkileşimlerinin İncelenmesi İçin Laboratuar El Kitabı" nı yayınladı. Bunu 1987, 1992 ve 1999 yıllarındaki ikinci, üçüncü ve dördüncü baskıları takip etti (4). Daha sonra Kruger ve ark., spermiyum morfolojisinin fertilitedeki prognostik değeri üzerine ilk yorumları yaptılar (5). Menkveld ve ark. ise spermiyumun Strict Morfoloji kriterlerini yayınladılar (6).

Günümüzde erkek infertilitesi tanısında kullanılan; detaylı analizler, sperm boyama teknikleri, sperm fonksiyon testleri ve genetik analizler, infertilitedeki erkek faktörünün önemini büyük ölçüde ortaya koymuştur (2). Birçok araştırmacı

tarafından, uzun yıllar boyunca ejekülattaki spermiyumların sayısı ve kalitatif olarak değerlendirilmesi semen analizinde ana parametre olarak kabul edilmiştir. Günümüzde WHO ’nun belirlediği kriterler göz önüne alınarak spermiyum skorlaması yapılmaktadır. Ejekülattaki spermiyum sayısının <20 milyon/ml olması "oligospermi" olarak tanımlanmıştır. Erkek infertilitesi ile ilişkili olan diğer parametreler ise spermiyum motilite bozuklukları (astenospermi), anormal morfoloji (teratospermi), ölü-canlı oranı ve aşırı lökosit artışı (lökositospermi) şeklinde sıralanmaktadır (3-4).

Ancak, bu konuda son yıllarda yapılan çalışmalar, spermiyumun fertilite potansiyelinin belirlenmesinde yukarıda belirtilen rutin analizlerin tek başına yeterli olmadığını, fertilite potansiyelinin belirlenmesinde yeni yöntemlerin geliştirildiğini bildirmektedir (7-8).

Çalışmalar, sperm fonksiyon testi olan "Hipoozmotik Şişme Test" i (HOST) ile spermiyum motilitesi ve fertilite oranları arasında bir korelasyon olduğunu bildirmektedir (9-12). Bu basit test sağlam hücre zarının yarı geçirgenliği esasına dayanmaktadır (9,13). İlk olarak HOST, geleneksel spermatolojik parametrelere alternatif bir yöntem olması düşüncesiyle Jeyendran ve ark. tarafından 1984 yılında geliştirilmiştir. Jeyendran ve ark. tarafından ortaya konulan HOST’ un, klinikte ek bir vitalite testi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Geleneksel spermatolojik parametrelerden daha güvenilir olduğundan, hem alternatif bir spermatolojik parametre olarak kabul edilmiş, hem de infertilitenin belirlenmesinde yardımcı bir metot olarak kullanılması önerilmiştir (9).

Erkek infertilitesi tanısında, günümüzde birçok parametre kullanılmaktadır. Bu parametrelerden ancak az sayıdaki test, spermiyum membran fonksiyonel bütünlüğünü belirleyebilmektedir. Oysa spermiyum membran bütünlüğünün önemi sadece spermiyum metabolizması için önemli olmayıp, aynı zamanda membrandaki değişimler; dişi ve erkek eşey hücrelerinin birleşmesi, spermiyumların kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyonun gerçekleşmesinde büyük öneme sahiptir (9).

Check ve ark., fonksiyonel bütünlüğe sahip spermiyum membranının; akrozom reaksiyonu, kapasitasyon, metabolizma ve spermiyumların ovum yüzeyine bağlanma yeteneğinde önemli roller üstlendiği bilinmesine rağmen, bu özelliğin

standart spermiyogram (motilite, morfoloji, konsantrasyon ve ölü-canlı oranı) ile ölçülemediğini belirtmişlerdir (15-16). Cincik ve ark., HOST/ Eozin Y testi kombinasyonu sonucunda sperm motilitesi ile morfolojik parametreleri arasında yüksek korelasyon tespit etmişlerdir (17). Spermiyum membran aktivitesi, fertilizasyon için temel öneme sahiptir ve bu aktivitenin ölçülmesinin, spermiyum fertilizasyon kapasitesinin belirlenmesinde kullanılabileceği bildirilmektedir (9).

Çalışmamızda, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Diyarbakır Devlet Hastanesi androloji laboratuarına başvuran gönüllü fertil ve infertil erkek hastalardan elde edilen semen örnekleri kullanılmıştır.

Bu çalışmada, fertil ve infertil hastalardan elde edilen semen örneklerine HOST ve Anti-HOST uygulanarak sperm membran bütünlüğünde meydana gelen değişikliklerin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kliniklere infertilite problemi ile başvuran çiftlerin % 40' ında erkeğe bağlı faktörün olması erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasını bir ön koşul olarak beraberinde getirmektedir (18). Reprodüktif yaştaki erkeklerin % 6' sında infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bu olguların yaklaşık % 90' ında da bozulmuş spermatogenez vardır.

Son zamanlarda, özellikle son 30-50 yıllık dönemde, genel erkek popülasyonunda normal erkeklerden alınan ejakulatın kalitesi ve sperm konsantrasyonunda ilerleyici bir azalma, erkek infertilitesi insidansında artma ve testikuler kanserlerde daha yüksek bir prevalans gözlendiği belirtilmektedir. Ayrıca, azalmış sperm konsantrasyonu ile malign hastalıklar arasındaki ilişki, infertilitenin ileride gelişebilecek lenfoma, testikuler tümör ve bazı endokrin kanserlerin habercisi olabileceği yönünde olduğu düşünülmektedir (19).

Erkek genital sistemi iki gonaddan (testisler), genital boşaltım yolları ile bu yollara açılan aksesuar bezler ve penisten oluşur (20). Genital boşaltım yolları, tubüli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejekulatoryus ve hem genital hem de idrar boşaltım yolu olarak kullanılan üretradan oluşur. Bu yollara salgısını döken aksesuar bezler; vesikula seminalis, prostat ve glandula bulboürethralis' tir (21).

2.1. Primordiyal Germ Hücrelerinin Gelişimi

İnsanlarda primordiyal germ hücreleri (PGHs), ilk olarak gebeliğin ikinci haftasında epiblast kökenli ve kemik morfogenetik proteini–4 (BMP-4) eksprese etmesiyle gözlenir. Transforme edici büyüme faktörünün β (-TGF) bir üyesi olan BMP, erken embriyonik gelişim sürecinde gelişim, homeostazın sürdürülmesinde, birçok hücre ve doku fonksiyonlarında kilit düzenleyici olarak rol oynar. Bu büyüme faktörleri ekstrasellüler matrikste yer alır ve sinyal oluşturmaları matriks proteinlerine bağlanmaları ile kontrol edilir. Bir triozin kinaz olan c-kit reseptörünün ona uyan hücre membran ligandı (hücre membranındaki reseptöre bağlanan madde) kök hücre faktörü ile etkileşime bağımlıdır. Hem c-kit reseptörü hem de kök hücre faktörü, göç rotası boyunca primordiyal germ hücreleri tarafından üretilir (22). Üçüncü haftada epiblast kökenli bazı hücreler vitellüs kesesine göç eder. Vitellüs kesesinin endoderminde gözlenen bu hücrelere primordiyal germ hücresi (PGH) adı

verilir. Dördüncü ve altıncı haftalar arasında yaklaşık olarak 10-100 primordiyal germ hücresi vitellüs kesesinden ameboid hareketlerle dorsal mezenter boyunca ilerler. Bu hareket rotası boyunca göç eden ve mitozla çoğalan primordiyal germ hücrelerinin plazma membranı alkalen fosfataz enziminden zengin olduğu için bu dönemde sitokimya aracılığı ile izlenebilir. Beşinci haftanın sonu ve altıncı haftanın başlarında primordiyal germ hücreleri ilkel gonadlara ulaşır. Göç sırasında başlayan mitoz bölünme gonada ulaştıktan sonra da devam eder (23).

2.2. Testis Anatomisi

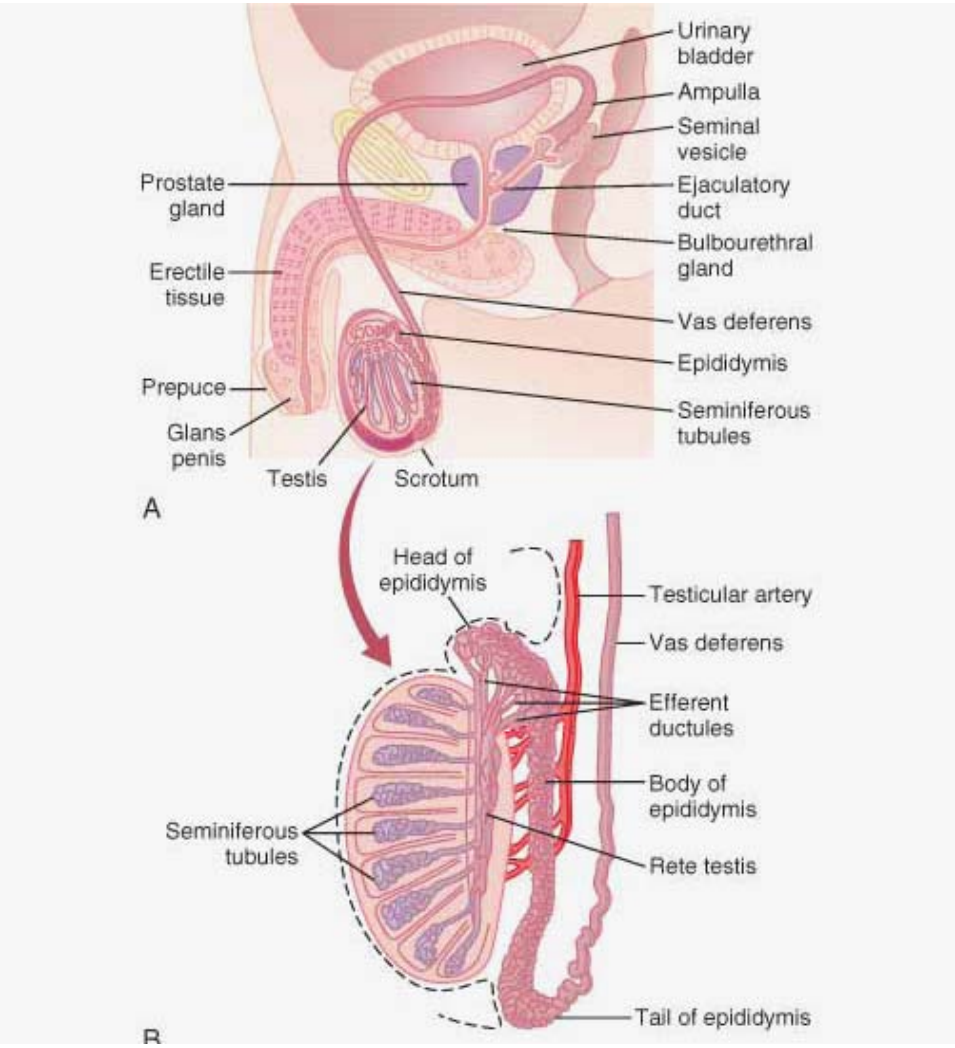
Testisler, erkekte üreme organı olup bir çifttir. Ekzokrin olarak spermatozoon' ların (erkek eşey hücreleri) üretimi ve endokrin olarak ta testesteronun üretiminden sorumlu bir çift bileşik tubüler, karma bir bezdir. Sağ ve sol testis skrotum içinde funikulus spermatikus ile asılıdır. Birbirlerinden septum skroti ile ayrılırlar. Sol testis sağa göre 1 santimetre (cm) kadar daha aşağıda yer alır. Bunun nedeni kan stazına bağlı olarak sol testisin daha ağır olmasıdır. Testisler yaklaşık ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığında olup, ortalama 10-14 gram (gr) ağırlığındadır. Yanlardan basık iri badem şeklindedir. Funikulus spermatikus testisin arka kenarına tutunurken, epididimis testisin arka kenarının dış kısmı boyunca uzanarak posterolateral bir yerleşim gösterir (Şekil 1) (21).

Skrotum içinde yer alan testis, dıştan içe doğru aşağıdaki tabakalar ile örtülüdür;

1. Deri
2. Tunika dartos
3. Fassia spermatika eksterna
4. Fassia kremasterika ve m. kremaster
5. Fassia spermatika interna
6. Tunika vajinalis testis
   a) Lamina parietalis (Periorchium)
   b) Lamina viseralis (Epiorchium)
7. Tunika albuginea
8. Tunika vaskulosa

Testis lamina viseralis, tunika albuginea (düzenli sıkı bağ doku) ve tunika vaskulosa olmak üzere üç tabaka ile sarılıdır. Son üç tabakaya kapsüla testikularis adı

verilir. Kapsülün kontraktil oluşu testis kanal sistemini pompaladığı gibi spermatozoonların iletilmesini kolaylaştırır (21).



Şekil 10: Erkek genital sistem organları ve testisin şematik yapısı (25).

2.2.1. Tunika Vajinalis Testis

Fassia spermatika interna' nın iç, testisin dış yüzünü saran peritonunun bir uzantısı olan prosesus vajinalis' in alt ucudur. Embriyolojik dönemde karın boşluğunu döşeyen pariteal periton skrotum' a doğru bir cep şeklinde çıkıntı yapar. Bu çıkıntıya prosesus vajinalis denir ve testisin skrotuma inişinde öncülük eder. Prosesus vajinalis; testisi örten lamina viseralis ve fassia spermatika interna' ya gevşek olarak bağlanan lamina parietalis' ten oluşur. Bu iki tabakaya tunika vajinalis testis adı verilir. Prosesus vajinalis' in üst ucundan anulus inguinalis profundus' a kadar olan bölüm kapanarak bir kordon şeklini alarak kavitas peritonealis ile olan

ilişki ortadan kaldırılmış olur. Eğer kapanmaz ise indirekt inguinal fıtıklara zemin hazırlar (21).

2.2.2. Desensus Testis

Testis taslağı intrauterin dönemde 3-5. lumbal seviyede böbreğin altında ve peritonun arkasında yer alır. Testisin karın boşluğundan normal yerlerine inmelerine descensus testis denir. Testis taslağının alt ucuna bağlı olan ve retroperitoneal olarak bulunan gubernakulum testis denilen bant dış genital çıkıntı ile birleşir. Bu bant testisin inişi sırasında kılavuzluk görevi yapar. Bu iniş sırasında testis peritona ait oluşum olan prosesus vajinalis' in arkasında yer alır. Testislerde iniş 4. ayda başlar. 7. ayda prosesus vajinalis ile birlikte anulus inguinalis profundus hizasındadır. Doğuma yakın testisler skrotuma inmiş olurlar. Bu iniş sırasında karın ön duvarının bütün tabakalarını etraflarında sürükleyerek inguinal kanaldan da geçerek skrotuma gelirler. Böylece karın ön duvarında tabakalar ve periton tarafından testisin örtüleri meydana gelmiş olur. Prosesus vajinalis' in inguinal kanalda funikulus spermatikus' u saran parçası normalde kapanır. Kapanmadığı durumlarda indirekt inguinal fıtığa ortam hazırlar. Testislerin inişini uyaranın testesteron hormonun olduğu kanıtlanmıştır.

Testislerin normal inişini tamamlayamaması yaygın bir anomalidir. Bu duruma maldesensus testis (Kriptoorşizm) denir. Prematüre bebeklerin % 30' unda, fullterm' lerin % 3' ünde rastlanır. İnmemiş testisler genellikle inguinal kanal boyunca lokalize olmuşlardır. Çoğu inmemiş testisler doğumdan ilk birkaç hafta içinde inerler (21).

2.2.3. Tunika Albuginea

Testisleri saran kalın fibröz tabakadır. Mavimsi beyaz renkte olan bu tabaka çok miktarda kollagen liflerden meydana geldiği için kapsülün elastikiyet ve genişleme olanağı azdır. Bu tabaka testisin arka kenarından içeri girerek tam olmayan vertikal bir bölme olan mediastinum testisi (corpus higmori) meydana getirir. Bezin üst ucundan alt ucuna doğru uzanan mediastinum testisten öne ve yanlara doğru testis yüzeyine tam olmayan bölmeler gönderir. Böylece testis bu bölmeler ile koni biçimindeki lobuli testis denilen lobçuklara bölünür. Lobulusların tabanı testisin yüzeyine, apeksleri mediastinum' a doğru uzanırlar. Mediastinum testis, testise giren ve çıkan damarlar ile testis kanallarını içerir (21).

2.2.4. Tunika Vaskuloza

Septula testisleri örterek bütün lobcukları saran damar ağından yapılmış tabakadır.

2.2.5. Testisin Damar ve Sinirleri

Arterleri: Aorta abdominalis' in bir dalı olan a. testikularis' ten gelir. Arter testisin margo posterior' undan testis' e girerek septulaların etrafını sararak testis dokusunu besler.

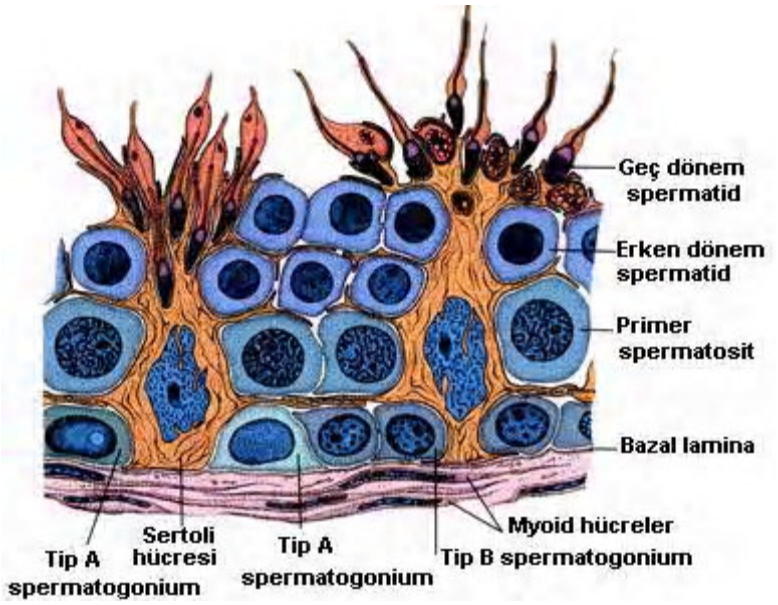
Venleri: Duktus deferens' in çevresinde plexus pampiniformis denilen venöz ağı meydana getirirler. Venöz ağdan sonunda v. testikularis' ler şekillenir. V. testikularis dekstra v. kava inferior' a, v. testikularis sinistra v. renalis sinistra' ya dökülürler. Venöz ağı meydana getiren venlerde meydana gelen genişleme ile Varikosel denilen durum ortaya çıkar. Sol tarafta daha fazla görülür. İki nedeni vardır. Birincisi sol v. testikularis' in dik bir açı ile sol v. renalis' e dökülmesi, ikincisi ise sol v. testikularis kolon desendens' in arkasında yer alarak özellikle konstipasyon durumlarında muhtevanın vene basınç yapmasıdır.

Sinirleri: 9-12. torakal segmentlerinden çıkar. Pleksus aortikus ve pleksus renalis' in sempatik lifleri tarafından innerve edilir. Bu pleksus' lardan çıkan lifler a. testikularis çevresinde pleksus testikularis' i oluştururlar (21).

2.3. Testis Histolojisi

Testiste bulunan lobulusların parankim dokusunu, üreme hücrelerini yapan tubüli seminiferi kontorti denilen kıvrımlı olan testis kanalcıkları kör bir uçla başlar. Septula testislerden ayrılan bağdokusu uzantıları lobulusların içersine girerek bu kanalların etrafını sarar. Bu bağdokusu içersinde interstisiyel hücreler (ara hücreler) bulunur. Bir testiste yaklaşık 250 lobulus ve her bir lobulusta da 1-4 seminifer tubül bulunur (20), bir testiste yaklaşık 250-1000 kadar seminifer tubül olduğu belirtilmektedir (26). Seminifer tubüllerin uzunluğu yaklaşık 50 cm (30-80 cm), çapları ise 150-250 μm kadardır. Etrafı zengin kapillerle çevrilidir. Kıvrımlı olan bu kanallar lobulus' un tepesine doğru yaklaştıkça kıvrımları azalır ve birleşerek mediastinum testis yakınında bir testiste sayıları 20-30 kadar olan tubüli seminiferi rekti' leri meydana getirirler. Tubüli seminiferi rekti mediastinum testis' te birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis denilen ağı meydana getirirler. Rete testis'i oluşturan kanalcıklar medistinum testis' in üst ucunda sayıları 12-20 adet olan

duktuli efferentes testis denilen kanal olarak devam ederler. Duktuli efferentes testis tunika albuginea' yı delerek epididimis' e geçerler. Daha sonra spermatik kanallar sırasıyla duktus epididimis, duktus deferens ve duktus ejekulatoryus olarak devam eder (20).

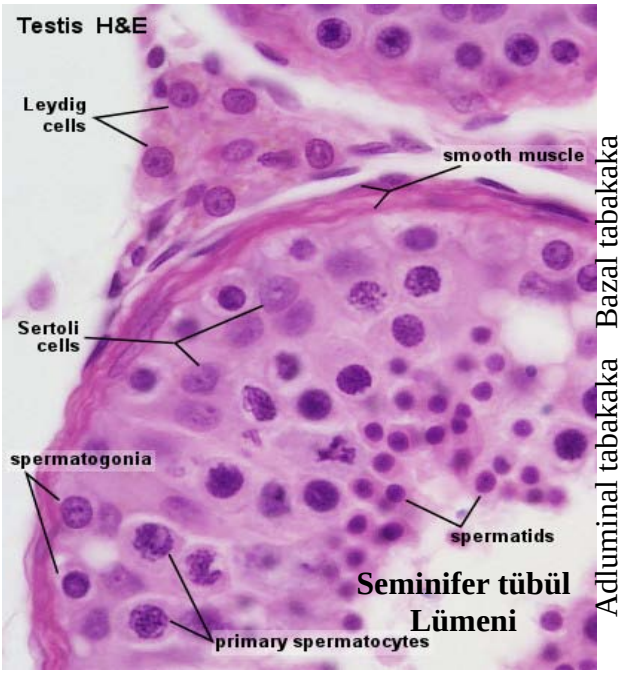


Şekil 11: Seminifer tubüllerin histolojik yapısı (20,28).

Testis histolojik yönden;

1- İnterstisyum
2- Seminifer tubüller olmak üzere iki bölümde incelenir.

İnterstisyumda; Leydig hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, kan damarları, sinirler ve lenfatikler bulunur. Leydig hücrelerinden testesteronla birlikte ve östrojen gibi etkili olan östradiyol salgılanır. Ayrıca parakrin olarak oksitosin, substans-P, b-endorfin vb. salgılarlar. Leydig hücreleri interstisiyel hücreleri stimüle eden hormon (ICSH) ve hipofiz ön lobu hormonu olan Follikül stimülan hormon (FSH) tarafından denetlenir. İki çekirdekli olabilirler. İyi gelişmiş Golgi kompleksi, tübüler tip kristalı mitokondriyonlar ve asidofil sitoplazmalarında yağ damlacıkları içerirler. Çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikuluma (SER) sahiptirler. Bu hücrelerde salgı granülü bulunmaz, üretilen testosteron ihtiyaca göre sentezlenir ve bekletilmeden kana verilir (20). Kriptorşizmde testisler skrotumda olmadığından ve dolayısıyla daha sıcak bir ortamda olduğundan spermatogenezis meydana gelemez. Ancak Leydig hücreleri ortamdan etkilenmediğinden hormonal düzen normaldir.



Şekil 12: Testiste spermatogenik hücrelerin görünümü (28).

Seminifer tubül lümeni; sustentakuler (Sertoli) ve spermatogenik seri hücreleri olmak üzere iki tip hücre içeren germinal epitel ile döşenmiştir. Spermatogenik seri hücreleri bazal lamina ile tubül lümeni arasında, farklılaşma sırasına göre 4-8 sıralı tabaka halinde dizilidirler. Bu hücre grupları olan spermatogonia ve primer spermatositler bazal bölümde, sekonder spermatositler spermatidler ve spermatozoonlar adluminal bölümde bulunurlar. Hücre bölünmesiyle oluşan hücre farklılaşma sürecine spermatogenez denir. Bazal membran üzerine oturan ve lümene doğru uzantıları bulunan Sertoli hücreleri testisin kan-testis bariyerinin oluşturulması ve spermiyohistogenezisi için gerekenleri temin eder. Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesini düzenler. Ayrıca bu hücreler hipofiz bezinden Folikül Stimülan Hormon (FSH)' nın salgılanmasını düzenleyen inhibin, sperm sıvısının genital kanallarda gidişine yardımcı olan androjen bağlayıcı hormon (ABP) salgılarlar (24).

2.3.1. Spermatogenezis

İnsan vücudundaki en karışık hücresel farklanma olaylarından biri olan spermatogenezis, farklanmamış ilkel erkek germ hücrelerinin yani spermatogonyumların, olgun spermiyumlara dönüşme sürecidir (20). Spermatogenezis iki evre halinde gözlenir: **spermatositogenezis** ve **spermiyogenezis.**

İnsanda bir spermatogoniyumdan olgun bir spermatozoon meydana gelmesine kadar geçen zaman yaklaşık 64-74 gündür ve birbirini izleyen 16±1 günlük dört siklusta gerçekleşir (20,29). Spermatogenezis, puberteden (testosteron etkisiyle) başlayıp ileri yaşlara kadar kesintisiz devam eder. 40 yaşından sonra spermatogenezis göstermeyen tubüllerin sayısı artmaya başlar. Böyle tubüllerde atrofi başlamıştır. Ancak işlev gören tubüller, spermatogenezisi devam ettirdiklerinden spermatogeziste tamamen kesilme olmaz, yalnızca azalma gözlenir. Buna bağlı olarak, erkekte cinsel hayatta bir yavaşlama gözlenir ki buna andropoz denir. Spermatogenezis, vücut ısısından düşük bir ortamda gerçekleşir. Bu nedenle insanlarda testisler, skrotum denilen vücut dışında ki keselerde bulunurlar (24).

2.3.1.1. Spermatositogenezis

Işık mikroskobunda spermatogonyumlar, nükleusları belirgin koyu görünen, yaklaşık 12 mikrometre (μm) çapında, seminifer tubül bazal membranı hemen üstünde yer alan küçük, diploid germ hücreleridir. Püberteden önce, seminifer tubüllerin epiteli, az sayıda ilkel germ hücresi (spermatogonia), buna karşın çok sayıda Sertoli hücresi içerir. Püberte ile birlikte, hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılayıcı hormonun (GnRH) etkisi ile hipofiz ön lobundan, gonadotropik hormonlar olan follikül stimülan hormon (FSH) ile Luteinizan hormon (LH) salgılamaya başlar. Bu hormonların stimulasyonu ile spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirerek tip A' ları oluştururlar. Tip A' lar ileri yaşlara kadar devam eden spermatogeneziste kaynak kök hücreler olarak işlev görürler. Tip A hücrelerinin bir kısmı ise mitoz bölünme geçirerek tip B' lere farklanırlar. Tip B' ler de mitoz bölünmeler ile primer spermatositleri meydana getirir.

İnsan spermatogoniumları rutin histolojik preparatlardaki görünümleri temel alınarak 3 tipe ayrılmıştır (20,30).

Koyu tip A spermatogonyumlar; Koyu bazofilik boyanan, oval heterokromatik nükleuslara sahip, küçük (12 μm çapında) hücrelerdir (20). Seminifer epitelin kök ya da rezerv hücreleri olarak değerlendirilirler (20,29,31). Bunlar hücre siklusuna girmezler. Düzensiz aralıklarla bölünerek, hem yeni koyu Tip A spermatogoniumları, hem de açık Tip A hücreleri meydana getirirler.

Açık tip A spermatogonyumlar; Ökromatik nükleuslarının soluk görüntülerinin dışında, koyu Tip A hücrelerle aynı özelliklere sahiptirler. Testosteron

etkisiyle mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve yeni açık Tip A hücreleri ve Tip B hücreleri meydana getirirler.

Tip B spermatogonyumlar; Oval yerine yuvarlak olan nükleuslar dışında açık Tip A spermatogoniumlara benzerler (20,31). Dinlenme evresindeki spermatositleri üreten farklılaşmamış hücrelerdir. Mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler (31).

Primer spermatositler, 46 kromozom sayısına (diploid) ve 2n DNA miktarına sahiptirler. Primer spermatositler oluştuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Yaklaşık 22 günlük sürede DNA' ları replike ederler. Böylece DNA miktarı iki katına çıkar, 4n olur. Yani 46 kromozomun her biri iki kromatidlidir. Ana ve babadan gelen bu çift yapılı kromozomlardan, benzer olanlar yan yana gelerek homolog kromozom çiftlerini oluştururlar. Kromozomlar sentromerleri bölgesi hariç her bölgede sıkıca birbirlerine değerler. X ve Y kromozomları homolog olmayıp ancak, kısa kollarının uçlarında homolog segmentlere sahiptirler. Sonra, homolog kromozom çiftleri arasında gen alışverişi (crossing over) olaylanır. Bu olay esnasında, çift yapılı homolog kromozomların uzunluğuna yarıklanıp, kromatinlerde enine kırılmalar oluşması ve kırılan parçaların çiftler arasında karşılıklı değişimiyle gerçekleşir. Daha sonra, homolog kromozomlar, birbirlerinden ayrılmaya başlarlar. Ancak, çiftler, bir süre daha kromatidler arası değişimin olduğu yörelerde, birbirleriyle bağlı kalmaya devam ederler. Homolog kromozomlar, bu süre içinde, kiazma denilen X biçimli bir görünüm alırlar. Kiazma aşamasında, homolog kromozomlar arasında karşılıklı gen bloklarının değişimi gerçekleşir. Bu arada, homolog çiftlerin birbirinden ayrılmaları devam eder. Sonunda homolog kromozomlar birbirlerinden ayrılırlar ve kromozom çiftinin iki üyesi, bölünme iğini oluşturacak biçimde ekvator bölgesinde dizilirler. Daha sonraki evrede, kromatidler karşı kutuplara göç ederler. Bu süre uzun olduğu için seminifer tübülün histolojik kesitlerinde daha fazla sayıda primer spermatosit gözlenir. Primer spermatositler büyük hücreler olup, nükleusları kangal şeklinde olduğundan daha kolay bir şekilde tanımlanırlar. Daha sonra primer spermatositler ikiye bölünerek sekonder spermatositleri oluştururlar. Böylece, birinci mayoz bölünme ile DNA miktarı 2n ve kromozom sayısı diploid olur. Sekonder spermatositler, hemen ikinci mayoz bölünmeye girerler bu bölünmede DNA

replikasyonu olmaz, 23 adet iki yapılı kromozomlar (çift kromatidli) sentromerleri yöresinden uzunluğuna ayrılırlar. Bölünme sonunda spermatid denilen 8 µm çapında 4 yavru hücre meydana gelir. Hücrelerden her biri 23 adet tek kromozom içerir. Bunların ikisi 22 + X diğer ikisi ise 22 + Y kromozom düzenine sahiptir. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir (24).

Tablo 8: Spermatogenezis sürecinde meydana gelen olaylar.

mitoz Spermatogonium tip A ⟶ Spermatogonium tip A ↓ mitoz (46 diploid, tek sarmal) Spermatogonium tip B ↓ Mitoz (46 diploid, tek sarmal) Primer Spermatosit (2n)	**Bazal Tabaka**	**Spermatositogenezis**	**Spermatogenezis**
↓ I. mayoz (46 diploid tek sarmal) Sekonder Spermatosit (n) ↓ II. mayoz (23 haploid, çift sarmal) Spermatid (n) ↓ Spermiyogenezis Spermiyum (=Spermatozoon) (23 haploid tek sarmal)	**Adluminal tabaka**	**Spermiyogenezis**	

2.3.1.2. Spermiyogenezis

Spermiyogenezis, bir farklanma olayı olup haploid spermatidlerin olgun spermiyuma (spermatozoon) dönüşme sürecidir (20). İnsanlarda bu evre 16-22 gün sürer. Bu dönüşme olayında, spermatidde meydana gelen belli başlı değişiklikler şunlardır: Akrozom oluşması, Kuyruk gelişmesi, Çekirdek şekil ve büyüklüğünün değişmesi ile birlikte kromatin yoğunlaşması ve artık spermatid sitoplazmasının atılması.

Genç spermatidler oval çekirdekli, yaklaşık 66 µm uzunluğunda yuvarlak veya poligonal hücrelerdir. Sitoplazmalarında, çekirdek bitişiğinde iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyonlar, bir çift sentroil ve düzensiz şekilli

bazofilik kromatid cisimi bulunur. Spermiyogenezis sırasında, bu organellerin her birinde göze çarpan değişiklikler gözlenir.

2.3.1.2.1. Akrozom Oluşması

Akrozomun gelişmesi dört ardışık evreden oluşur: Golgi evresi, kep/şapka evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi.

Spermiyogeneziste ilk değişiklik Golgi kompleksi bölgesinde, PAS pozitif proakrozom granülleri ile dikkati çeker (24). Proakrozom granülleri; granüllü endoplazmik retikulumda (GER) üretilen hidrolitik enzimlerin Golgi kompleksine geçmesi ve burada çeşitli değişiklikler geçirerek Golginin trans yüzünden salınmasıyla oluşur (20,24,32). Daha sonra bu granüller, büyük bir vezikül içinde toplanarak akrozom vezikülünü oluştururlar. Akrozom vezikülü spermatid çekirdeğinin ön kutbuna hareket eder ve çekirdek zarına yapışır. Akrozomun bu yapışma bölgesi, ileride spermatid çekirdeğinin uç kısmını oluşturur. Akrozomun vezikül zarı, çekirdek dış zarına yapıştığı yerde, çekirdeğin yarısını ya da 2/3' ünü saracak biçimde yayılır ve çekirdeğin ön kısmının tamamen kaplayan bir katlantı, başlık oluşturur. Çekirdeğin ön kutbunda yerleşik olan akrozom granülü de başlık içinde yayılır ve ikisi birlikte akrozomu meydana getirirler.

Akrozom; hyalüronidaz, akrozin, asit fosfataz, proteaz, nöraminidaz, β-N-asetiglukozamidaz ve aril sülfataz gibi hidrolitik enzimlerden zengindir. Bu enzimler, fertilizasyonda Spermatozoon ovumdaki engelleri aşmasında önemli rol oynarlar.

2.3.1.2.2. Kuyruk Gelişmesi

Akrozom oluşurken bir çift sentroil, çekirdek bölgesinden uzaklaşarak spermatid çekirdeğinin arka kutbuna hareket eder, proksimal ve distal sentroilleri meydana getirir. Distal sentroil bir bazal cisim gibi işlev görür ve spermatid kuyruk ya da flagellumunun merkezindeki aksonem' i ya da merkez fibrillerini oluşturur. Proksimal sentroil ise çekirdeğin arka kutbundaki derin bir yarığa gömülür ve spermatidin boyun kısmının yapısında yer alır.

Flagellumun aksonemi gelişir gelişmez (bir çift merkez, 9 çift perifer mikrotubülüsten oluşmuştur), üzerine bazı ek yapılar eklenir ve kuyruk giderek ergin biçimini kazanır. Aksonem üzerine eklenen yapılar şunlardır: 9 adet uzunluğuna düzenli kalın, koyu dış fibriller, Spermatozoon çekirdeği ile kuyruğunun birleştiren bağlantı parçası ve iki uzunluğuna kolon ve bağlayıcı çubuktan oluşan fibröz tabaka.

2.3.1.2.3. Çekirdek Şekil ve Büyüklüğünün Değişmesi ile Birlikte Kromatin Yoğunlaşması

Kuyruk gelişirken spermatid sitoplazmasında mikrotubüllüsler, çekirdek etrafında manşet denilen bir bant oluştururlar. Bu bant, akrozomun posterior kenarında, hücre zarının halka benzeri bir değişikliğinden başlayarak hücrenin arka kutbuna doğru uzanır. Manşetin oluşması ile şu değişiklikler meydana gelir: Çekirdek, akrozom ile birlikte spermatidin yakın hücre zarına doğru hareket eder; yassılaşır, uzar ve kromatini sıklaşır. Buna bağlı olarak spermatid uzamaya başlar. Somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin- ve lizin- zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nüklear yoğunlaşma oluşur (22). Bu somatik histonların protaminlere dönüşünden sonra, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilirler. Protamin proteinleri spermatid kromatin kondensasyonunda önemli rol oynarlar (33).

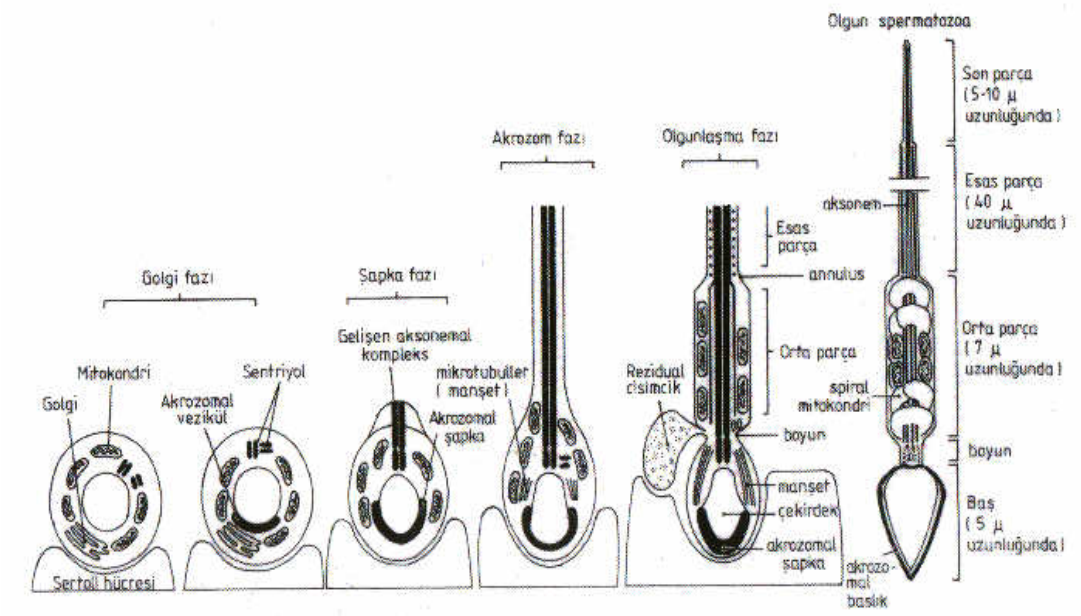
2.3.1.2.4. Artık Spermatid Sitoplazmasının Atılması

Spermatid sitoplazması, ilerde oluşacak spermatozoanın şekline uyarak onu dıştan sarar. Bu sırada, manşet kaybolur ve sitoplazmasındaki mitokondriyonlar, flagelliumun proksimal kısmı etrafında heliks biçiminde bir düzen oluştururlar. Lipidleri ve organelleri içeren spermatid sitoplazma artığı, spermiyumlar seminifer tubül lümenine salınırlarken spermiyumlardan ayrılır ve artık cisim olarak Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Farklılaşma işlemi sona eren Spermatozoon tubül lümenine salınmasına spermiyasyon (spermiyogenezis) adı verilir. Yeni oluşan bu spermiyum immotildir ve henüz fertilize etme yeteneğine sahip değildir (29).

Oluşan spermatozoonlar epididime testis sıvısı olarak adlandırılan ve Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen uygun bir sıvı aracılığı ile aktarılır. Bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla ilişkili adrojen bağlayan protein içerir.

Spermatozoa epididime geldiğinde hareketsizdir. Spermatozoa epididim içinde ilerledikçe olgunlaşır ve fertilizasyon kapasitesi artar. Olgunlaşacak olan sperm tubüli seminiferi kontorti' den epididimis' e geçer. Sperm olgunlaşıncaya kadar epididimis içindeki yolculuğu en az 10 gün en fazla 4-5 hafta alabilir. Bu sürede epididimis' in lümen duvarından beslenir. Olgun hale geldiğinde duktus deferense geçer. Buradan da duktus ejekulatoryusa ulaşır. Sperm epididimis ve duktus deferens' te yaklaşık 1 ay fertil kalabilir. Bu sürede ejekulasyon olmazsa

dejenere olarak emilir. Spermatozoanın fertilizasyon kapasitesi, epididimin baş kısmında % 1, korpusunda % 63 ve kaudasında % 92'dir (3).



Şekil 13: Spermiyogenezin evreleri ve olgun spermatozoon yapısı (34).

Semen yıkama işleminin amacı semenin bir bileşeni olan sperm hücresini diğerlerinden ayırmaktır. Sperm hücresi semen sıvısı içinde iken dölleme yeteneği yoktur, çünkü sıvı, spermin kapasitasyonunu engelleyen faktörler içermektedir. Dolayısıyla sperm ancak içinde bulunduğu semen sıvısından arındırılırsa dölleme yeteneğini kazanmaktadır. Semen yıkama işlemi insan vücudunda serviksde (rahim ağzı) gerçekleşir. Cinsel birleşme sırasında vajen arka forniksine atılan semenden likefaksiyon (sıvılaşma) sonrası hareketlenen sperm serviks kanalı içine yüzer ve burayı geçerken çevresindeki sıvıdan tamamen arınarak rahme ulaştığından kapasitasyona hazır hale gelir. Serviksten geçme aynı zamanda hareketsiz ve cansız spermleri ve semendeki diğer hücreleri de temizleyerek bir süzgeç işlevi görmektedir. Seminal plazma rahim içine geçerse içerdiği prostoglandinlerden dolayı kasılmalara (rahim krampları) neden olur (35).

Laboratuarda semen yıkama işlemi aslında serviks kanalının işlevini taklit etmektedir. Kullanılan yöntem ise yüzdürme ya da santrifügasyondur. Semen yıkamasında birçok vasat kullanılabilir (35).

2.3.1.3. Spermiyumun Ultrastrüktürel Yapısı

Erkek germ hücresi olan spermiyum, hareketli olup temel olarak baş ve

kuyruktan oluşur.

Baş: İnsan Spermatozoon başı, önden bakıldığında oval, yandan bakıldığında armut biçimindedir (Şekil 5). Baş yaklaşık 4-5 µm uzunlukta, 2,5-3,5 µm genişliktedir. Başın büyük bir kısmını çekirdek oluşturur. Spermatozoon başının kromatini yoğun ve hacim olarak küçülmüştür. Bu özellik spermiyuma hareketlilik sağlar. Çekirdeğin 2/3' lük (% 40-70) ön kısmını akrozom meydana getirir. Altta hücre zarı ile çekirdek zarı arasında özelleşmiş koyu bir tabaka gözlenir. Bu tabaka, hücre zarına sıkıca yapışmış basit bir bant olup postakrozom bölgesini meydana getirir. Döllenme sırasında, bu bölgede, spermiyumu saran hücre zarı, ovum hücre zarı ile birleşerek erir ve spermatozoon başı sekonder oosit sitoplazması içine girmesi gerçekleşir.

Kuyruk: Yaklaşık 55 µm uzunluktadır. Kalınlık ve katman sayısı (histolojik yapısı) yönünden 4 parçadan oluşmuştur. Bunlar; boyun, orta parça, esas parça ve son parçadır. Spermatozoon aksonemini oluşturan bir çift santral, 9 çift perifer mikrotubüllüs (9+2) düzeni, kuyruğun öz kısmını meydana getirir ve önemli bir değişme göstermeksizin, boyundan başlayıp kuyruğun son uç kısmına kadar uzanır.

Mikrotubülüs çiftleri α ve β subuniteleri içerir. Mikrotubüllerin temel bileşeni α ve β tubülin proteinidir. α ve β tubülin molekülleri bir sıra halinde dizilerek protofilamanları oluşturur. Protofilamanlar da yine uzunlamasına düzenlenmeyle bir araya gelip mikrotubül duvarını şekillendirirler. A tubülü her birisi 13 protofilamentten oluşurken, B tubülü 10-11 protofilamandan oluşur. Bu nedenle A subunitesi enine kesitlerde tam kapalı bir mikrotubül yapısı gösterirken, B subunitesi tam olmayan protofilaman içeriği nedeniyle enine kesitlerde C harfi şeklinde izlenir. B mikrotubülüsu acık bölgesinden A mikrotubülüne bağlanmıştır. Aksonemin ortasındaki ikili mikrotubülüs 13 mikrofilamandan oluşmuş tam bir yapı gösterir. Bu santral mikrotubül çifti amorf bir iç kılıfla çevrelenmiştir. Periferik mikrotubül çiftleri A subunitesinden iç halkaya doğru uzanan ışınsal (radier spoke) bağlarla aksonemin orta kısmına tutunurlar.

Dokuzlu mikrotubül çiftleri dairesel düzende birbirlerine nexin filamanlarıyla bağlanıp sabitlenmişlerdir. Neksin bağları çiftler boyunca 96 nanometre (nm)' de bir olmak üzere yerleşim gösterir ve çiftlerin kayması sırasında gelen gücün boylu boyunca düzenlenmesi için elastik elementler olarak görev görürler. Mikrotubülüs

çiftlerinin birbirleri üzerinden kayarak hareketini sağlayan mikrotubülle ilişkili motor proteinler iç ve dış dynein kolları şeklinde biçimlenmiştir. Dynein A mikrotubülüsune bağlanmıştır. Dış dynein kolları A subunitesinden aksonemi çevreleyen hücre zarına doğru, iç dynein kolları ise A tubülüsunden aksonemin ortasına doğru uzanacak şekilde yerleşmişlerdir (20).

Kuyruğun hareketini sağlayan aksonem dışında bu hareketi düzenleyen, bazen de mikrotubüllerin kaymasından doğan harekete karşı koyup hareketin yoğunu ve biçimini değiştiren ilave kılıflar vardır. Spermatozoon orta parçasında dokuzlu mikrotubülüs çiftlerinin dışında bu düzene uyacak bir bicimde dairesel yerleşmiş 9 adet dış yoğun fibril bulunur. Dış yoğun fibriller enine kesitlerde tabanları geniş, uç kısımları ince, kabaca üçgen biçimli yapılar olarak ayırt edilir. Bu düzenleniş bir merkez çevresindeki çiçek yapraklarını andıracak şekildedir. Şöyle ki, fibrillerin incelmiş uç kısımları mikrotubül çiftlerine doğru uzanırken, genişlemiş yaprak biçimindeki tabanları perifere doğru açılacak şekilde yerleşmişlerdir. Dış yoğun fibriller orta parçada en kalındır. Aşağıya doğru indikçe kalınlıkları azalır. Orta parçada seyreden dış yoğun fibrillerin 2 adedi orta ve esas parçaların birleştiği yer olan annulus bölgesinde sonlanır. Geriye kalan 7 dış yoğun fibril esas parça boyunca seyreder.

Dış yoğun fibriller (outer dense fiber), sisteinden yoğun keratin benzeri bir protein içerir ve geniş difulsit bağları ile bağlanmışlardır. Fibriller içerisinde kontraktil proteinler bulunmaz ancak ATPaz veya Ca bağlayıcı özellikleri bulunabilir. Bu durum motilite kontrolünde rolü olabileceğini gösterir. İnsan Spermatozoonda maksimum kıvrılma esas parçanın dış yoğun fibrilin yoğun bölgesinde görülür. Bu sebeple, dış yoğun fibriller esnek olmayan çubuklar gibi davranır. Dış yoğun fiberlerin asimetrik dizilişi aksonemin farklı bölgelerinde zorlanmalar oluşturarak, flagellanın hareketini düzenler (20,36).

Spermiyum kuyruğunun en önemli özelliği, aksonemin 9 adet kalın, koyu dış fibrillerle çevrili olmasıdır (9+9+2). Aksonem, kuyruğa hareketlilik, kalın koyu dış fibriller ise diklik sağlayan yapılardır**.**

Boyun: Kısa bir parça (0,5 μm) olup segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası proksimal sentriolden meydana gelir. Başın hemen arkasında koyu bir kapitulum, gömülme çukuruna uyacak biçimde oturarak bağlantı parçasını oluşturur.

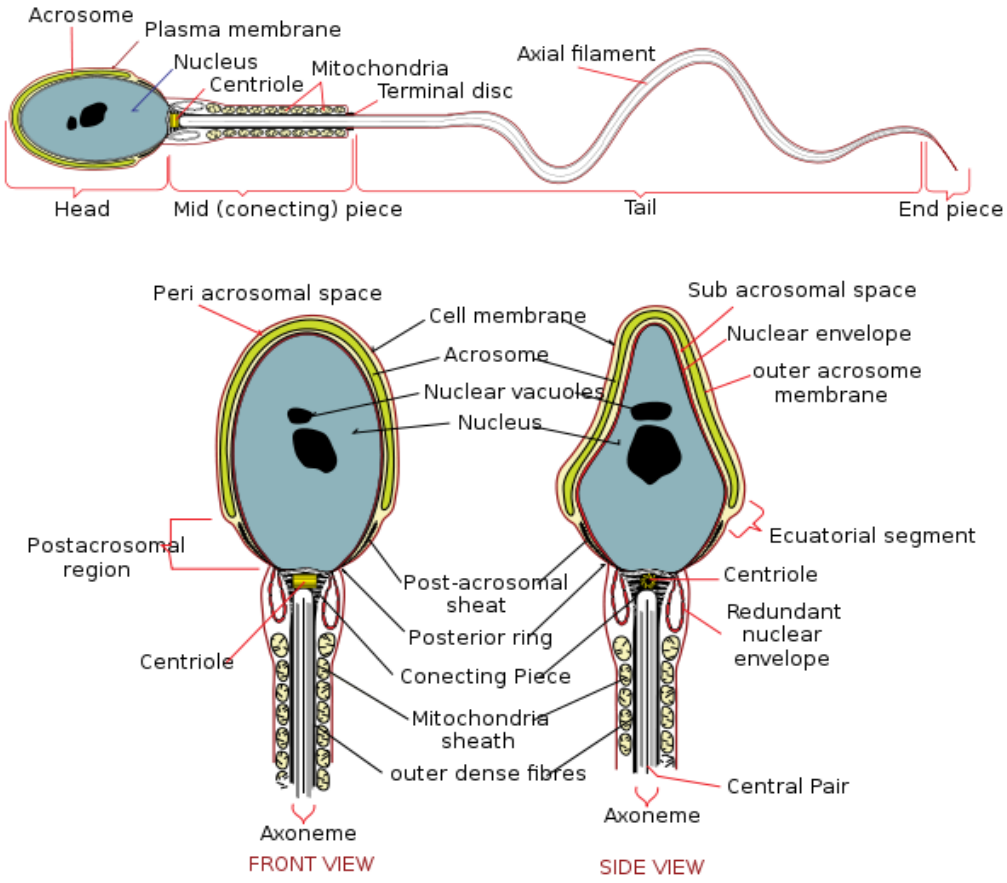
Bu kapitulumdan, geriye doğru uzanan 1-1,5 µm uzunluğunda 9 segmenli kolon çıkar ve son kısımları, spermiyum kuyruğunun 9 kalın, koyu dış fibrilleri ile devam eder. Bağlantı parçasının içinde kapitulum eklem yüzünün hemen altında enine yerleşmiş proksimal sentriol bulunur. Spermiyum kuyruğu merkezindeki aksonem düzenini oluşturan distal sentriol yapısı ergin Spermatozoon bağlantı parçasında yoktur. Ancak onun 9 üçlüsünün kalıntıları, segmentli kolonların iç yüzü ile ilintilidir. Kuyruk aksoneminin ortadaki bir çift mikrotubülüsü, proksimal sentriole kadar uzanır.

Orta parça: Kuyruğun 9+9+2 düzeninin dairesel olarak saran ve uç uça düzenlenerek sıkı bir heliks oluşturmuş mitokondriyon tabakasından meydana gelir. Bu tabakanın altında dış yoğun fibriller, üzerinde ise hücre zarı bulunur. Mitokondriyonlar, spermiyum hareketi için gerekli enerjiyi üretirler. İnsanda orta parça uzunluğu, yaklaşık 5-7 µm, 1-1,5 µm çaptadır. Mitokondriyon tabakasının sonunda (anulus bölgesi) kuyruk, hücre zarının sıkıca yapıştığı koyu bir materyalden oluşmuş bir halka bulunur.

Esas parça: Esas parça yaklaşık 45 µm uzunluğunda olup başladığı yerde 0,5 µm kalınlığındadır. Bu parçada, 9+2 düzenini oluşturan yapılar, fibröz tabaka ve bunun üzerinde de hücre zarı bulunur. Fibröz kılıf, eş uzaklıktaki uzamına kolonlardan çıkan dairesel iskelet tarafından oluşturulur. Elektron mikroskopta kuyruğun enine kesiti gözlendiğinde, fibröz tabaka dorsal ve ventral uzunluğuna düzenlenmiş kolonlardan meydana gelir. Bu uzunluğuna kolonlar, her biri yarım yol seyreden iki dairesel çubukla birbirine bağlanırlar. Şöyle ki, dorsal kolondan başlayan bir dairesel çubuk yolun yarısındaki ventral kolona bağlanır. Ventral kolondan başlayan ikinci dairesel çubuk yine yarım yol döndükten sonra dorsal kolona bağlanır. Bu düzen, enine kesitte, kuyruğu asimetrik olarak büyük ve küçük iki kompartmana böler. Küçük kompartmanda 3, büyük kompartmanda ise 4 adet kalın, koyu dış fibril bulunur. Fibrillerin bu asimetrik dağılımı spermiyumların kuyruk hareketinde önemli rol oynar. Hem dış yoğun lifler, hem de fibröz kılıf, spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan proteinler olan keratin içerir. Bu parçanın kalın koyu dış fibrilleri, annulustan itibaren son parçaya yaklaştıkça sayıları giderek azalır (anulustan kısa bir mesafeden sonra 3 ve 8. fibriller gözlenmezler) ve nihayet kaybolurlar. Esas parça,

kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifçe sarılı (orta parçadaki dokuz liften farklı) merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur.

Son parça: Bu parçada, fibröz tabaka, kuyruğun en ucuna yaklaşık 5-7 µm kala birden bire sona erer. Bu noktanın distalinde kalan kısım, son kısım adını alır. Son parça, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı, sadece aksonem bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır. Son kısımda, ortada aksonem ve üzerinde hücre zarı bulunur (34).



Şekil 14: Spermatozoonun morfolojik yapısı (37).

Dünyanın birçok bölgesinde spermiyum canlılık tespitinde ve potansiyel fertilitesinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan incelemelerin birçoğunda motilite kullanılan en yaygın kriterdir (38). Bununla birlikte düşük ısılar ve kısa süreli ozmolarite değişiklikleri, motil hücreleri immotil hale getirebilmekte, ancak hücreler potansiyel olarak motilite ve fertilizasyon yeteneklerini korumaya devam edebilmektedirler. Dolayısıyla spermiyum değerlendirilmesinin daha iyi yapılabilmesi için başta akrozom olmak üzere tüm morfolojik incelenmeler, motilite

ile birlikte kullanılan kriterlerdendir (39-41).

Söderquist ve ark., taze ejekulattaki spermiyum morfolojisi ile eritilmiş spermiyum fertilitesi arasındaki ilişkinin daha önce yapılan birçok çalışmada araştırıldığını fakat morfolojinin fertilite tahmininde yanlış veya yetersiz sonuçlar verebildiğini ifade etmişlerdir. Bu ilişkinin ilk olarak 1927 yılında Williams ve Sagave tarafından ortaya konduğunu bildiren araştırıcılar, takip eden yıllarda konu üzerinde birçok araştırma yapıldığını ve 1971 yılında Rao' nun yaptığı bir çalışma ile morfolojik değerlendirmelerin spermiyum kalitesinin rutin bir testi olarak kabul edildiğini belirtmişlerdir. Farklı araştırıcılar, akrozomal ve diğer morfolojik bozukluklar ile canlı spermiyum oranı gibi özelliklerin fertilite potansiyelini hangi ölçülerde etkilediğinin ortaya konması için daha fazla çalışılması gerektiğini açıklamışlardır (42).

Kimi araştırıcılar motilite, konsantrasyon ve morfoloji gibi standart semen analizlerinin genelde sübjektif olarak gerçekleştirildiğini, kullanılan malzemelerin sıcaklılık ve kalitesindeki değişikliklerin analiz sonuçlarını etkileyebileceğini, nispeten uzmanlık gerektiren bu testlerin spermiyumun fertilite potansiyelinin belirlenmesinde yeterli olmayabileceklerini bildirilmişlerdir (39,42,43,44). Correa ve ark. (15,39,45)' nın bildirdiğine göre hücre membranlarının; metabolizma, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, oosit penetrasyonu gibi olaylarda önemli rolü bulunmaktadır ve membranların fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi bu anlamda gerekli görülmektedir. Yine Check ve ark. (15), fonksiyonel bütünlüğe sahip spermiyum membranlarının; akrozom reaksiyonu, spermiyum kapasitasyonu, metabolizması ve spermiyumun ovum yüzeyine bağlanma yeteneğinde önemli roller üstlendiğini ve bu özelliğin standart spermiyogram ile ölçülemediğini belirtmişlerdir.

Fertilizasyon olayında membranların önemli rolü olduğunun son yıllarda daha iyi anlaşılmasıyla çalışmacıların bu konuya yoğunlaştığını bildiren Van Der Ven ve ark. (16), morfolojik ve fizyolojik olarak bütünlüğünü koruyan sağlam bir membranın hipoozmotik ortamda şiştiğini açıklamışlardır. Sağlam bir membranın hipoozmotik ortamda şişmesinin nedenini araştıran çalışmacılar, spermiyumda kuyruk fibrillerinin etrafını saran plazma membranının, baş bölgesini sarana göre daha gevşek tutunduğunu ve kuyruğa ait plazma membranı genişlediğinde, kuyruk fibrilleri arasındaki Dynein bağlarının kasılması ile bu fibrillerin membran içerisinde

kıvrılacağını ifade etmişler, bu olgunun da faz kontrast mikroskopta kendi üzerini saran kuyruk gibi gözüktüğünü açıklamışlardır. Woolley ve Richardson (46), düşük ozmotik basıncın mitokondrilerde şişme ve yuvarlaklaşmaya neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Liu ve Foote (47), donma işlemi boyunca suyun donması sırasında spermiyumun hipertonik ortamlarla karşı karşıya geldiğini ve bu ortamların plazma membran bütünlüğüne ve motiliteye değişik derecelerde zarar verdiğini bildirmişler, değişik ozmolaritelere sahip sulandırıcıların denendiği çalışmada, spermiyumun hipertonik ortamlarda immotil hale gelebildiğini fakat membran bütünlüğünü sürdürdüğünü belirlemişlerdir. Boğa spermiyumunun % 55 su içerdiğini bildiren çalışmacılar, ejekulatın izotonik bir solüsyondan 712 mOsm' lük bir ortama transfer edildiğinde sadece % 21 büzüştüğünü belirlemişler ve hipertonik ortamlara göre hipotonik ortamların spermiyum morfolojisine daha fazla zarar verdiğini rapor etmişlerdir.

Bazı araştırıcılar spermiyum membranlarının, aralarında kesin bölmeler içeren farklı yapıdaki alanları (akrozom, post akrozomal bölge, orta kısım ve kuyruk) sardığını ve bunların her birinin spermiyum yapısal bütünlüğünün korunmasında ayrı ayrı katkıda bulunduğunu ifade etmişler ve membran bütünlüğünün belirlenmesinin önemini vurgulamışlardır (41,48,49).

Akrozomal morfolojinin kuyruk membranı hakkında bilgi sağlamadığı ve dolayısıyla kuyruk plazma membranının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün de mutlaka incelenmesi gerektiğini bildiren Perez-Llano (49), bu testlerden birinin Hipoozmotik Şişme Testi (HOST) olduğunu kaydetmişlerdir. Spermiyumun ozmotik basınçtaki değişimlere hızlı cevap verdiğini fakat bu etkinin kesin mekanizmasının bilinmediğini vurgulayan çalışmacılar, plazma membranının iyon kanalları üzerine yoğunlaşmışlardır. Na^+/K^+ iyon pompasının hipoozmotik medyumda bir rolü olmadığını, fakat bu pompanın hipertonik ortamda fonksiyon gösterdiğini açıklayan çalışmacılar, bazı türlerdeki K^+ kanallarının hücrenin şişme refleksinden kaynaklanan hacim artışında düzenleyici görev yaptığını bildirmişlerdir. Yakın zamanda keşfedilen Aquaporin'lerin böbrek, göz gibi organların hücrelerindeki plazma membranlarında suyun hızla taşınmasında görev aldıklarını, olgun rat spermiyumları ve spermatidlerinde aquaporinlerin saptandığını bu protein

kanallarının hipoozmotik çevre şartlarına 30 saniye gibi kısa sürede verilen cevabı açıklayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Hipoozmotik ortamda spermiyum membranlarının şişme eğiliminin 1966 yılında belirlendiğini kaydeden Jeyendran ve ark. (9), hipoozmotik ortamda kuyrukta meydana gelen bu şişmenin, membranın normal şekilde su transportuna izin verdiğini ve dolayısıyla membran bütünlüğünün ve fonksiyonel aktivitesinin sağlıklı olduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Liu ve Foote (47), Fast-Green FcF ve Eozin B, Trypan blue gibi membrana bağlanan boyaların da, membran bütünlüğünün belirlenmesi amacıyla yıllardır kullanılmakta olduğunu belirtmişlerdir.

Günümüzde membran bütünlüğünün değerlendirilmesi, supravital boyalar ve Hipoozmotik Şişme Testi (HOST) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Neild ve ark. (50), bu amaca yönelik olarak Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) ve Propidium İodide (PI) gibi floresans boyama metotlarını geliştirmişlerdir. Bu metotta CFDA, hücre içi esterazlar ile hidrolize olmakta ve serbest kalan carboxyfluorescein plazma membranı bütün ise membran tarafından tutulmaktadır. PI hasarlı hücre membranlarına penetre olmakta ve DNA' ya bağlanmaktadır. HOST ise fonksiyonel yönden ölçüm yapmaktadır. Araştırıcılar, membranın yapısal olarak bütün olması halinde bile biyokimyasal olarak inaktif olabileceği için HOS testinin supravital boyalardan daha kullanışlı bir indikatör olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte floresans boyama teknikleri birçok araştırıcı tarafından kullanılmıştır (47,51,52,53).

Yakın zaman kadar araştırıcılar, birçok farklı türde gerek taze ve gerekse donmuş spermada hücre membranlarının fonksiyonel bütünlüğünü hipoozmotik test yardımıyla belirlemeye çalışmışlardır (10,38,39,45,51,54,55). Bununla birlikte kimi araştırıcılar HOS testinin spermiyumun fertilite potansiyelini ortaya konulmasında rutin olarak kullanılabilmesi için daha fazla çalışılması gerektiğinde birleşmişlerdir (15,16,40,49).

Anti-HOST olarak, normal hücre içi ozmotik basınca (290-300 mOsm/kg) yakın izotonik bir solüsyon tercih edilmiş olup spermiyum için gerekli tüm fizyolojik koşulları sağlayan piyasadaki hazır bir solüsyon (PureSperm® Wash) kullanılmıştır.

Çalışmamızın amacı; infertilite problemiyle gelen hastalardan elde edilen semen örneklerinin hipoozmotik solüsyonda şişme yeteneğini ölçmek, Hipoozmotik

bir medyumda (150 mOsm/kg) şişmeye uğrayan spermatozoonların diğer sperm parametreleri arasındaki ilişkiyi ölçmek, şişme kabiliyeti ile fertil ve infertil erkekler arasındaki korelasyonu tespit etmek ve Hipotonik ortamdan izotonik bir ortama (Anti-HOST) spermatozoonların alınmasında membran bütünlüğünde meydana gelen değişikliklerin faz kontrast ve elektron mikroskop düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

Tablo 9: Semen Sınıflaması Terminolojisi (56).

Normozoospermi	Referans degerleriyle tanımlanmış normal ejakülat
Oligozoospermi	Referans degerinden daha az sperm konsantrasyonu
Asthenozoospermi	Referans degerinden daha az sperm motilitesi
Teratozoospermi	Referans degerinden daha az sperm normal morfolojisi
Oligoasthenoteratozoospermi	Her üç degiskenin bozuklugunu gösterir
Kriptozoospermi	Ejakülatın bazal degerlendirmesinde 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)

2.4. Semen Analizi

Semen kalitesi dolaysıyla fertilite yeteneğinin belirlenmesinde; spermatozoonların semen içerisindeki sayısı, motilitesi ve morfolojisine bakılarak değerlendirilir. Bu amaçla makroskobik, mikroskobik muayeneler ve opsiyonel testler kullanılmaktadır. Detaylı ve etraflı bir semen analizi, infertil çifte yaklaşımda yapılması gereken ilk tetkiktir. Erkeğin çocuk sahibi olabilme potansiyelini en iyi biçimde gösteren kriterlerden birisi de sperm fonksiyon testleridir. Birçok araştırmacı tarafından fertilizasyon potansiyeli ile fonksiyonel bir test olan HOST arasındaki bağlantı ortaya konmuştur.

Ejakülatın total içeriğinin % 3-5' spermiyum, (% 5-10) epididimis, vaz deferensin salgılarıdır. Geriye kalan büyük bir kısmı ise seminal vezikül, prostat ve

bulbu uretral bezlerin salgısıdır. Seminal sıvıda su, mineral tuzlar, proteinler, serbest amino asitler, spermin, fruktoz ve prostoglandinler bulunur. Ayrıca boşaltım kanallarından dejenere olup dökülmüş hücreler, kökeni bilinmeyen yuvarlak hiyalin cisimler, lipit granülleri, yağ protein pigment granülleri görülebilir. Seminal vezikülün salgısı ejekülat salgısının % 50-70' ini oluşturur. Bu salgı sarı, yapışkan, fruktozdan zengin ve alkali pH' ya sahip olup metabolitler, globulin, askorbik asit ve prostoglandinleri içerir. Bu salgıdaki prostoglandinler dişi genital yollarının kontraksiyonu için önemlidir. Prostat bezinin salgısı ejekülat salgısının % 15-30' ini oluşturur ve semene krem rengini verir. Bu salgının içeriğinde sitrik asit, asit fosfataz ve proteolitik enzim olan fibrolizin içerir. Fibrolizin, ejekulasyondan sonra pıhtılaşmaya uğramış semenin sıvılaşmasını sağlar. Prostat bezinin salgısı hafif asit pH' ya sahiptir. Bulboüretral bezlerin (Cowper) salgıları ejekülat salgısının % 3-5' ini oluşturur. Bu salgı berrak, yapışkan mukus benzeri bir salgı salgılarlar. Sialoprotein ve amino şekerlerinden zengin olan bu salgı cinsel stimulasyon sırasında salınarak uretranın kaygan hale gelmesini sağlar. Semenin ortalama pH' sı 7,5' tir. Semen örneği verildikten sonra ejakulattaki prostat enzimlerinin etkisi ile seminal veziküllerin salgısında bulunan fibrinojen koaguluma yol açar, 15-20 dakika sonra prostatik fibrinoliz etkisi ile bu koagulum çözülür. Bu nedenle normal semen örnekleri yaklaşık 20 dakika sonra oda sıcaklığında sıvılaşır.

2.4.1. İnsan Semenin Genel Yapısı ve Semen Örneğinin Alınması

Ejekulasyona uğramış spermiyumların tümü üzerinde yapılan ölçümler fertilizasyon sahasına ulaşanların fertilizasyon kapasitesini tanımlamada yardımcı değildir (4). Yine de semen analizi bireyin klinik durumu hakkında bilgi sağlar. Çoğu androloji laboratuarı semen analizlerini WHO' nun kriterleri göre yapmaktadır (Tablo 3). Semenin değerlendirilmesinde farklı yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemler standart, opsiyonel ve araştırma prosedürlerinden oluşmaktadır.

Örnek en az 2 günlük cinsel perhiz sonunda toplanılır fakat cinsel perhiz 7 günü geçmemelidir. Hastanın ismi, cinsel perhiz süresi, örneğin alındığı tarih ve zaman kaydedilmelidir. Örnek mastürbasyonla elde edilmeli ve ejekülat geniş ağızlı, cam veya plastik bir kap içine konulmalıdır. Örneğin alınması ve analize alınma süresi mümkün olduğunca az olmalıdır. Çünkü motilite zamanla azalır (4).

Tablo 10: WHO kriterlerine göre semen parametreleri referans değerleri (4).

Volüm	≥ 2,0 ml
pH	7,2-8,0
Sperm konsantrasyonu	≥ 20 milyon spermatozoa/ml
Total sperm sayısı	≥ 40 milyon spermatozoa/ejakulat
Motilite	Ejakulasyonu takiben 60 dakika içerisinde, a + b ≥ % 50 veya a ≥ % 25 progresyon.
Morfoloji	≥ %30 normal form.
Vitalite	≥ % 75 canlı (boya almayan) spermatozoa.
Lökosit	< 1 milyon/ml
Immunobead test	< %20 Partikül yapısmıs spermatozoa
MAR testi	< %10 Partikül yapısmıs spermatozoa
Alfa glukozidaz (nötral)	≥ 20 mU/ejakulat
Çinko (total)	≥ 2,4 µmol/ejakulat
Sitrik asit (total)	≥ 52 µmol/ejakulat
Asit fosfataz (total)	≥ 200 U/ejakulat
Fruktoz (total)	≥ 13 µmol/ejakulat

2.4.2. Semenin Makroskobik İncelemesi

Laboratuvara gelen örnek 37 ^{o}C' lik etüv veya ısıtıcı yüzey üzerine konur. Normal bir semen örneği opak beyaz-krem renginde ve homojen bir görünümde olup likefaksiyon oda ısısında yaklaşık 60 dk' da tamamlanır. Bazı durumlarda likefaksiyon gerçekleşmez veya semen koagulumlu (yapışkan tortu) bir görünümde olur. Böyle durumları mutlaka not etmek gereklidir, prostat bezinin fonksiyonlarındaki değişiklik semen likefaksiyonunu etkiler. Örnek bazen çok berrak bir görünümdedir. Bu durum sperm konsantrasyonunun ya çok düşük olduğunu veya azoospermik bir örnek olduğunu düşündürür. Örneğin yapışkan bir yapı göstermesi enfeksiyon belirtisidir; böyle durumlarda likefaksiyon süresi de uzar. Semen örneğinin kahverengimsi renkte olması eritrosit varlığını gösterir. Beyaz görülmesi ise lökosit varlığını düşündürür. Semen viskozitesi 5 ml' lik pipetlerle semenin alınıp

tekrar örnek kabına boşaltılması ile ölçülebilir. Semenin pipete yavaş doluşu ve akarken 2 cm' in üzerinde uzaması viskozitenin arttığını gösterir. Yüksek viskozite enfeksiyon riski nedeni ile mutlaka not edilmesi gereken bir durumdur. Yüksek viskoziteli örneklerin serum fizyolojik veya kültür mediumu ile karıştırılıp konsantrasyon ölçümlerinin yapılması gerekir.

Semen pH' sı prostat bezinin asit, seminal veziküllerin de alkali salgıları nedeniyle 7,2-8,0 arasında değişmektedir. Semen pH' sı, aralığı 6,1 ile 10,0 olan pH kağıtları ile ölçülür. Semen pH' sının 6,5' in altında olması seminal veziküllerin agenezisinde görülür. Anormal pH aynı zamanda enfeksiyonların da belirtisidir.

2.4.3. Semenin Mikroskobik İncelenmesi

2.4.3.1. Sperm Motilitesi

10 µL (tercihen 6–10 µL) semen lam üzerine konur ve 22 mm x 22 mm boyutlarında lamel ile kapatılır. Hava kabarcığı oluşturmadan işlem tamamlanmalıdır. 17 °C' nin altındaki sıcaklıklar sperm motilitesini olumsuz etkilediğinden oda sıcaklığının sabit tutulmasının yararı vardır. Laboratuvar sıcaklığının kontrol edildiği durumlarda (20-25 °C) ısıtıcı yüzeylere gereksinim olmamakla birlikte, işlemin sabit ısıda yapılabilmesi için 35-37 °C' lik ısıtıcı tablalar kullanılması uygundur. Motilitenin değerlendirilmesi için en az 5 mikroskop alanında inceleme yapılmalıdır. Faz kontrast mikroskobunda en az 200 sperm sayılarak değerlendirme yapılır. WHO kriterlerine göre her spermatozoanın motilitesi a, b, c yada d olarak derecelendirilir (4);

a) Hızlı ileri hareketli (≥25 µm/s 37 °C' de yada ≥20 µm/s 20 °C' de. 25 µm, 5 sperm baş uzunluğu ya da yarım kuyruk uzunluğuna eşit olarak kabul edilir),

b) Yavaş ya da tembel ileri hareketli

c) Yerinde hareketli (<5 µm/s)

d) Hareketsiz.

Normal bir örnekte a ve b hareketli spermin toplam hareketli spermin % 50' sini, a hareketli sperm % 25' ini oluşturmalıdır. Bu iki şarttan herhangi biri sağlanmıyorsa örnek "Astenozoopermi" tanısını alır (4).

Hareketli ve hareketsiz sperm sayılarının toplamı total sperm sayısını verir. Sperm konsantrasyonu 20 milyon/ml' den yada toplam sperm sayısı 40 milyondan az ise "oligozoospermi" tanısı konur.

2.4.3.2. Sperm Konsantrasyonunun Hesaplanması

Sperm konsantrasyonunun ölçümü Makler sayma kamarası veya Neubauer hemositomerik metodu ile yapılır. Çoğu androloji laboratuarında Makler sayma kamarası ile sperm kontrasyonu ölçülmektedir. Öncelikle semen örneği pastör pipeti ile birkaç kez pipetlenerek homojenize olması sağlanır. 4 µL (4-10 µL) semen Makler kamarasına alınır. Hava kabarcığı oluşturmadan üzeri kapatılır. Faz-konrast mikroskopta X20 objektif ile 10 kare sayılır (sperm sayısı yoğunluğuna göre 10 adet karedeki spermler ya da tüm kareli alan, eğer kareli alandaki sperm sayısı 10' dan az ise tüm makler alanındaki spermler değerlendirilir) ve sonuç milyon olarak ifade edilir. Sırasıyla ileri doğru hızlı ve yavaş hareketli sperm sayılır, kaydedilir, daha sonra yerinde hareketli ve hareketsiz sperm sayılır ve kaydedilir. Sayım ne kadar gecikirse kamaranın periferinden o kadar çok sperm sayım sahasına yüzer ve yanlış sonuç çıkar (4).

2.4.3.3. Ölü-Canlı Tayini (Eozin Y)

WHO kriterlerine göre semende hareketli sperm oranı % 50' nin altında ise canlı spermlerin tayini gereklidir. Sperm canlılığı çeşitli vital boyalar aracılığıyla gösterilebilir. Bir hücrede hücre membranı bozulmamış ise boyalar hücre içine giremez. Pembe ve kırmızı renk alan hücreler canlılığını yitirmiş, bu rengi almayan canlı olarak tanımlanır. Bu yöntem sadece tanı amaçlı olup, vital oldukları saptanan hücrelerin daha sonra ICSI işleminde kullanılma olasılığı yoktur. % 0.05 Eozin Y, 0,9 (9 g/l) serum fizyolojikte hazırlanır.

Test aşağıda belirtildiği şekilde yapılır:

1- 10 µL taze semen üzerine eşit miktarda Eozin Y damlatılarak lamel ile kapatılır,
2- 5 dakika beklenir
3- Işık mikroskopta X40 objektif ile incelenerek boya almış hücreler (ölü) ve boya almamış (canlı) hücreler sayılarak yüzdesi hesaplanır (100 hücre sayılır).
4- Canlı sperm oranı % 75' in üzerinde bulunduğunda örnek "normal" kabul edilir.

2.4.4. Morfolojik İnceleme

2.4.4.1. Spermac Boyama

Değerlendirme öncesi likefiye olmuş semen örneğinden 10 µL temiz bir lam üzerine damlatılarak, ince bir smear hazırlanır. En fazla 5 dakika havada kuruduktan sonra smear Spermac fiksatif içerisine konur. Burada en az 5 dk fiksasyon için beklenir. Distile su ile birkaç kez yıkanır, fazla su lam eğik tutularak süzülür. Spermac A boyasına maruz bırakılır. Bir dakika süresince boyanarak distile su ile birkaç kez yıkanır. Daha sonra fazla su süzülerek, Spermac B boyası ile 1 dk boyandıktan sonra distile su ile birkaç kez yıkanır. Takiben Spermac C boyasına maruz bırakılır. 50 saniye (sn) boyandıktan sonra distile su ile birkaç kez yıkanıp kuruması beklenir. Kuruduktan sonra ışık mikroskobunda X100 büyütmede, immersiyon yağı ile değerlendirme yapılır. En az 100 ardışık sperm sayılarak normal, büyük başlı, küçük başlı, uzun başlı, çift başlı, kuyruk anomalili, boyun ve orta kısım anomalili amorf ve çoklu anomalili formlar yüzde cinsinden sperm morfoloji formuna kaydedilir.

Kesin Kriterler (Kruger) kriterlerine göre normal bir spermatozoon; düzgün kenarlı ve oval şekilli bir baş ve baş alanının % 40-70’ ini kaplayan belirgin bir akrozoma sahip olmalıdır. Boyun, orta kısım ve kuyruğa ait herhangi bir defekti ve baş alanının yarısından büyük bir sitoplazmik dropleti bulunmamalıdır. Sperm morfolojisi değerlendirmelerinde normal bir spermin baş uzunluğu 4 ila 5 µm, baş eni 2,5 ila 3,5 µm, başın uzunluk/en oranı 1,50-1,75 µm olmalıdır. Orta kısım silindir 0,5-1µm kalınlıkta, 7-8 µm uzunluğunda ve başa aksiyal olarak bağlanmalıdır. Sitoplazmik droplet normal baş alanının yarısından az olmalıdır. Kuyruk orta kısımdan biraz daha ince, kıvrımsız, düzgün biçimli ve yaklaşık 40-50 µm uzunluktadır (5).

Sperm morfolojisinin normal olması, o spermin mutlaka fertil olacağı anlamına gelmez. Ancak morfolojinin bozuk olduğu spermlerin fertilizasyon yeteneklerinin ciddi olarak etkilenmesi söz konusudur. İşte bu aşamada sperm fonksiyon testleri önem kazanmaktadır.

Kesin kriterlere göre spermlerin yetenekleri araştırılmış ve aşağıdaki değerler bulunmuştur;

Normal morfoloji	:	> % 14	% 4–14	< % 4
Fertilizasyon oranları	:	% 88,3	% 49,4	% 7,6

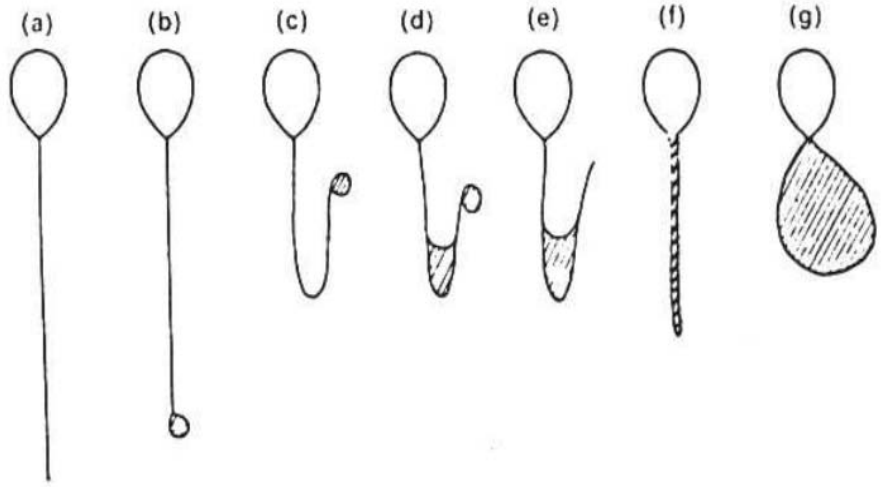
2.4.5. Sperm Fonksiyon Testleri

Spermiyumun vas deferens bölgesinden geçerek fertilizasyonun gerçekleşeceği bölgeye kadar olan yolculuğu, oosite ulaşıp kumulus ve korona radiata hücrelerinden geçmesi ve zona pelusidaya bağlanması ile sonuçlanır. Bu aşamadan sonra oluşan akrozom reaksiyonu ile spermiyum zona matriksine penetre olarak oolemmaya ulaşır ve fertilizasyonu oluşturan olaylar zinciri başlar. Spermiyumun bu zinciri başlatamaması (fertilizasyonun başarısızlığı) bir infertilite nedenidir. Fonksiyonel olarak normal bir sperm "iyi bir morfolojiye sahip, hızlı hareket yeteneği olan, membran geçirgenliği normal, akrozom reaksiyonunu yeterince gerçekleştiren, ovumun zona pellusidasını penetre edebilen ve ovum sitoplazmasında kromatini iyi kondense olan sperm" demektir. Potansiyel infertilite araştırması ya da infertilite yönteminin belirlenmesi için sperm ile ovum arasındaki reaksiyonun gerçekleşmesinde sorun olup olmadığının test edilmesi gerekmektedir. İdiopatik erkek infertilitesinin toplam erkek infertilitesi olgularının yaklaşık olarak % 20’ ini içerdiği düşünülürse, fertilizasyon belirteci olarak fonksiyon testlerinin kullanılmasının önemi daha iyi anlaşılabilir. Aşağıdaki tabloda belirtilen sperm fonksiyon testlerinin bazıları laboratuar pratiğinde kullanım zorluğu nedeni ile çok tercih edilmese de açıklanamayan infertilite olgularında başvurulması gerekli görülmektedir.

Bilindiği üzere insan spermiyumun yumurtayı dölleme yeteneği spermiyum yapısı, spermiyum motilitesinin değeri ve kapasitasyon ile doğrudan ilişkilidir. Özellikle erkek faktörü nedeniyle infertil olarak karşımıza çıkan çiftlerin sıklıkla görülmesi, spermiyum fertilizasyon potansiyelinin güvenilir bir şekilde tahmin edilmesi zorunluluğunu getirmiştir. Bu amaçla hemizona testi, zona pelusida bağlanma testi ya da zona-free oosit penetrasyon adı verilen test dünyada birçok in vitro fertilizasyon merkezinde uygulanmaktadır. Bunların yanı sıra diğer bazı testler de spermin spermaum fertilizasyon potansiyeli hakkında bilgi vermektedir. Bunlar arasında HOST (Hipoozmotik Şişme Testi), akridin oranj, anilin mavisi, immunofloresan boyama testleri (Pisum sativum, Peanut agglütinin) ve strict kriterlere göre sperm morfoloji değerlendirilmesi sayılabilir (18).

2.4.5.1. Hipoozmotik Şişme (HOS) Testi

Jeyendran ve ark. (9) tarafından 1984 yılında spermiyumların hipoozmotik ortama konulduğunda dış ortamdan hücre içine sıvı alması ve hücrenin şişmesi prensibine dayanan bir test geliştirildi. Normal membran yapısına sahip olan spermlerin hipoozmotik sıvıda su alarak şiştiği ve kıvrıldığı gözlendi. Anormal HOS reaksiyonu veren spermlerin diğer fonksiyonlarının da bozulmuş olduğu gözlendi. Günümüzde hipoozmotik şişme testi bir sperm fonksiyon testi olmasının yanında sperm canlılığının da test edilmesinde kullanılmaktadır. Testis biyopsilerinde veya hareketsiz sperm örnekleri ile ICSI uygulamalarında HOS testi canlı sperm seleksiyonunda kullanılmaktadır.



Şekil 15: HOS testi sonucu değişik şekiller almış sperm kuyruk örnekleri görülmektedir. (a) normal, (b-g) değişik şekillerdeki kıvrılma tipleri (9).

2.4.5.2. HOS Solüsyonu

Aşağıdaki maddeler kullanılarak hazırlanır;

Sodyum sitrat dihidrat ($Na_3C_6H5O_7$. $2H_2O$)	7.35 gr
Fruktoz	13.51 gr
Distile su	1000 ml

Elde edilen çözelti küçük hacimlerde (1 ml) tüplere ayrılarak -20 ^oC' de saklanır.

2.4.5.3. Testin Uygulanışı

1 ml HOST solüsyonu 37 ^oC' de 10 dk tutularak ısıtılır ve üzerine 100 µL likefiye olmuş semen ilave edilip karıştırılır. 37 ^oC' de 30 dk tutulur. İnkübasyon

sonrası 5 µL alınarak temiz bir lam üzerine konur. Lamel kapatılıp faz kontrast mikroskobunda X40 büyütmede incelenir. En az 200 sperm sayılarak kıvrılan spermlerin yüzde olarak değeri bulunur. Spermlerin % 50' sinden daha azında kuyruklarında kıvrılma görülürse anormal olarak kabul edilir. Hipoozmotik şişme gösteren spermler mikroenjeksiyonda kullanılabilmekte, bu sayede ejakulatta motil sperm bulunmadığı hallerde fertilizasyonda kullanılan hücrelerin canlı olduğundan emin olunabilmektedir.

Bütün bir membran hipoozmotik bir ortamla karşılaştığında suyun içeriye girmesine izin verecektir. Bu ise hücrenin şişmesine neden olacaktır. Spermatozoonda, kuyruk fibrillerinin etrafını saran plazma membranı, baş bölgesini sarana göre daha gevşek tutunmaktadır. Dolayısıyla, kuyruk bölgesindeki şişme çok daha net görülebilmektedir. Kuyruğun plazma membranı genişlediğinde, kuyruk fibrilleri membran içinde kıvrılacaktır. Bu, faz kontrast mikroskop ile kendi üzerini saran bir kuyruk gibi gözükmektedir. Diagnostik olarak, sonuçlar daha çok hem baş hem de kuyruğun membran bütünlüklerini belirlemektedir. Ama genellikle kuyruk üzerinde çalışılmaktadır (16).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) İnsan Araştırmaları Etik Kurulu' nun onayı (08.11.2007 tarih / 523 karar no) alındıktan sonra başlanıldı.

3.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu' nca onaylanan çalışmamızdaki hastalar; Diyarbakır ili ve çevresinde yaşayan, çeşitli infertilite nedenleriyle Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Diyarbakır Devlet Hastanesi Androloji laboratuarına başvuran bireylerden seçildi. Bu hastalara çalışma hakkında bilgi verilerek rızaları alındı.

Bu çalışmada 29 kişi infertil ve 10 kişi fertil olmak üzere toplam 39 birey çalışmaya dahil edildi. Kruger kriterlerine göre normal morfolojisi % 4 olanlar "teratozoospermi", normal morfolojisi > % 14 olanlar ise "normozoospermi", Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre motilitesi a + b % 50' nin altında olan olgularda "astenozoospermi", sperm kontrasyonu <20 milyon/ml olan olgularda "oligozoospermi" olarak gruplandı. Bu kriterlere göre 12 hasta oligozoospermik, 9 hasta oligoastenozoospermik, 8 hasta astenozoospermik ve 10' u ise normospermik fertil bireylerden oluşmaktadır.

3.1.1. İnfertil Vakaların Çalışmaya Alınma Kriterleri

1. Çalışmaya girmeyi kabul eden bireyler
2. En az 1 yıl evli olup çocuk sahibi olamayan bireyler
3. Semen analizi sonucu WHO kriterlerine göre normal olmayan bireyler
4. Yaş ortalaması üreme dönemde olan erişkin bireyler

3.1.2. Fertil Vakaların Çalışmaya Alınma Kriterleri

1. Çalışmaya girmeyi kabul eden bireyler,
2. En az 1 yıl evli olup çocuk sahibi olan bireyler,
3. Semen analizi sonucu WHO kriterlerine göre normal olan bireyler.

Semen örneği vermeden önce çalışma hakkında bilgi verilerek çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan Bilgilendirme Gönüllü Olur Formu (BGOF) doldurulduğu. Semen örnekleri alınacak vakaların en az 48 saat (2 gün), en fazla 7 günlük cinsel perhiz süresi sorgulandı. Bu kriterlere sahip olan hastalardan semen örnekleri alınması için steril, tek kullanımlık özel amaçla yapılmış sperm toplama kapları verildi. Bu hastalardan masturbasyon ile elde edilen ejakulat örnekleri inkübatörde 37 °C' de,

20 dk inkübe edilerek likefiye olması sağlandı. Likefaksiyon süresi not ettikten sonra WHO kriterlerine göre semen örnekleri makroskobik ve mikroskobik açıdan değerlendirildi (hacim, pH, konsantrasyon, motilite, morfoloji). Konsantrasyon ve motilite için steril pipetle yaklaşık 10 µL semen Makler kamerasına yerleştirildi ve üzerine cam kapağı kapatıldı. Faz kontrast mikroskopta X 40 objektifle değerlendirildi.

3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Tri-Sodyum Sitrat Dihidrat Kristal ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) (MA: 294,10 gr/mol)
2. D(-)-Fruktose chem pure (MA:180,16 gr/mol)
3. Eozin Y
4. Anti- HOST solüsyonu (Pure Sperm® Wash –Nidacon international AB)
5. Boya seti (Spermac Stain boya seti) 250 ml stain C Lot:FPO4502
6. % 2.5' luk Gluteraldehit
7. % 2' lik Agar
8. Immersiyon yağ

3.3. Solüsyonların Hazırlanması

3.3.1. Hipoozmotik Şişme (HOS) Solüsyonunun Hazırlanması

Tri-Sodyumsitrat–2-hidrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) (MA: 294,10 gr/mol)	7,35 gr
D(-)-Fructose ($C_6H_{12}O_6$) (MA: 180,16 gr/mol)	13.51 gr
Distile su	1000 ml

Elde edilen çözeltinin osmotik basıncı ölçülerek küçük hacimlerde (1 ml) ependorf tüplerine konarak -20 ^oC' de saklandı. Kulanımdan önce 1 ml HOST solüsyonu 37 ^oC' de 10 dk tutularak ısıtıldı ve üzerine 100 µL ejekulat ilave edilip karıştırıldı.

3.3.2. Eozin Y Boyasının Hazırlanması

%0.05 Eozin Y, serum fizyolojikle hazırlandı.

3.3.3. Anti-HOST Medyumunun Hazırlanması

Anti-HOST solusyonu olarak Pure Sperm® Wash –Nidacon international AB kullanıldı. İşlem öncesi 1 ml ependorf tüplerine alınıp 37 ^oC' de 10 dk tutuldu ve üzerine 100 µL HOST uygulanmış örnek ilave edilip karıştırıldı.

3.4. Morfolojik Değerlendirme

3.4.1. Işık Mikroskobu için Spermac Boyama Metodu

1- Likefiye olmuş semen örneklerinden 10 µL temiz bir lam üzerine damlatıldı sonra

başka bir lam yardımıyla, ince ve homojen yayma yapıldı.

2- Yayma preparatın kuruması için açık havada ve oda ısısında 20 dakika bekletildi.

3- Spermac fiksatif solüsyonunda en az 5 dk bekletildi.

4- Fiksatiften çıkarılan preperat 8-10 kez suya batırıp kurutma kâğıdı ile lamın ucundan fazla su süzüldü.

5- Spermac A boyasıyla 1 dk boyandı.

6- Preparatı 8-10 kez suya batırıp, kurutma kâğıdı ile lamın ucundan fazla su süzüldü.

7- Spermac B boyası ile 1 dk boyandı.

8- Preparatı 8-10 kez suya batırıp, kurutma kâğıdı ile lamın ucundan fazla su süzüldü.

9- Preparat Spermac C boyasına 50 saniye maruz bırakıldı.

10- Preparatı 8-10 kez suya batırıp, kurutma kâğıdı ile lamın ucundan fazla su süzüldü.

11- Açık hava ve oda ısısında 20 dakika kurması beklendi.

12- Preparatlar kuruduktan sonra ışık mikroskobunda, immersiyon yağı kullanarak morfolojik değerlendirme yapıldı.

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde Kruger'in kesin morfoloji kriterleri temel alındı. Morfoloji değerlendirilmesi, Olympus CX21 marka ışık mikroskobunun X100 objektif kullanılarak yapıldı. Her preparattan 100 adet sperm sayılarak, normal morfolojiye sahip spermlerin yüzdesi belirlendi. Sayım aynı preparatın en az 5 farklı alanından yapıldı. Normal morfolojili sperm sayısı 5 den az ise 'teratozoospermi' tanısı kondu.

3.5. Eozin Y Boyama

10 µL likefiye olmuş taze semen örneği üzerine eşit miktarda Eozin Y damlatılarak lamel ile kapatıldı, 5 dk beklendi. Işık mikroskobunda X40 objektif ile incelenerek boya almış hücreler (ölü) ve boya almamış hücreler (canlı) sayılarak ölü-canlı oranları tespit edildi (100 hücre). Canlı sperm oranı % 75' in üzerinde bulunduğunda örnek "normal" kabul edildi.

3.6. Faz Kontrast Mikroskobu için Preparat Hazırlanması (HOST)

İnkübasyon öncesi HOST için 100 µL taze sperma 1 ml sodyum sitrat-fruktoz medyumunda (finalde 150±10 mOsm/kg) 37 °C' de, 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası faz kontrast mikroskopta X40' lık büyütmede spermiyumların kuyruk kıvrılmaları incelendi ve toplam 200 hücre sayıldı. Kuyruğu şişen, kıvrılan hücreler aktif fonksiyonlu ve sağlam membranlı spermatozoonlar olarak kabul edildi.

Şişmeyenler ise inaktif olarak değerlendirildi.

3.7. Anti-HOST Uygulaması

Anti-HOST inkübasyonu için sperma inkübasyonu için, Pure Sperm® Wash (290-300 mOsm/kg) mediyumu 1 ml ependorf tüplere konuldu. 37 °C' de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkubasyondan sonra HOST uygulanıp santrifüje edilen spermiyumlar Anti-HOST solusyonuna alınıp 37 °C' de 30 dk inkube edildi ve süre sonunda faz kontrast mikroskobunda X40' lık büyütmede kuyruk kıvrılmaları değerlendirildi.

3.8. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İçin Takip ve Grid Hazırlanması

TEM takibi için tüm gruplar 3 alt gruba ayrıldı. Bunlar;

I. Grup; tüm gruplardan semen örnekleri işlem öncesi 500 µL alınıp 1500 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant döküldü. % 2,5' luk gluteraldehit pelet üzerine eklendi ve +4 derecede saklandı.

II. Grup; daha önce hazırlayıp inkübatöre bıraktığımız 1 ml Hipoozmotik şişme solüsyonuna 100 µL taze semen örneği eklenerek 37 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübatörden çıkarılan örnekten 10 µL alınıp faz kontrast mikroskopta X40 büyütmede yaklaşık 200 hücre değerlendirildi. Spermatozoonun kuyruk yapıları ve şişmeleri incelendi. Geriye kalan HOST örneği 1500 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek supernatantlar döküldü. TEM için üzerine % 2,5' luk gluteraldehit eklenerek +4 derecede saklandı**.**

III. Grup; önce yukarda bahsettiğimiz HOST uygulandı daha sonra 1500 devirde 10 dk santrifuj edildi süpernatant döküldü daha sonra üzerine 1 ml Pure Sperm® Wash solüsyonu (290-300 mOsm/kg) eklenerek 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası faz kontrast mikroskopta X40 büyütmede yaklaşık 200 hücre değerlendirildi. Y.ne aynı şekilde spermatozoonun kuyruk yapıları ve şişmeleri tekrar incelendi Geriye kalan örnek 1500 rpm devirde 10 dk santrifüj edildi. Supernatantlar döküldü Anti-HOST TEM için % 2,5' luk gluteraldehit eklendi. +4 derecede saklandı. TEM için elde edilen örnekler bilinen rutin TEM takibi sonrası agara alınıp yarı ince kesitleri alınıp, elektron mikrografları alınarak değerlendirilmeye tabi tutuldu.

Deney çalışma gruplarından elde edilen semen örnekleri, elektron

mikroskobik inceleme için ependorf tüplerine alınarak 1500 rpm devirde 10-15 dk santrifüj edildi. Supernetant uzaklaştırıldı, ependorf tüplerindeki peletlerin üzerine en az 2 kat hacminde % 2,5' luk tamponlanmış gluteraldehit eklendi. +4 ºC 'de bekletildi. Daha sonra çöken pelet alınarak % 2 'lik sıvı agar içerisine gömüldü. Oda ısısında donan agar 1mm' lik parçalara bölünerek rutin elektron mikroskobu takibinden geçirildi. Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyaline gömüldü ve etüvde polimerize olmaları sağlandı. Hazırlanan bloklardan alınan yarı ince kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi. İşaretlenen spermium bölgelerinden bakır gridlere alınan ince kesitler alınarak Uranil Asetat-Kurşun Sitrat ile boyanıp Jeol 1010 Elektron mikroskobunda değerlendirildi.

Tablo 11: Alınan semen örnekleri tablodaki sıraya göre işleme tabi tutuldu.

Ejakulasyon Sonrası	Semen kabının üzerine hastanın ismi, yaşı, cinsel perhiz süresi ve evlilik süresi yazıldı. Semen 37 ^{o}C' lik etüve konuldu.
Makroskopik İnceleme	Likefaksiyon süresi Görünüm (renk, koagulasyon) Hacim Viskozite pH
Işık Mikroskopik İnceleme	Spermatozoon konsantrasyonu (Makler kamarası) Spermatozoon motilitesi Spermatozoon dışındaki diğer hücresel elemanlar Aglütinasyon Eozin Y boyama (100 hücre sayıldı) Smear hazırlandı (Spermac boyama)
Fonksiyonel Test (Faz kontrast mikroskop)	HOST
PureSperm Wash (Faz kontrast mikroskop)	Anti-HOST
Transmission Elektron Mikroskobu	Örnekler % 2,5' luk gluteraldehite alındı. Rutin EM takibi yapıldı. Gridler hazırlandı. TEM değerlendirilmesi yapıldı

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel yöntemlerden iki grubu karşılaştırmak için Student's t testi kullanıldı. İkiden fazla grubu karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA kullanıldı.

İnfertil gruptaki bireylerin sayısı yeterli olduğu için P korelasyon ilişki katsayıları için Pearson r korelasyon katsayısı kullanıldı.

Fertil grupta ise, bireyler az sayıda olduğu için korelasyon ilişki kat sayısı için non parametrik testlerden Spearman'ın Sr katsayısı kullanıldı.

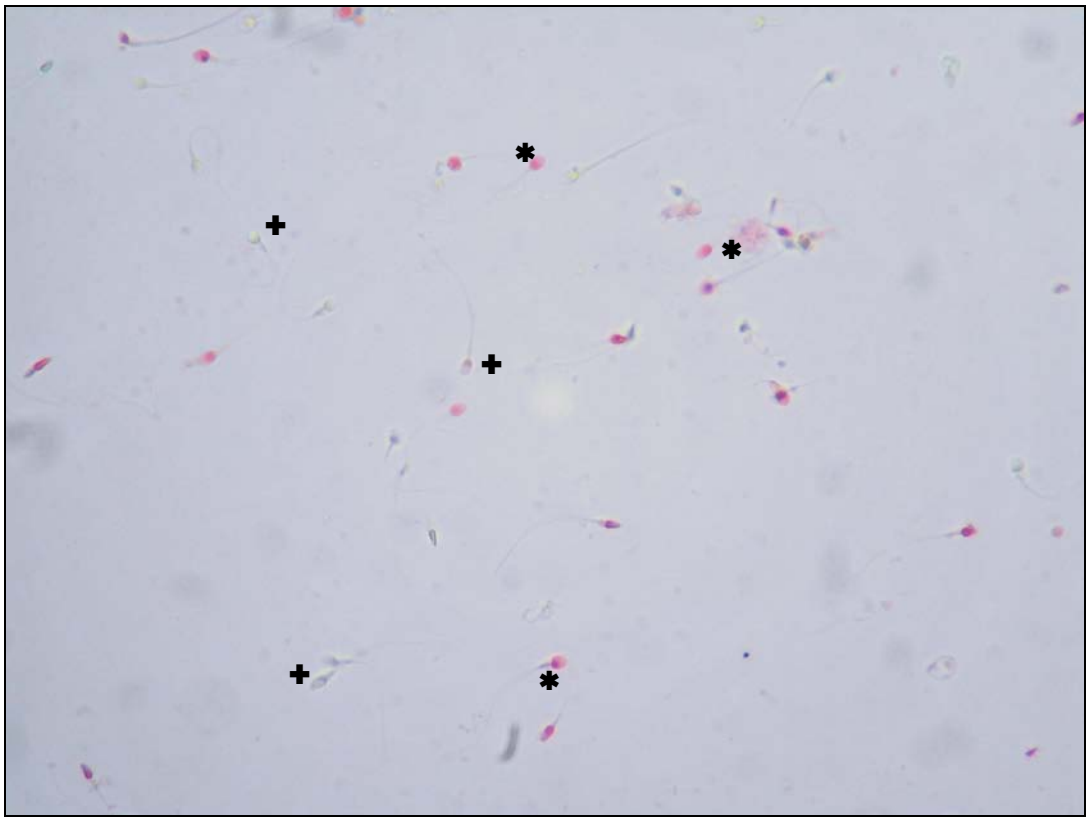
Önemlilik ifadesi için, * , P=0,05, ** ise P=0,001 için kullanıldı.

4. BULGULAR

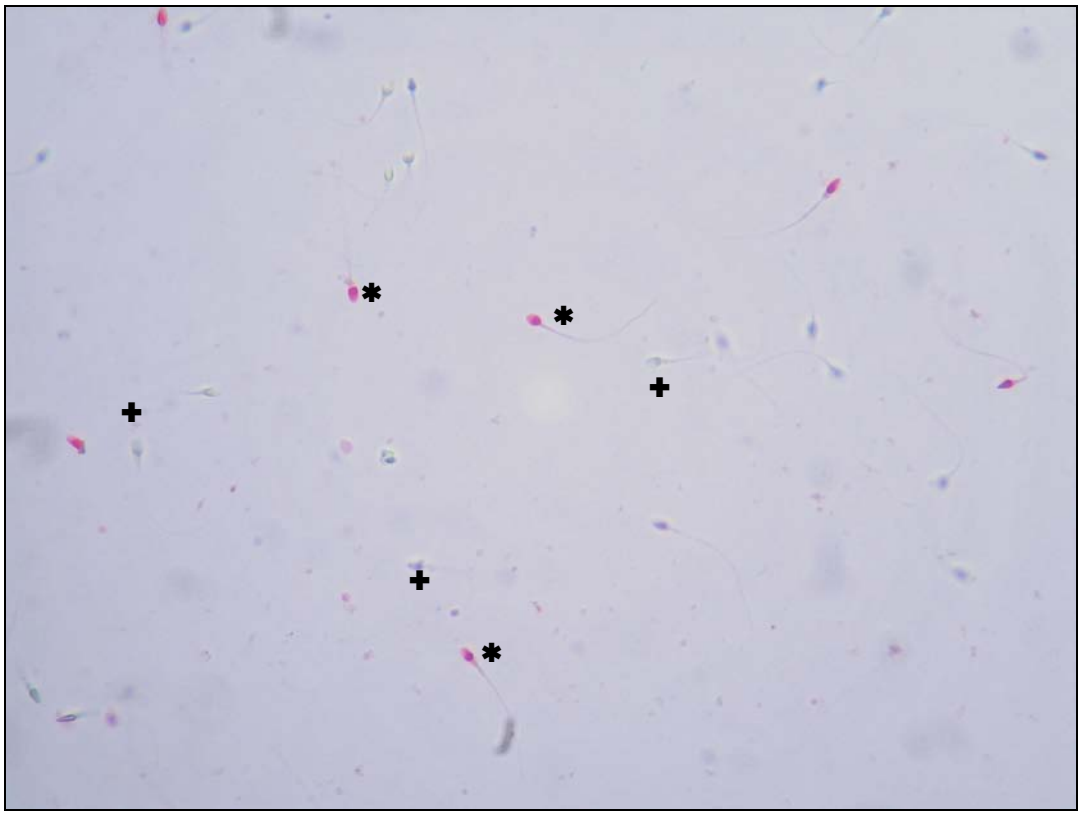
4.1. Işık Mikroskobu Bulguları

4.1.1. Eozin Y Bulguları

Spermiyumlar, ölü-canlı oranlarının tespiti amacıyla Eozin Y ile boyandı. 10 µL taze semen üzerine eşit miktarda Eozin Y damlatılarak lamel ile kapatıldı, 5 dk beklendi. Işık mikroskopta X40 objektif ile incelenerek boya almış (ölü) ve boya almamış (canlı) 100 tane hücre sayılarak yüzdesi hesaplandı (Şekil 7-8).



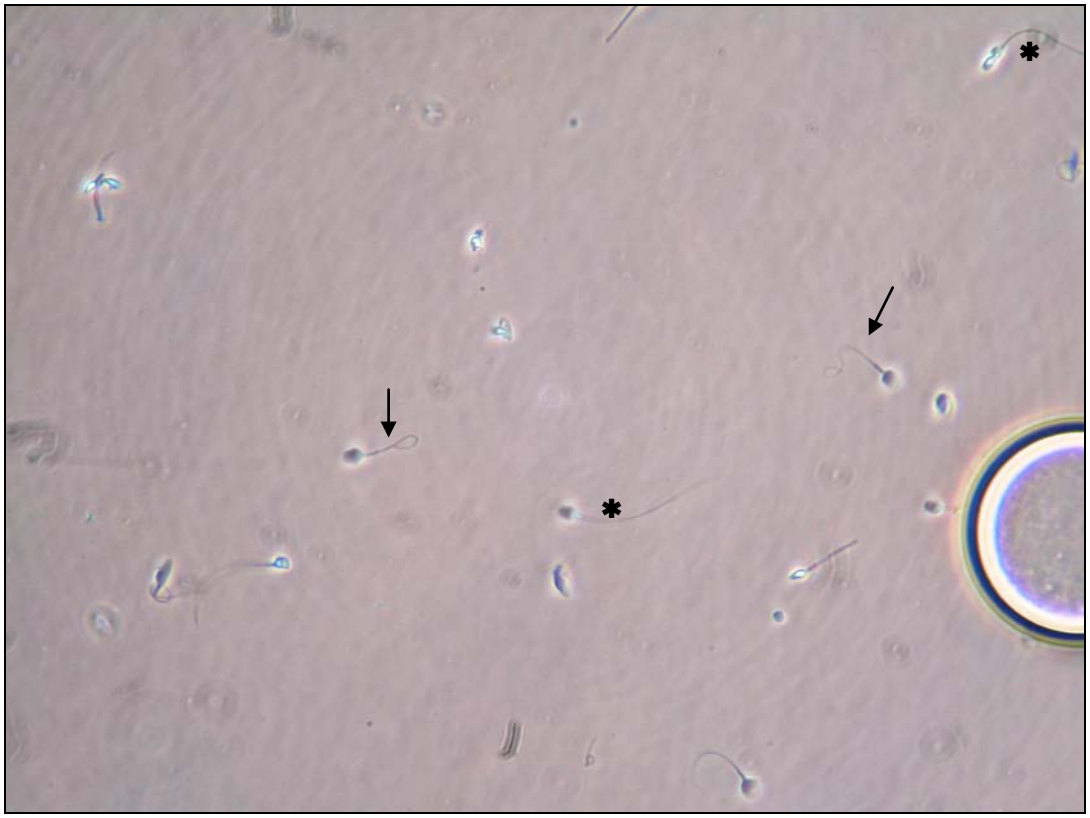
Şekil 16: Fertil gruba ait spermiyumlar. ✱: ölü spermiyumlar ✚; canlı spermiyumlar (Eozin Y boyama, X200).



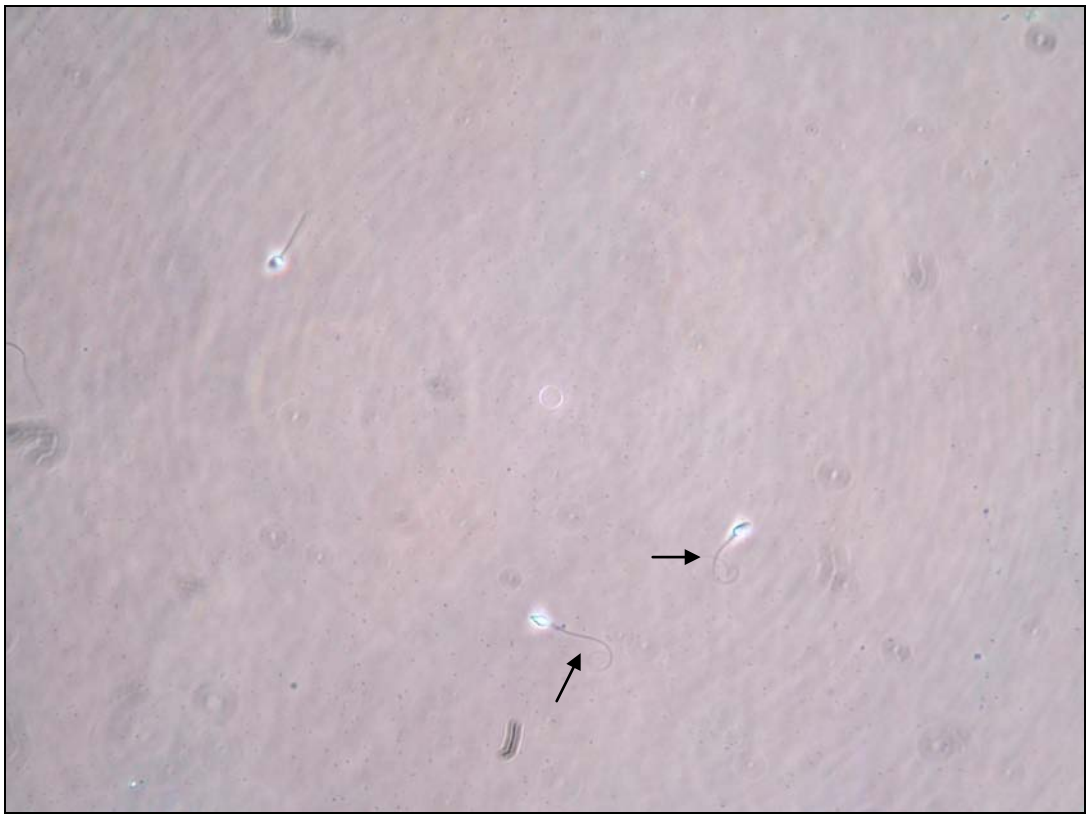
Şekil 17: Fertil gruba ait spermiyumlar. ✱: ölü spermiyumlar ✚; canlı spermiyumlar (Eozin Y boyama, X200).

4.1.2. HOST Bulguları

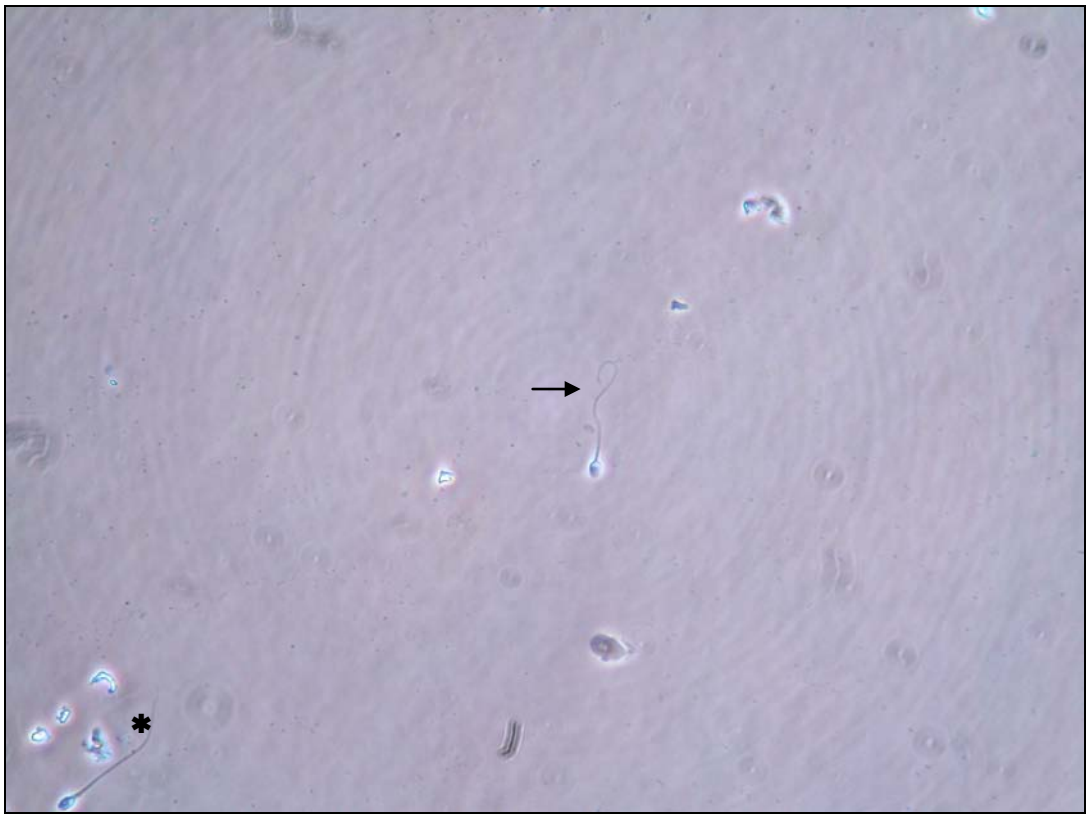
1 ml HOST üzerine 100 µL semen ilave edilerek 37 ^{o}C' de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5 µL alınarak temiz bir lam üzerine konuldu. Lamel kapatılıp faz kontrast mikroskopta X40 büyütmede incelendi (Şekil 8-11).



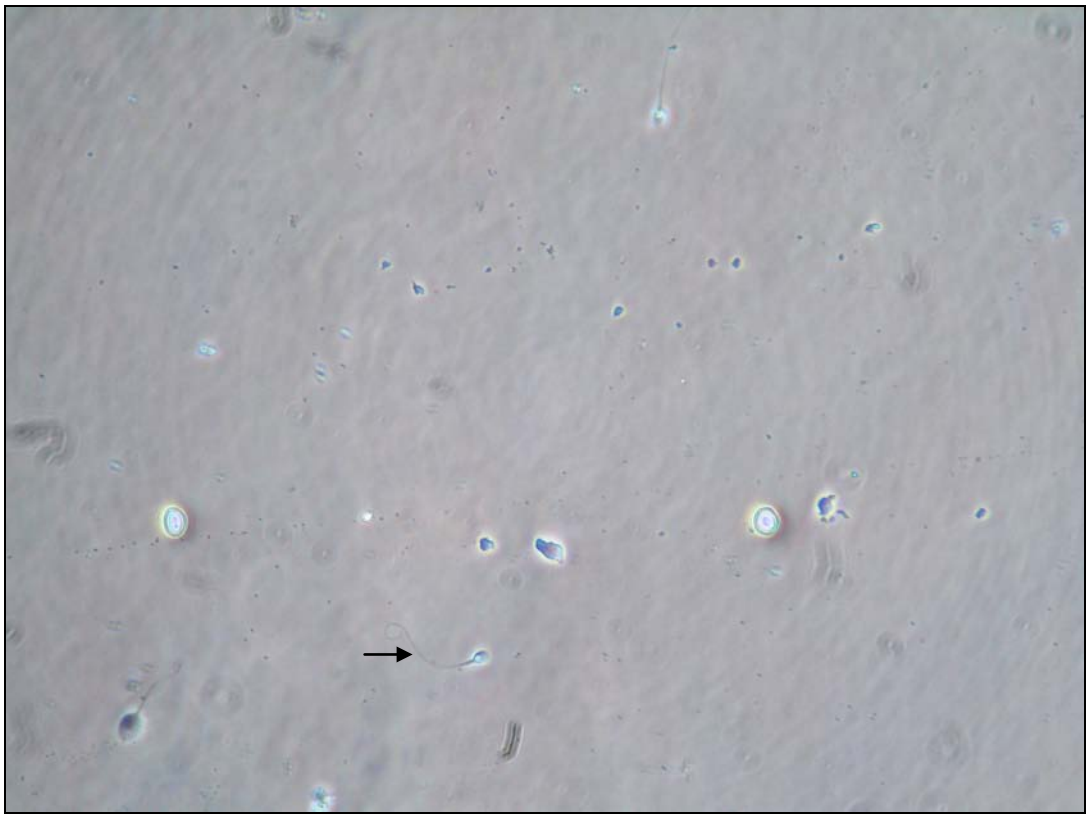
Şekil 18: Hipoozmotik şişme gösteren ve kuyrukları kıvrılan canlı spermler ile şişme göstermeyen ve kuyrukları kıvrılmayan cansız spermlerin faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri. → :Kıvrılmış kuyruk, ✱: kıvrılmamış kuyruk (X400).



Şekil 19: Hipoozmotik şişme gösteren ve kuyrukları kıvrılan canlı spermlerin faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri. → : Kıvrılmış kuyruk (X400).



Şekil 20: Hipoozmotik şişme gösteren ve kuyrukları kıvrılan canlı spermler ile şişme göstermeyen ve kuyrukları kıvrılmayan cansız spermlerin faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri. → :Kıvrılmış kuyruk, ✱: kıvrılmamış kuyruk (X400).



Şekil 21: Hipoozmotik şişme gösteren ve kuyrukları kıvrılan canlı spermlerin faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri. → :Kıvrılmış kuyruk (X400).

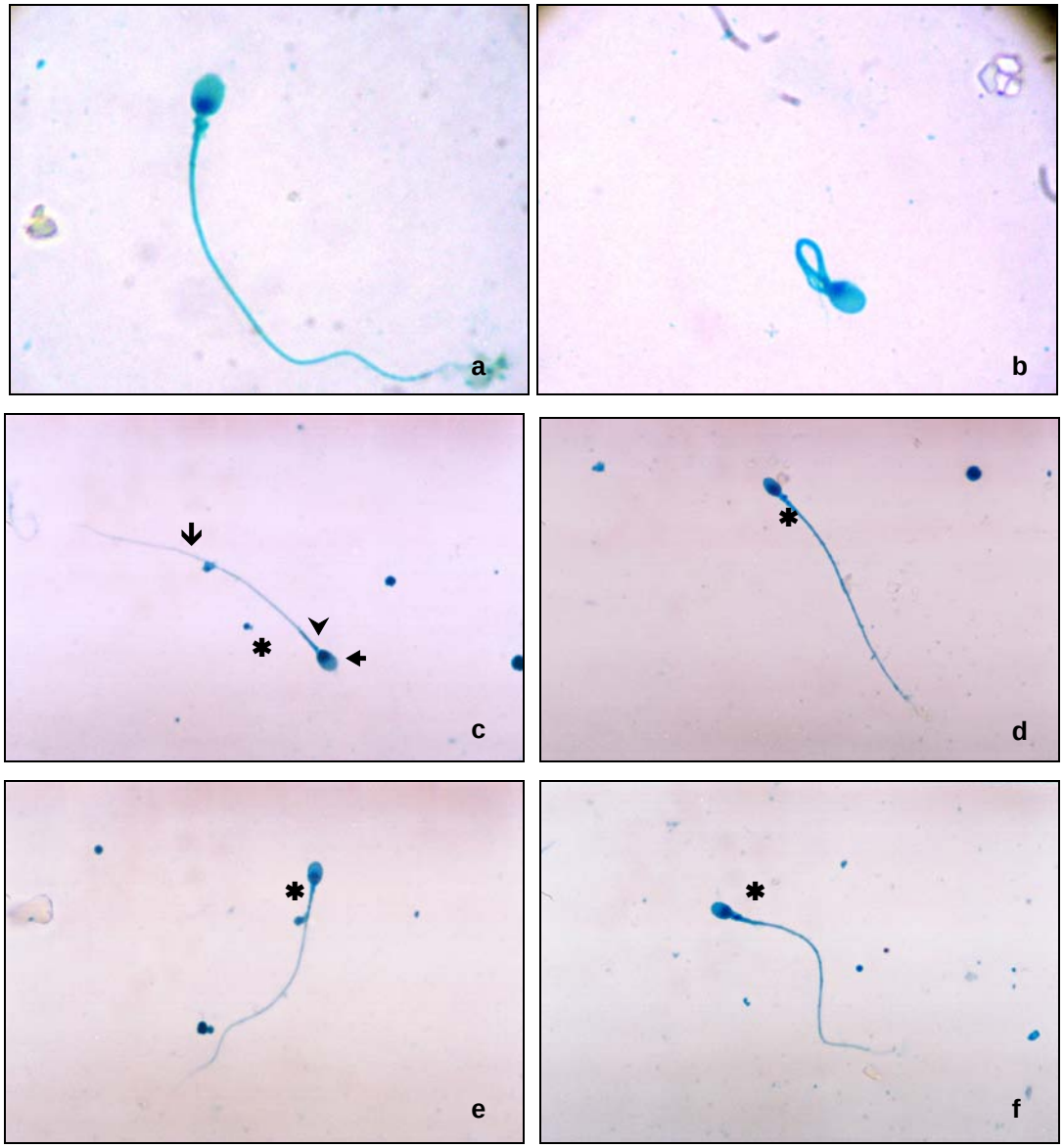
4.1.3. Anti- HOST Bulguları

1 ml Anti-HOST solüsyonu ve örnek 37 ^{o}C' de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5 µL alınarak temiz bir lam üzerine konuldu. Lamel kapatılıp faz kontrast mikroskopta X40 büyütmede incelendi. Anti-HOST uygulaması sonrası görüntüler HOST sonrası görüntülerle benzerdi. Ancak Anti-HOST uygulanan spermiyumlarda, spermiyum motilitesinin HOST grubundan daha yüksek olduğu saptanmıştır.

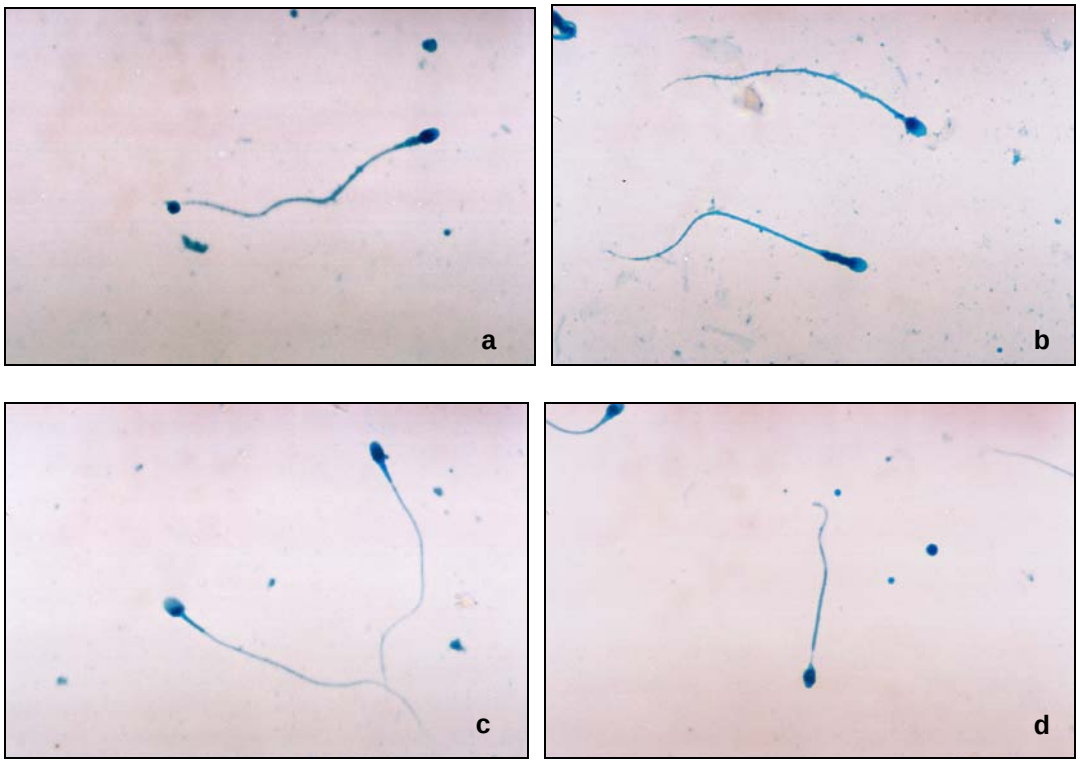
4.1.3. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda morfolojik değerlendirmelerde Spermac boyama (Spermac Stain Ferti Pro, Belgium) kullanıldı. Bu boya ile çekirdek kırmızı renkte, akrozom, boyun ve kuyruk ise yeşil renkte boyandı. Değerlendirmede en az 100 sperm sayıldı. Değerlendirmede, boyama öncesi tespit için kullanılan fiksatif özellikle baş kısmında bir miktar küçülmeye neden olduğundan dolayı bu durum göz önüne alındı.

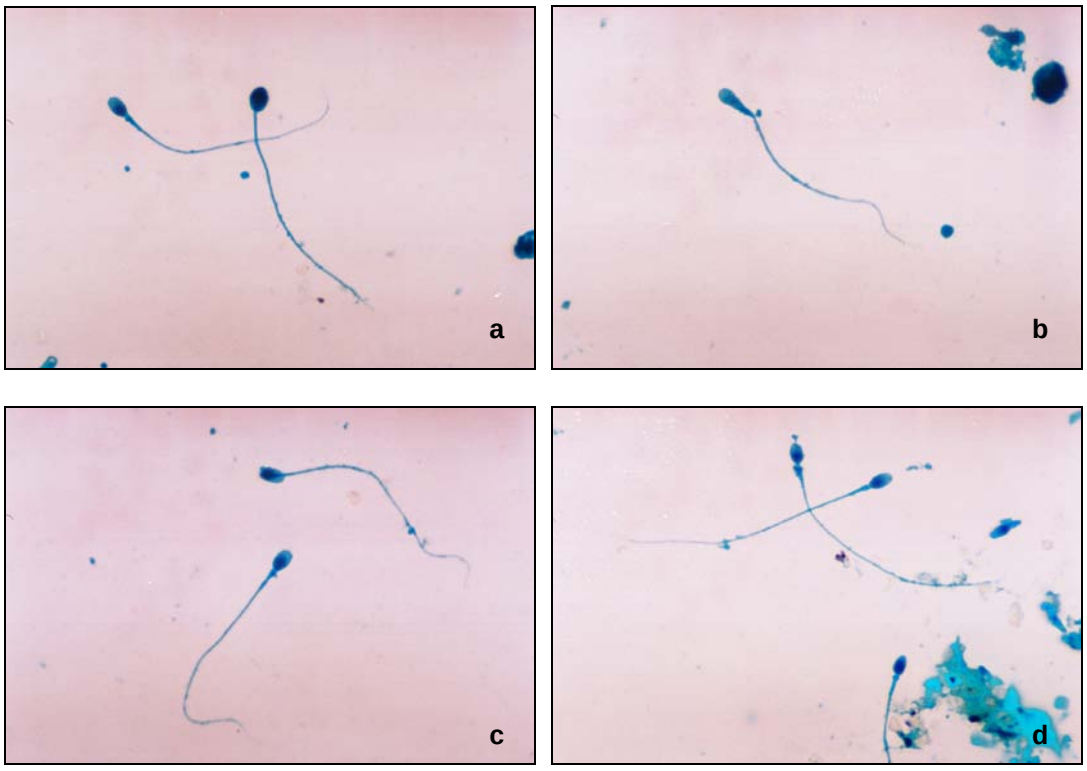
Kruger Strict kriterleri baz alınarak Olympus marka ışık mikroskobunda X1000 büyütmeyle sperm morfolojileri değerlendirildi (Şekil 13-15).



Şekil 22 a-f: Fertil gruba ait spermiyum görüntüleri. ✱:Normal spermiyum ←: Spermiyum başı, ➘: Boyun, ↓ : Kuyruk (Spermac boyama, X1000).



Şekil 23 a-d: İnfertil grubuna ait anormal spermiyumlar. **a:** kalın boyun, **b:** Baş ve boyun anomalisi, **c:** Elonge baş, **d:** Mikst anomali (Spermac boyama, X1000).



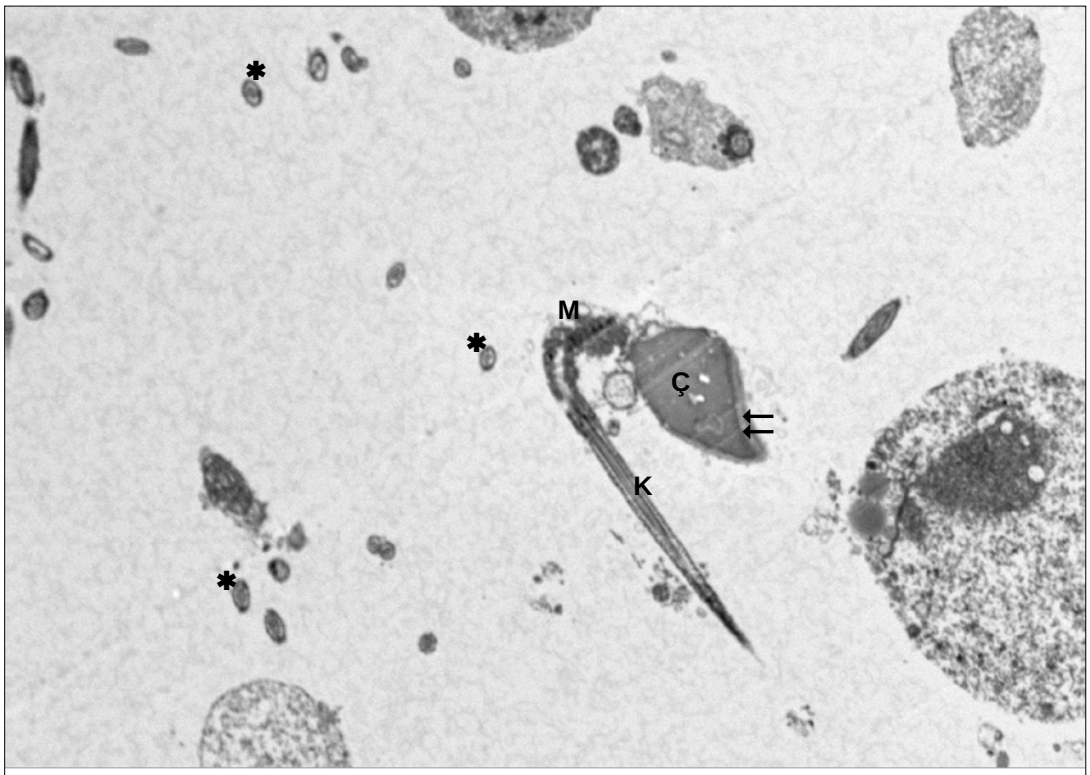
Şekil 24 a-d: İnfertil grubuna ait anormal spermiyumlar. **a:** büyükbaş anomalisi, **b:** Uzamış baş anomalisi **c:** Bend anomalisi **d:** Boyunda sitoplazmik droplet (Spermac boyama, X1000).

4.2. Transmission Elektron Mikroskopik (TEM) Bulgular

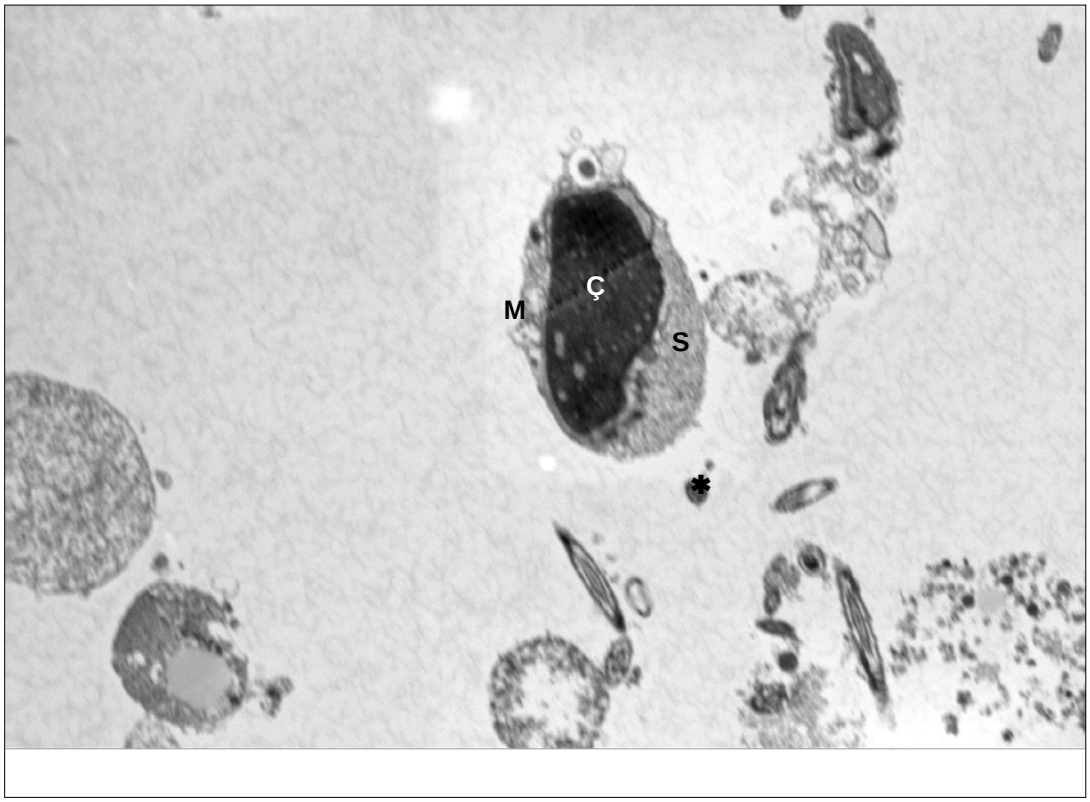
4.2.1. Fertil Grubu TEM Bulguları

4.2.1.a. Normospermi Sham Grubu TEM Bulguları

Normospermi sham grubu, hiçbir işlem yapılmamış spermlerin elektron mikroskobik incelenmesinde; Spermiyum baş, boyun ve kuyruk bölgeleriyle normal yapıda izlendi. Çekirdek hücre başının büyük bir kısmını kaplıyordu. Akrozom bölgesi belirgin, mitokondriyal kılıf ve kuyruktaki mikrotubül organizasyonu normal yapıda izlendi. Yer yer enine geçmiş kesitlerde çekirdek, çekirdek çevresi sitoplazma akrozomun küçük bir alanı ile mitokondriyal kılıfa ait mitokondriyonlar belirlendi (Şekil 16-17).



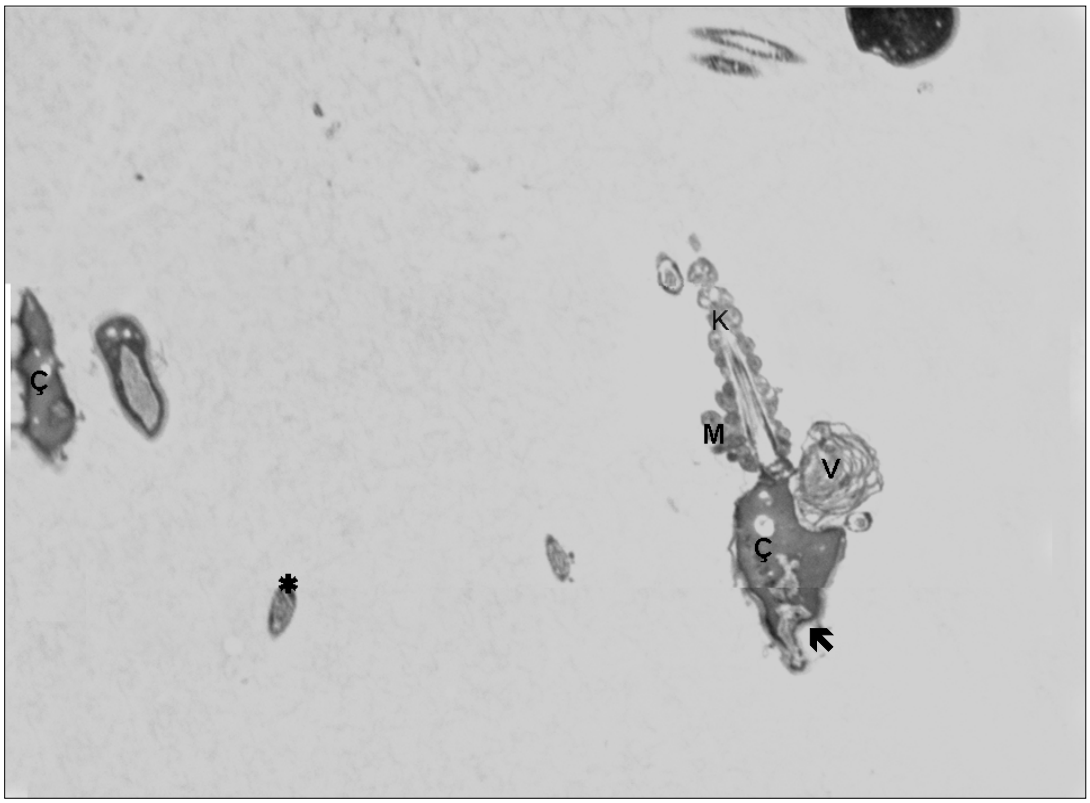
Şekil 16: Normospermi sham grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, ⇈**:** akrozom, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



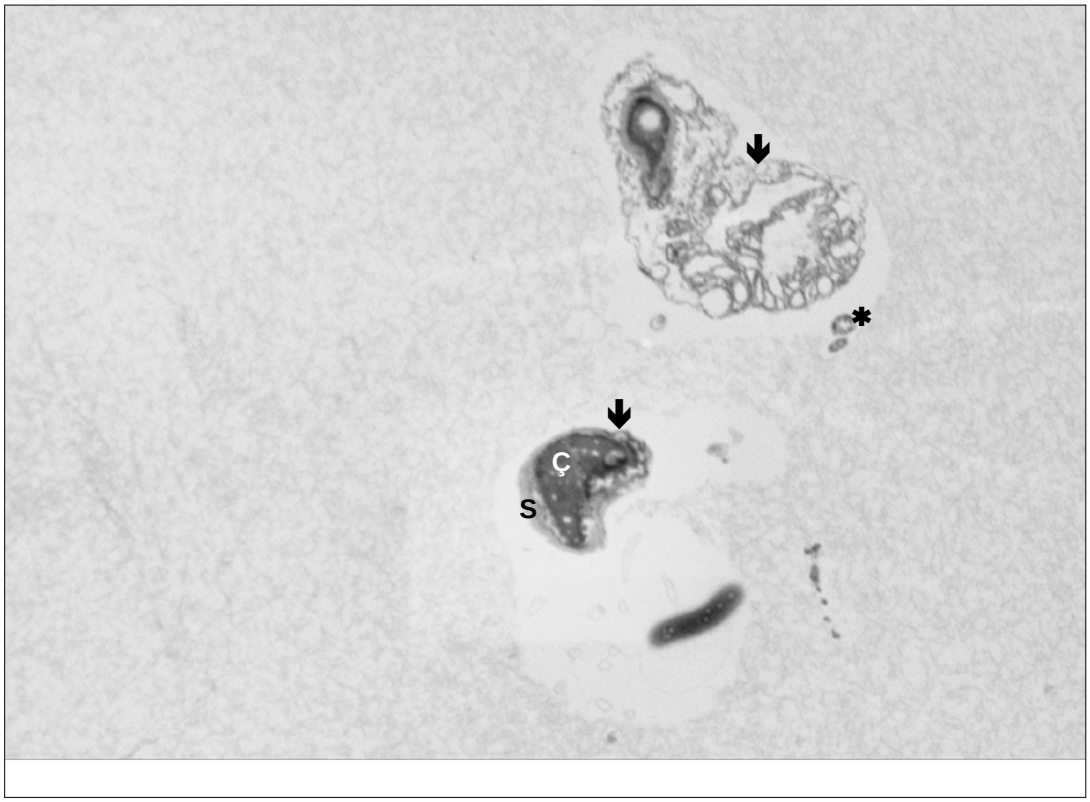
Şekil 17: Normospermi sham grubu. **Ç:** enine geçmiş kesitte spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **S:** sitoplazma, **M:** mitokondriyon, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

4.2.1.b. Normospermi HOST Grubu TEM Bulguları

Normospermik HOST uygulanan grupta; çekirdekte dejeneratif vakouler yapılar, akrozomal bleb, lameller formda residuel cisim varlığı izlendi. Yer yer akrozomun genişlediği dikkat çekiciydi (Şekil 18). Mitokondriyal kılıfa ait mitokondriyonlar ile enine ve boyuna kesitte gözlenen kuyruğun mikrotubül içeriği normal yapıdaydı. Spermatozoon baş bölgesinden geçen enine kesitlerde spermatozoon baş bölgesindeki sitoplazma içeriğinin sham grubuna göre arttığı, yer yer çekirdek zarında ayrılmalar ve sitoplazmik artıklar gibi izlenen içi boş hatların şekillendiği belirgindi (Şekil 19).



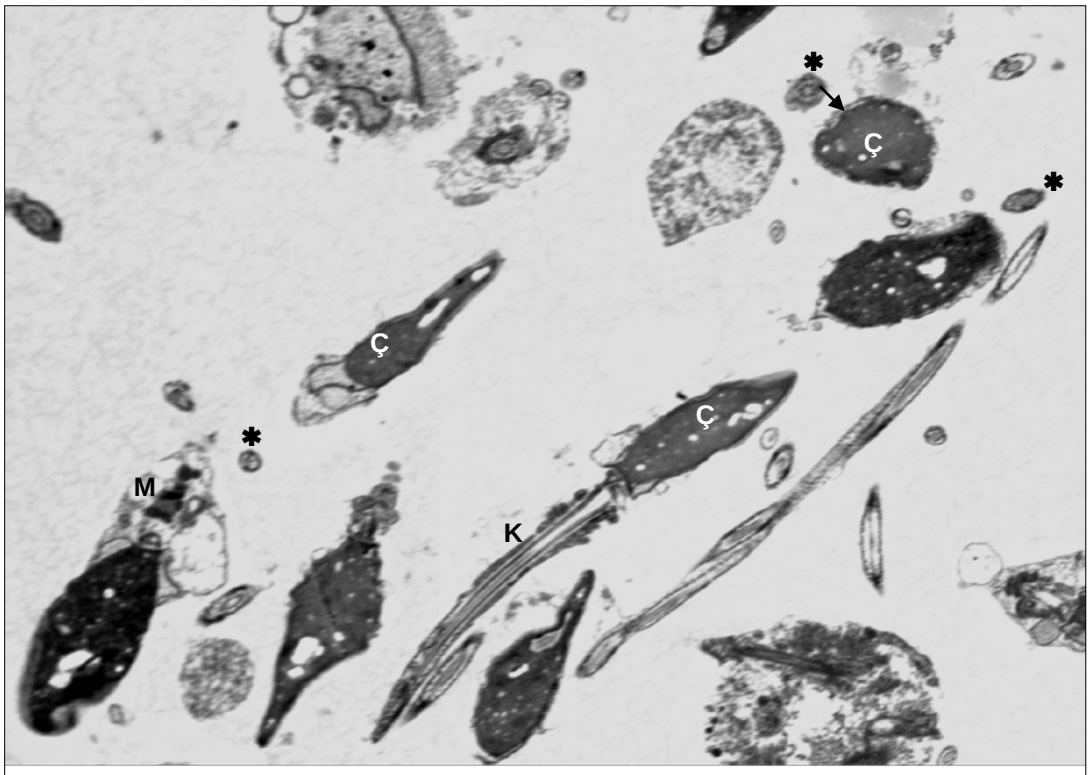
Şekil 18: Normospermi HOST grubu. **Ç:** çekirdekte dejeneratif vakouler yapılar, ➔**:** akrozomal bleb **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, **V:** lameller formda residuel cisimcik, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



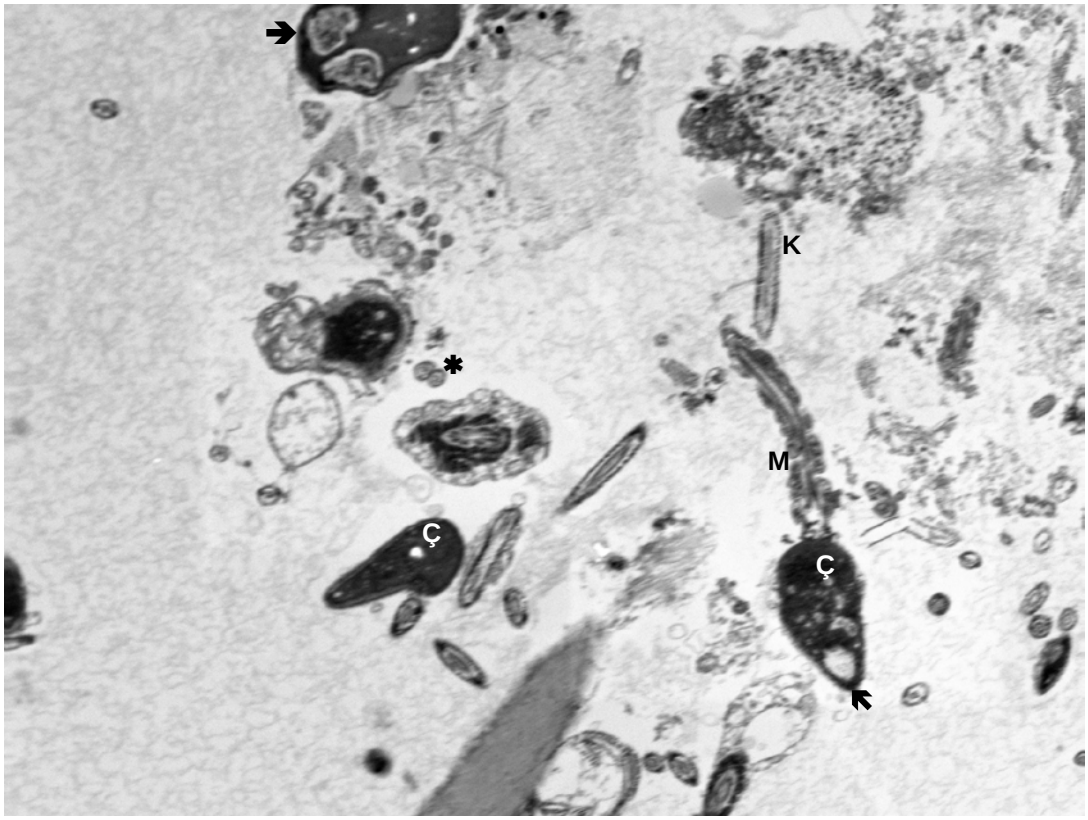
Şekil 19: Normospermi HOST grubu. **Ç:** enine geçmiş kesitte spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **S:** sitoplazma, ➧**:** sitoplazmik artıklar, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

4.2.1.c. Normospermi Anti-HOST Grubu TEM Bulguları

Fertil grubuna ait Anti-HOST uygulanan grupta; bir grup spermiyum hiçbir uygulama yapılmamış gruba benzer özellikte; normal baş ve kuyruk yapısı gösterirken bir grup spermatozoon baş bölgesinin enine ve boyuna geçen kesitlerinde özellikle akrozomda yer yer kıvrıntılı seyir olduğu dikkati çekti (Şekil 20). Bu bulgu hücrelerin hipoozmotik konsantrasyondan normal ozmotik koşullara getirilmesi sırasında hacim kaybetmelerinin sonucu akrozomda olaylanan deformasyon olarak değerlendirildi. Yer yer boyun bölgesinde hacimsel genişliğin gözlendiği spermiyumlar dışında tüm incelenen hücrelerde genel morfoloji normal yapıya uyumluydu. Bazı alanlarda çekirdekte vakuoler dejenerasyon ve genişleme özellikle mitokondriyal kılıfın çevresindeki sitoplazmik alanda izlendi (Şekil 21).



Şekil 20: Normospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



Şekil 21: Normospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, ➔: çekirdekte vakuoler dejenerasyon, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

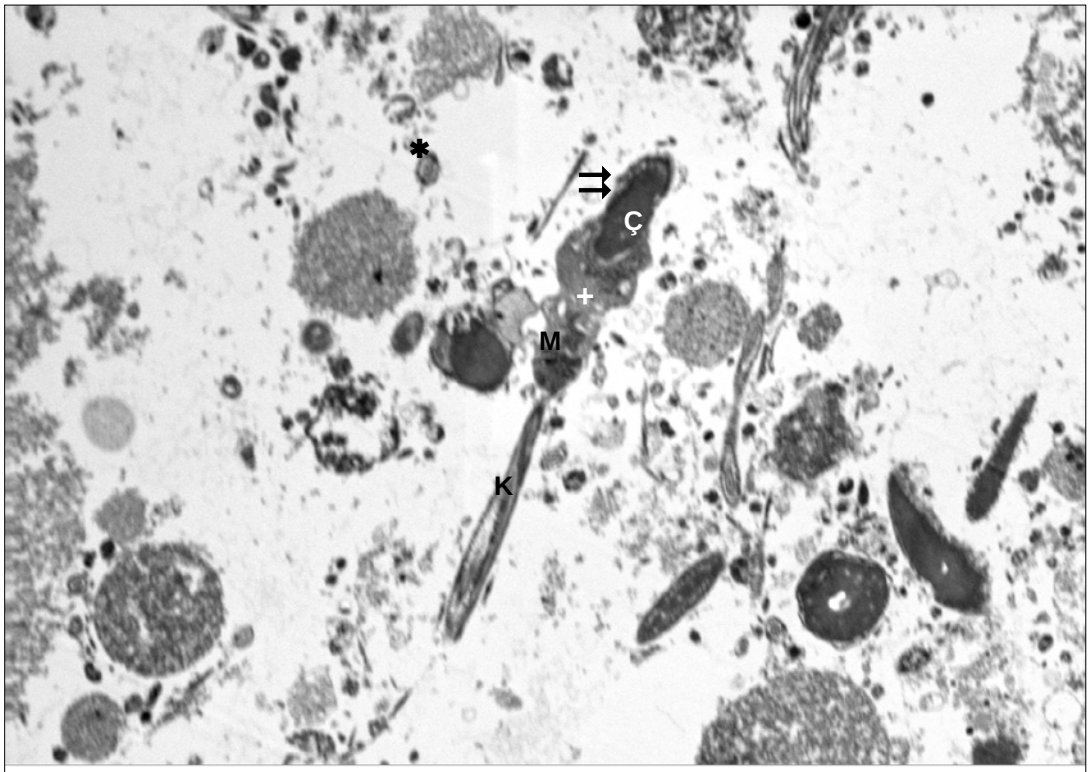
4.2.2. İnfertil Grubu TEM Bulguları

4.2.2.1.a. Oligoastonospermi Sham Grubu TEM Bulguları

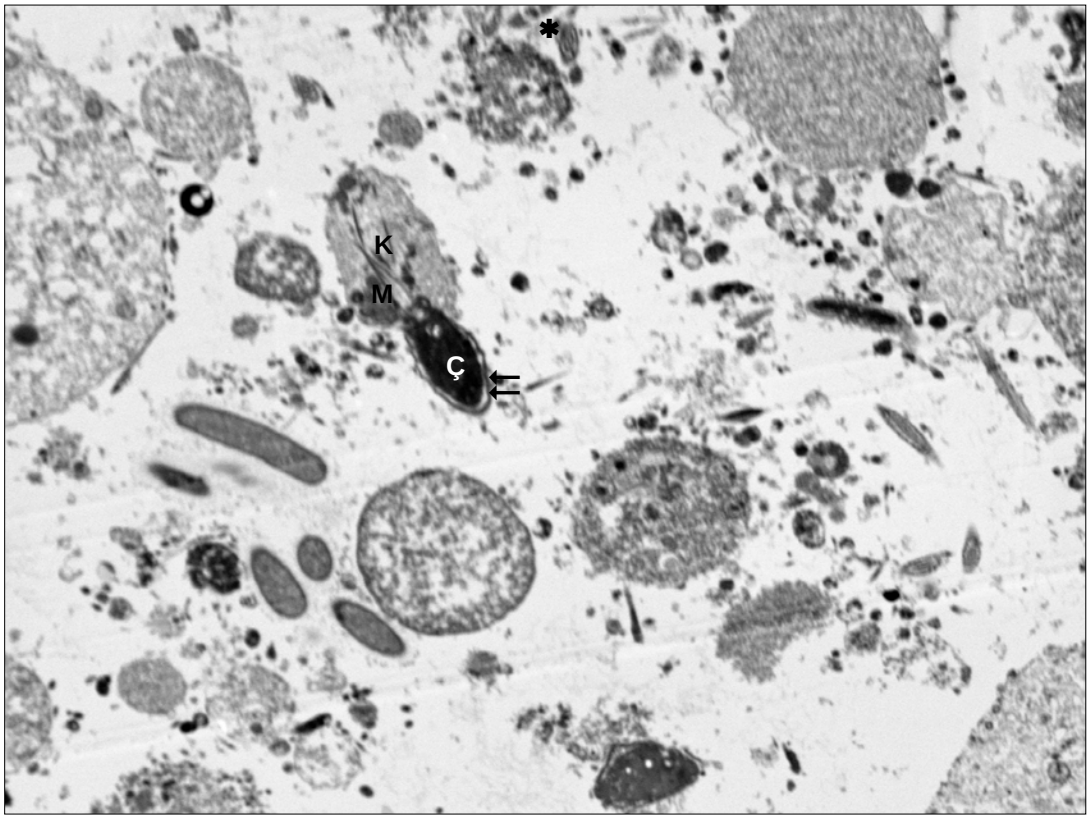
Oligoastonospermik infertil grupta hiçbir işlem uygulanmamış spermiyumların elektron mikroskobik incelenmesinde; az sayıda normal baş, boyun ve kuyruk yapısına sahip spermiyumlar ile spermiyum kuyruklarının enine geçmiş kesitlerde mikrotubül yapısı izlendi. Spermiyumların bir grubunda sitoplazmik artık içeren boyun bölgesi izlendi. Baş bölgelerine ait enine ve boyuna kesitler normal yapıda izlendi (Şekil 22-23). Boyun bölgesinde sitoplazmik artık gözlenen bir spermiyum (Şekil 24).



Şekil 22: Oligoastenospermi sham grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, **⇈:** akrozom, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



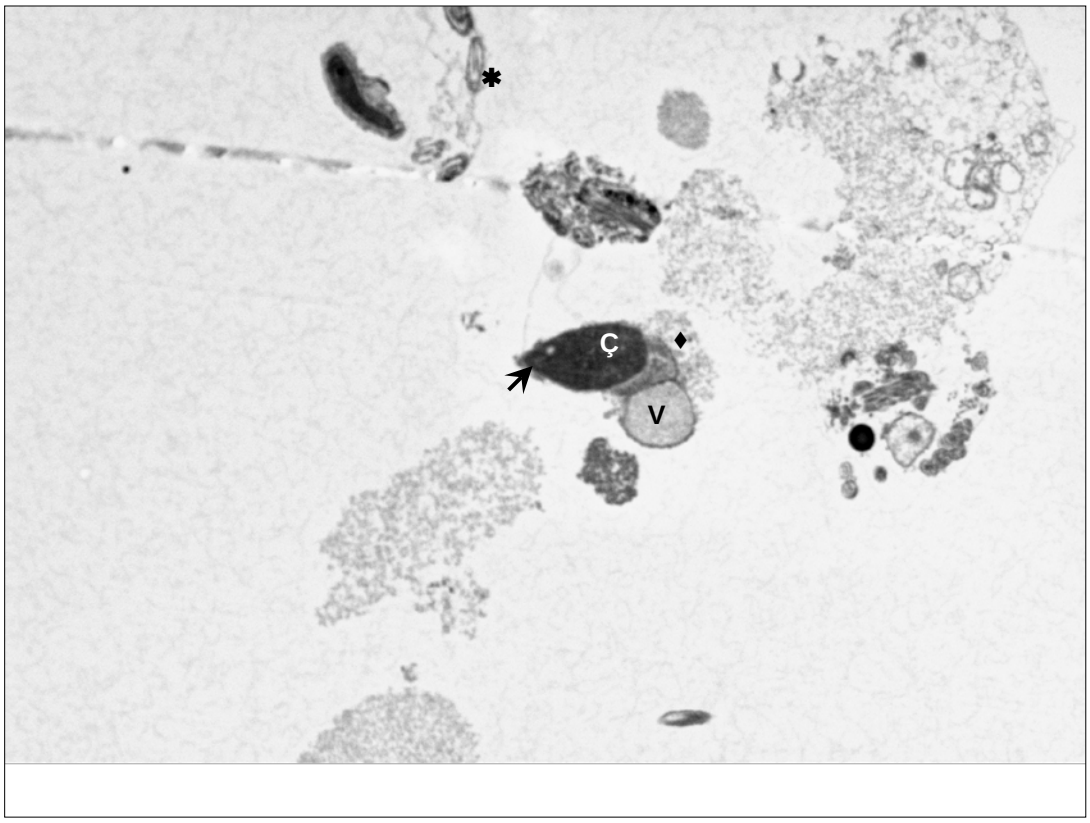
Şekil 23: Oligoastenospermi sham grubunda boyun anomalisi gözlenen bir spermiyum. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, **⇈:** akrozom, **+:** sitoplazmik artık içeren boyun bölgesi, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



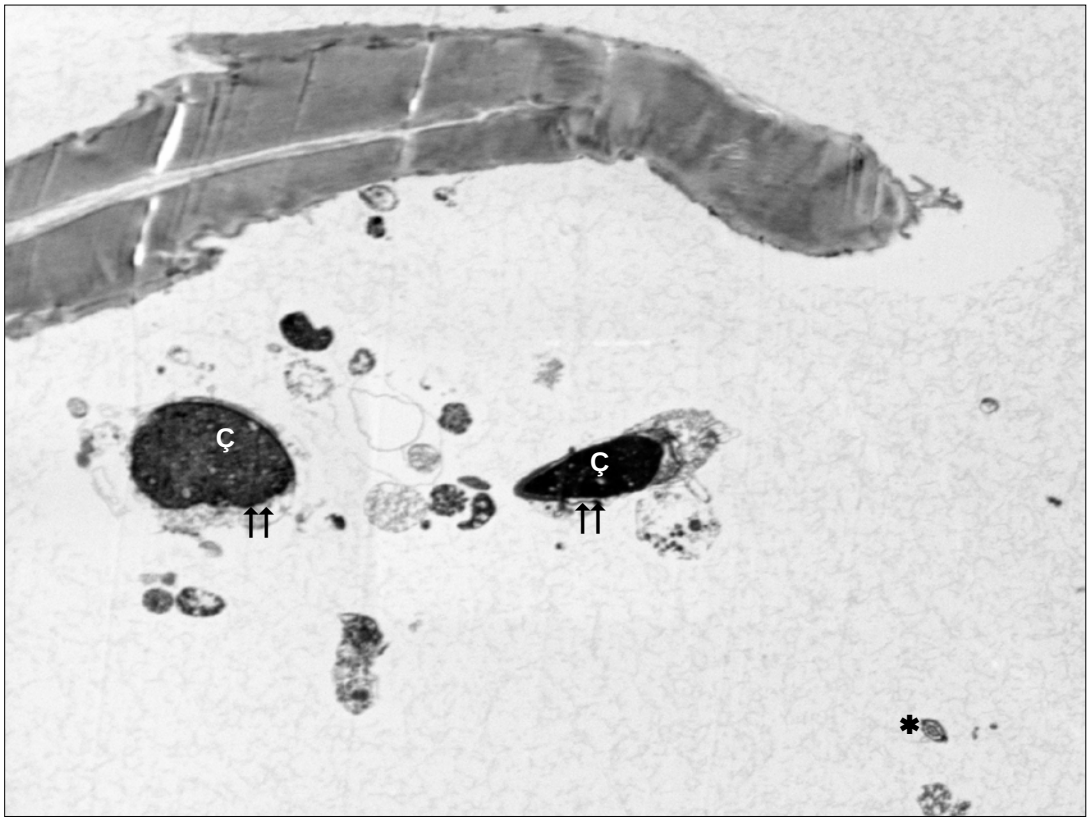
Şekil 24: Oligoastenospermi sham grubunda gözlenen bir spermiyum. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, **K:** kuyruk, **⇈:** hücre zarı, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

4.2.2.1.b. Oligoastenospermi HOST Grubu TEM Bulguları

Bu grupta HOST uygulaması sonucunda bir spermiyumda kontrol grubuna benzer olarak birleştirici parçada dejeneratif vakuoller ilgiyi çekti (Şekil 25). Enine ve boyuna geçmiş kesitlerinde spermiyum baş bölgesi incelendiğinde akrozomda yer yer bütünlüğün bozulduğu ilgiyi çekti (Şekil 26).



Şekil 25: Oligoastenospermi HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **V:** vakuolar oluşum, **♦:** şişmiş boyun bölgesi, ✱: oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



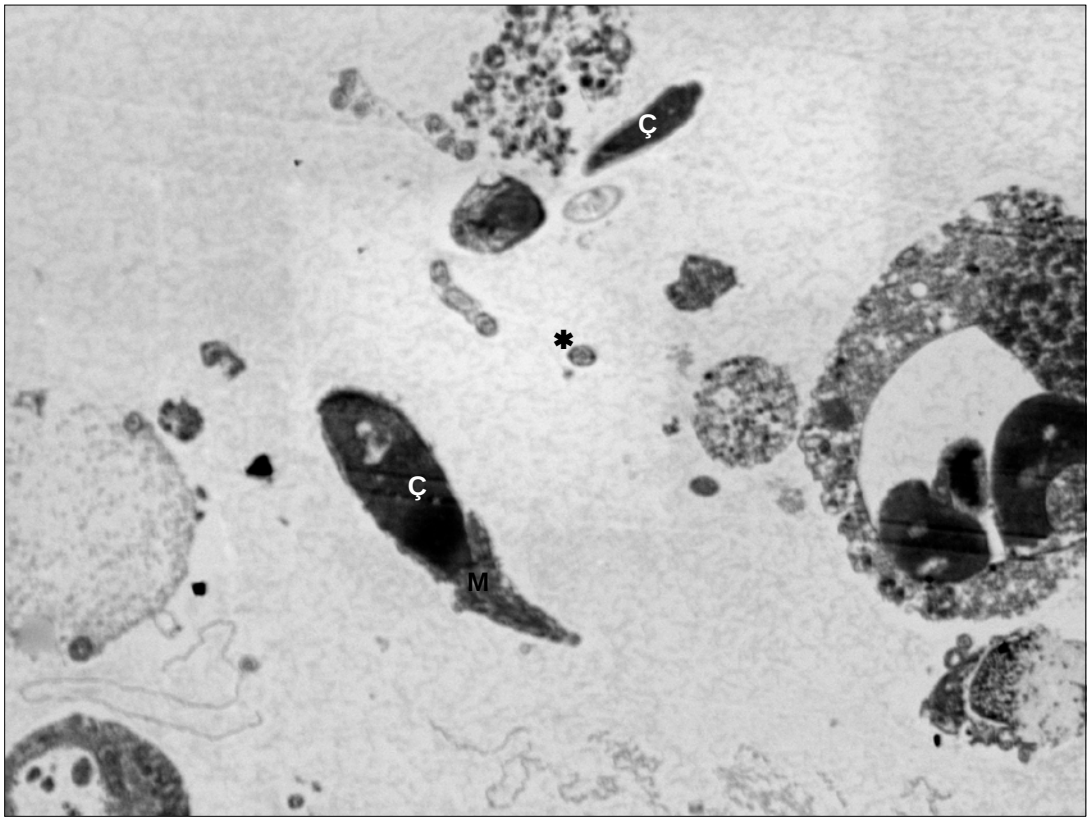
Şekil 26: Oligoastenospermi HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait enine ve boyuna kesitlerde heterokromatik çekirdek, **⇈:** sperm plazma membranı ve akrozom, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

4.2.2.1.c. Oligoastenospermi Anti-HOST Grubu TEM Bulguları

Anti-HOST uygulaması yapılan grubun spermiyumlarında, yer yer plazma membranı bölgesinde bozulmalar seçildi. Ancak sham grubundan ayrıcalıklı olarak plazma membranına ait bir ondülasyon veya deformasyon izlenmedi (Şekil 28). Bazı spermiyumlar ise sham grubuna benzer yapıdaydı. Gözlenen bu bulgular Spermatozoon inaktif olduğunu düşündürdü (Şekil 28).



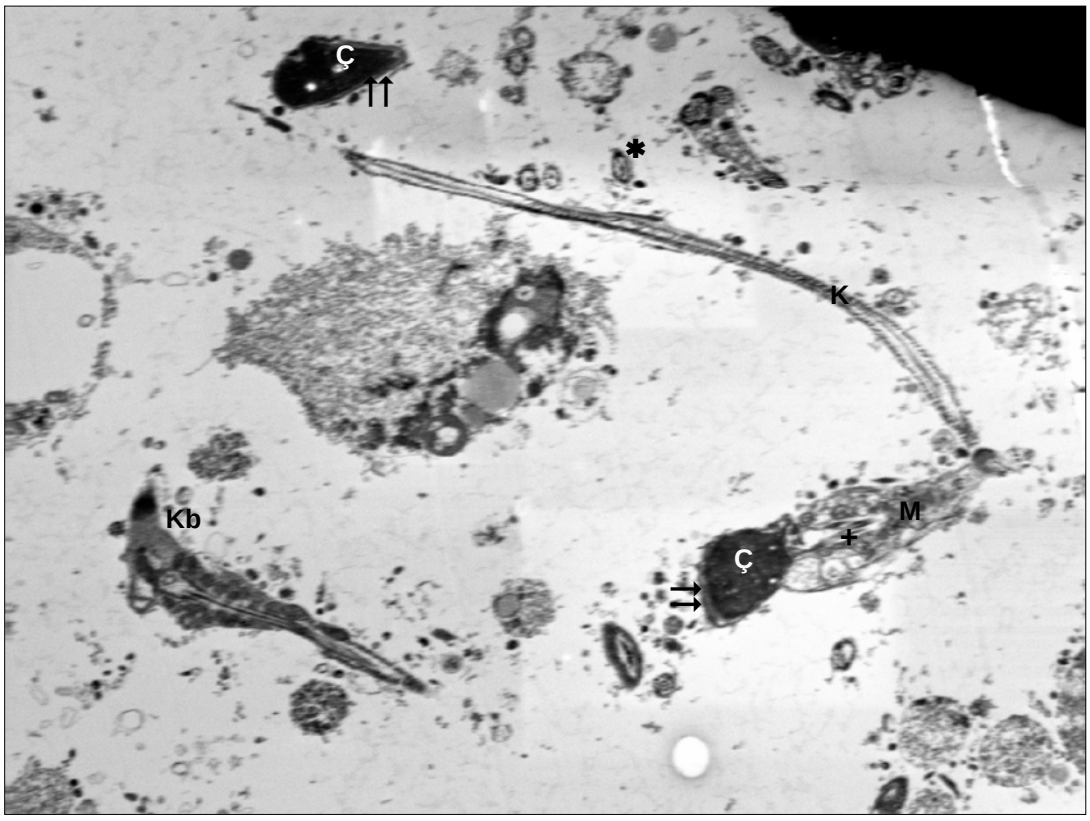
Şekil 27: Oligoastenospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma heterokromatik çekirdek ve vakuol, **⇈:** akrozom, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



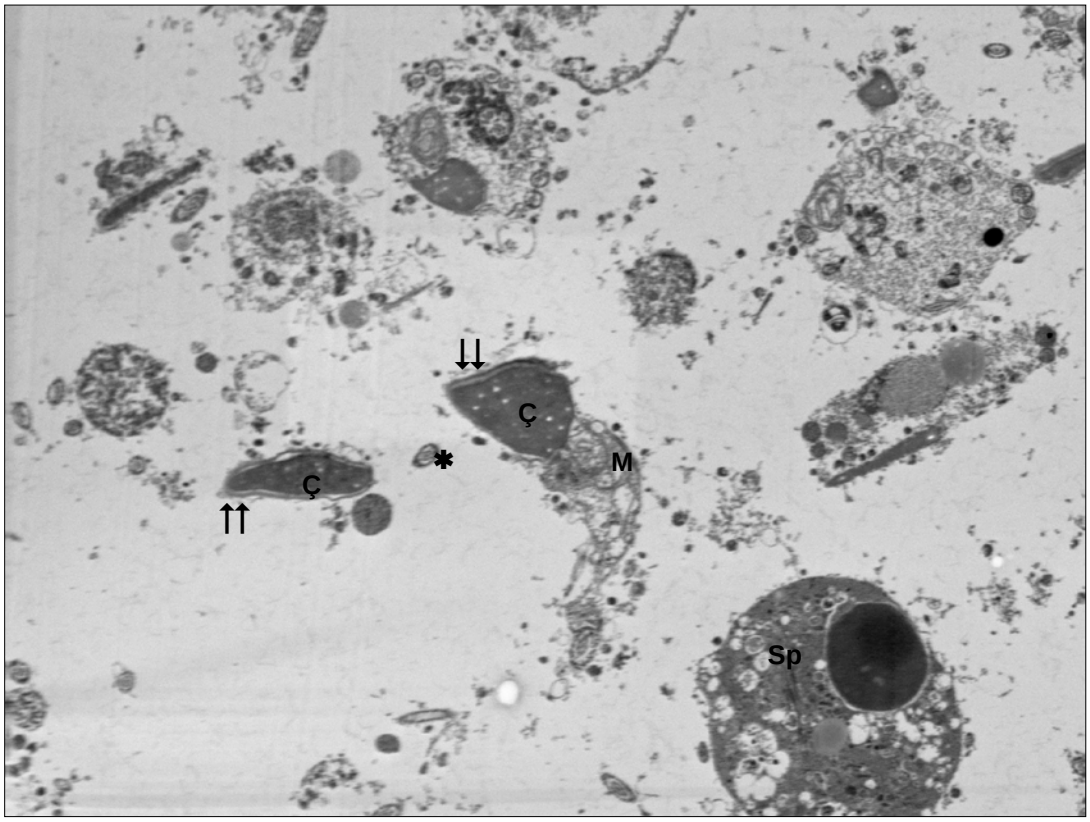
Şekil 28: Oligoastenospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **M:** mitokondriyal kılıf, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

4.2.2.2.a. Astenospermi Sham Grubu TEM Bulguları

Astenospermik infertil grubun sham gruplarının TEM incelenmesinde; gözlenebilen spermiyumların büyük çoğunluğunda değişik tipte anomaliler izlendi. Bir grup spermiyumda boyun ve mitokondriyal kılıf bölgesinin son derece kalın olduğu belirlenirken, bir grup spermiyum küçük başlarıyla ayırt edildi (Şekil 29). Bir grup spermiyumda baş bölgesinde çekirdek ve akrozom normal yapıda izlenirken kuyruk mikrotubül yapısı enine ve boyuna geçmiş kesitlerde normal olarak görüntülendi. Bu spermiyumlarda mitokondriyal kılıf gözlenirken kılıf merkezinde mikrotubül yapısı ayırt edilmedi. Bu bulgunun kesit düzlemine bağlı da olabileceği düşünüldü (Şekil 30).



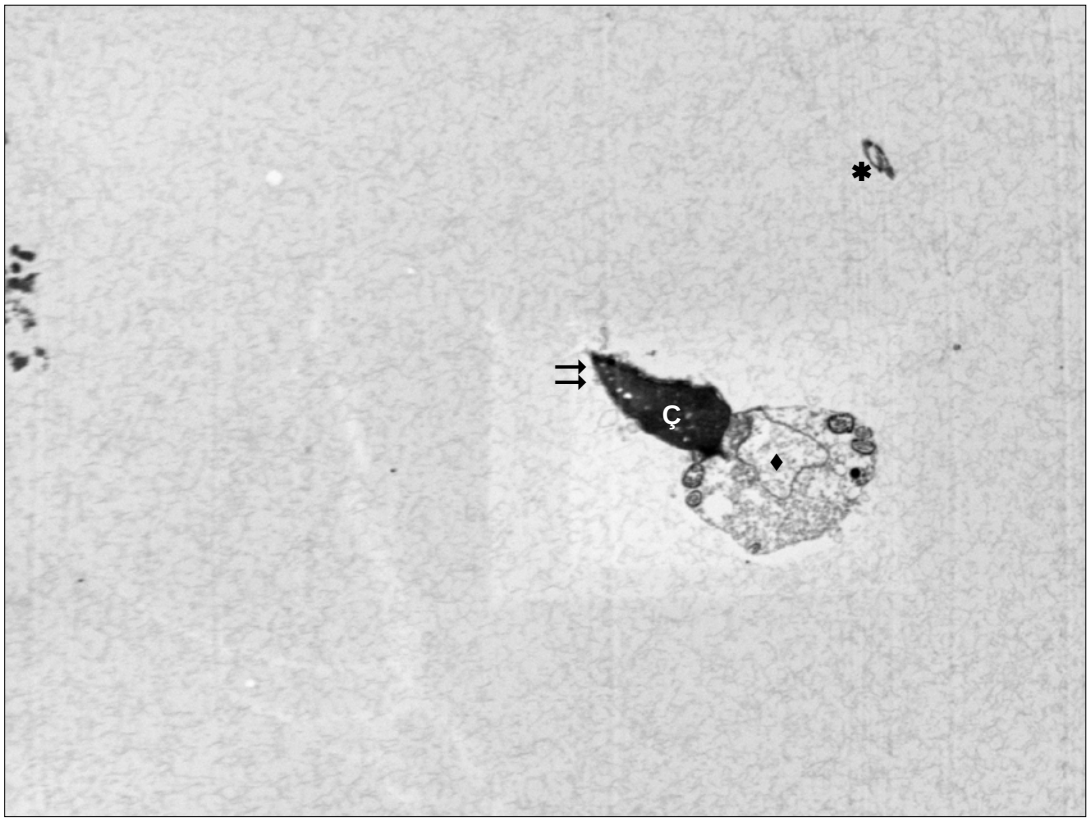
Şekil 29: Astenospermi sham grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, ⇈: sperm plazma membranı ve akrozom, **M:** mitokondriyal kılıf, +: boyun anomalisi gösteren spermiyum, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları, **Kb:** küçük başlı spermiyum (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



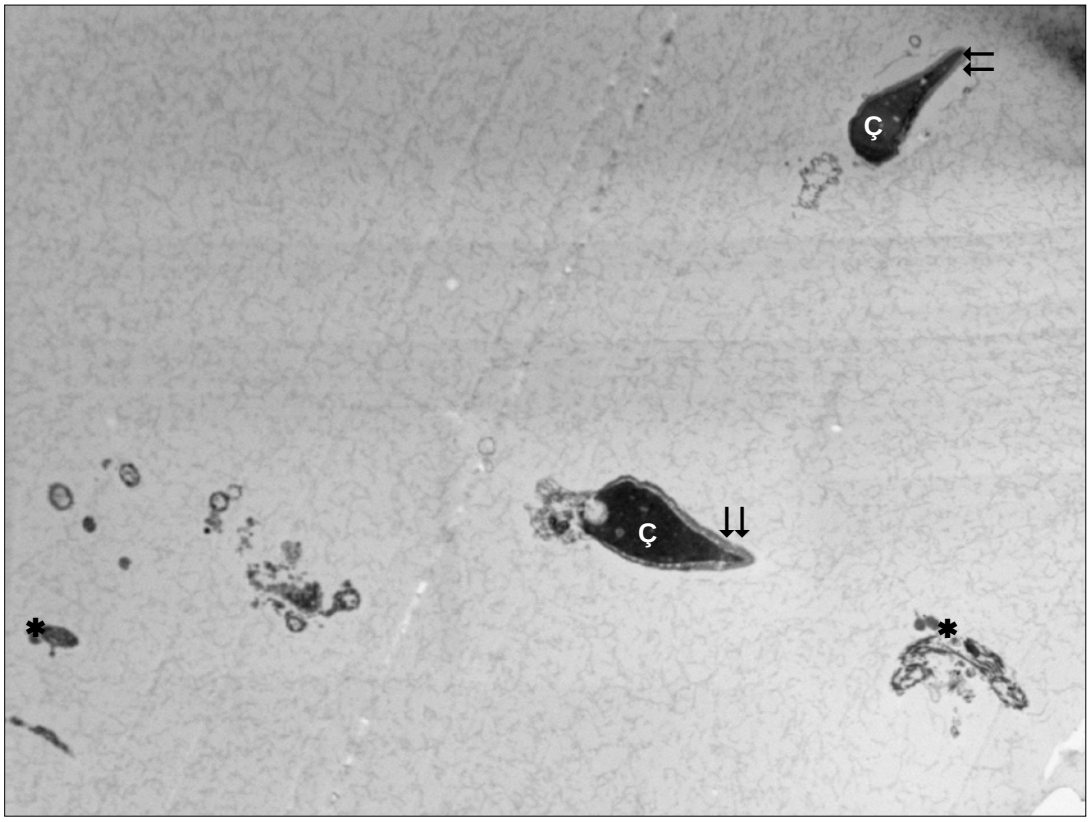
Şekil 30: Astenospermi sham grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇈:** akrozom, **M:** anormal mitokondriyal kılıf, ✱: enine geçmiş kesitte sperm kuyrukları, **Sp:** spermatid (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

4.2.2.2.b. Astenospermi HOST Grubu TEM Bulguları

HOST uygulaması yapılan astenospermik grupta diğer gruplardan ayrıcalıklı olarak HOST' tan en belirgin etkilenen bölgenin boyun bölgesi olduğu dikkat çekti. Bu bölgede şişme belirgindi (Şekil 31). Kuyruk yapısı izlenemeyen bir grup spermiyumda ise akrozomun hiçbir işlem yapılmamış sperm grubuna göre oldukça belirginleştiği ilgi çekiciydi (Şekil 32).



Şekil 31: Astenospermi HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, ⇈**:** akrozom, ♦**:** şişmiş boyun bölgesi, ✱: oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



Şekil 32: Astenospermi HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇈:** sperm plazma membranı, ✱: enine ve oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları, (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

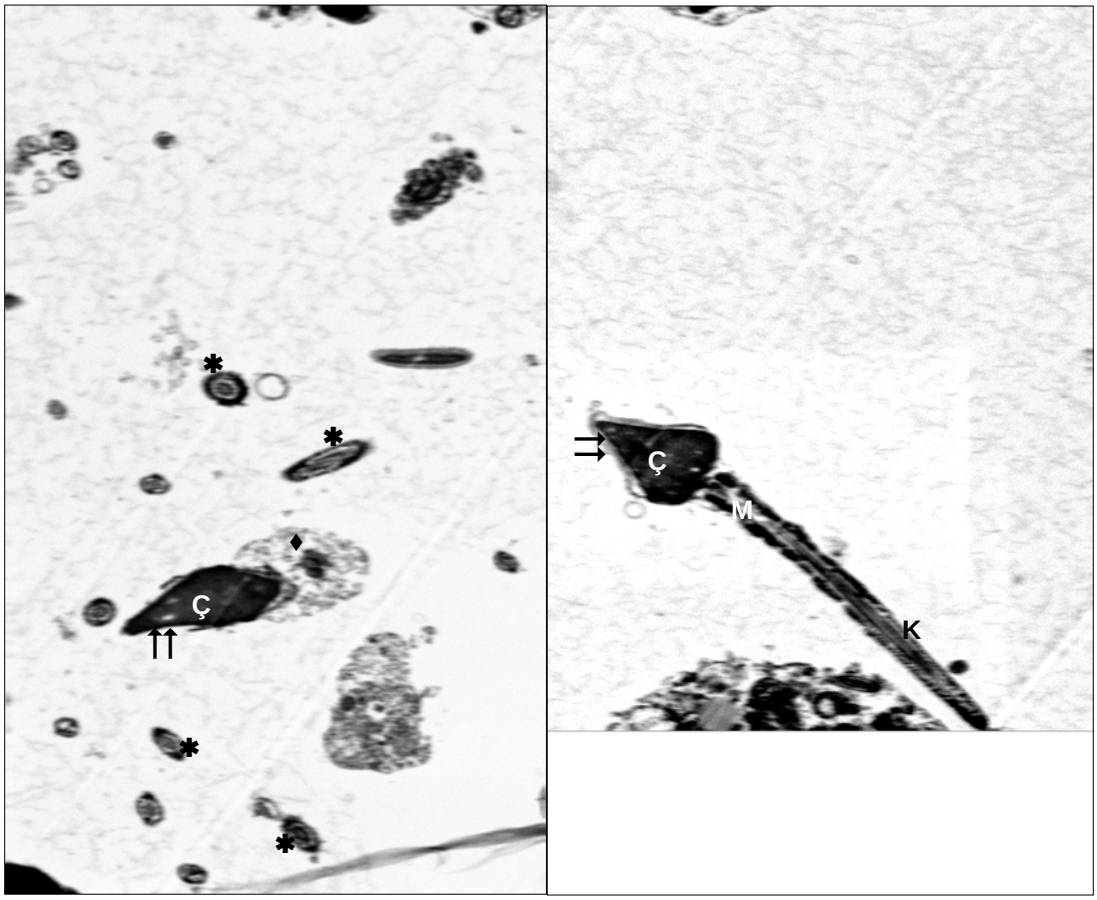
4.2.2.2.c. Astenospermi Anti-HOST Grubu TEM Bulguları

Anti-HOST uygulanan grupta bir grup spermiyum baş, boyun ve kuyruk yapılarıyla gözlenebilirken bu grup spermatozoon plazma membranlarında yer yer kıvrıntılı seyir dikkati çekti.

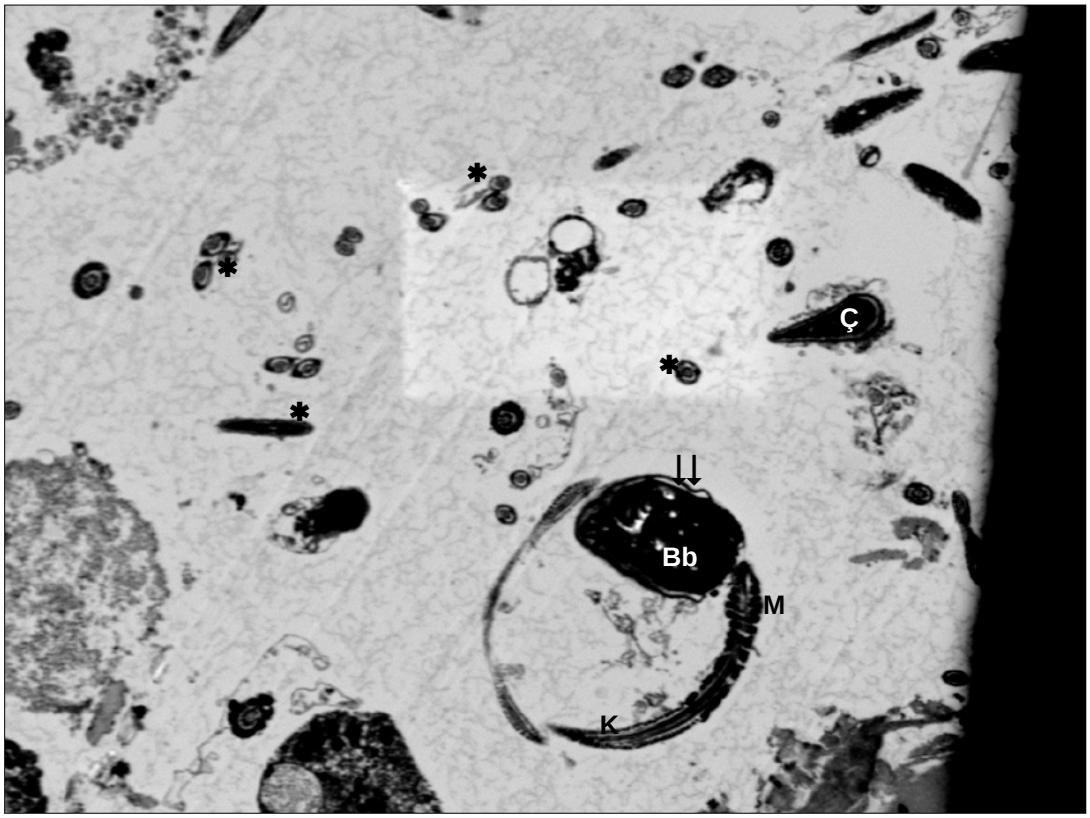
Bu bulgu 1. ve 2. grup bulgularıyla eşleşti. Ayırt edici bir bulgu olarak Anti-HOST grubunda boyun bölgesinin halen daha normale dönmediği, hacimsel genişliğini kısmen de olsa koruduğu dikkati çekti.

Bu gruptaki elektron mikroskobik incelemede az sayıda iri başlı ve kıvrık kuyruklu spermiyumlar da gözlendi. Bu tür spermiyumlarda boyun bölgesi mitokondriyal kılıf ve kuyruk normal yapısında izlenirken baş bölgesinde akrozomun yer yer genişliğini koruduğunu ve bu bölgelerde hücre zarında da ondulalı seyir olduğu dikkati çekti (Şekil 33-34).

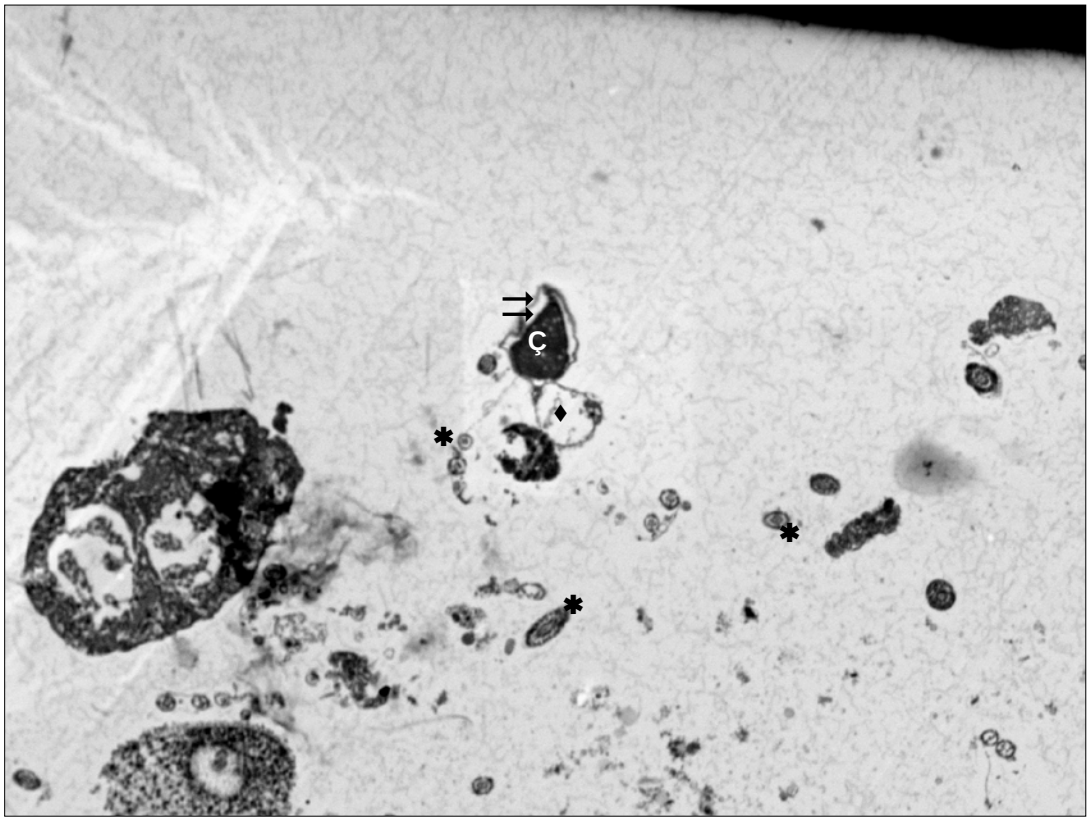
Bir grup spermiyum ise baş bölgesinde geri dönüşün hiç gerçekleşmediği, aksine akrozomda HOST grubuna göre daha belirgin dilatasyon olduğu ilgiyi çekti. Bu tip spermiyumların boyun bölgesinde yaygın dejeneratif değeişiklikler dikkat çekti (Şekil 35).



Şekil 33: Astenospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇑:** sperm plazma membranı ve akrozom, **M:** mitokondriyon, **♦:** boyun bölgesinde dejeneratif değeişiklikler, **✱**: enine ve oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları, (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



Şekil 34: Astenospermi Anti-HOST grubu. **Ç:** spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **Bb:** büyük başlı spermiyum, **⇈:** sperm plazma membranı, **M:** mitokondriyal kılıf, ✱: enine ve oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları, (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).



Şekil 35: Astenospermi Anti-HOST grubu. **Ç**: spermiyuma ait heterokromatik çekirdek, **⇈:** belirgin sperm plazma membranı, **♦:** boyun bölgesinde dejeneratif değeişiklikler, **✱**: enine ve oblik geçmiş kesitte sperm kuyrukları, (Uranil asetat-Kurşun sitrat, X10000).

Çalışmamızda, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Diyarbakır Devlet Hastanesi androloji laboratuarına infertilite şikayetiyle başvuran erkek bireylerden alınan semen örnekleri kullanıldı. 29 adet infertil, 10 adet fertil bireyin semen analizleri yapıldı. Makroskobik bulgular kaydedildikten sonra mikroskobik analizlere geçildi. HOST ve Anti-HOST uygulandı. Çalışmaya katılan bireylerin gruplara dağılımı Tablo 4' de gösterilmiştir.

Tablo 12: Gruplar arası ilişkiler.

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Grup	1,00	infertil	29
	2,00	fertil	10
Altgrup	1	oligospermi	12
	2	Astenspermi	9
	3	Oligoastenospermi	8
	4	Kontrol	10

Fertil ve infertil gruplar arasındaki ortalama, ortalamanın standart hatası (**X± Sd**) ve p korelasyonları Tablo 5' de gösterilmiştir. Bu verilere dayanarak fertil ve infertil gruplar arasında motilite yüzdesi, ml' deki konsantrasyon, Eozin Y, HOST ve Anti-HOST bulguları önemli bulundu. Önemlilik ifadesi için, * , P=0,05, ** ise P=0,001 için kullanıldı.

Motilite p <0,001, Morfoloji p <0,000, Konsantrasyon (milyon) p <0,001, Eozin Y p <0,025, HOST p <0,002, Anti-HOST p <0,003 değerleri bulunmuştur.

Tablo 13: Tanımlayıcı istatistikler. Fertil ve infertil bireylere ait Pearson Korelasyon Analizi

Değişkenler	**Gruplar**	**N**	**X+ Sd**	**P**
motiliteY	infertil	29	,5174 ± ,18442	,001
	fertil	10	,7541 ± ,14695	
morfoloji	infertil	29	,0359 ± ,03531	,000
	fertil	10	,1430 ± ,05889	
Konsml	infertil	29	18,89 ± 17,390	,001
	fertil	10	75,90 ± 39,155	
Eozin Y	infertil	29	,5631 ± ,16018	,025
	fertil	10	,7000 ± ,14825	
HOST	infertil	29	60,17 ± 12,752	,002
	fertil	10	73,40 ± 9,064	
AHOST	infertil	29	61,103 ± 14,9704	,003
	fertil	10	72,400 ± 6,9554	

X: Ortalama, Sd: Standart sapma, P: Pearson katsayısı.

Tablo 14: Grup arasındaki korelasyonlar (Pearson Korelasyon Analizi).

İnfertil	**Fertil**	**P**
	$r_{(Motilite, Konst)} = -0,72$	0.006
	$r_{(Eozin Y, HOST)} = 0,79$	0.003
	$r_{(Eozin Y, AntiHOST)} = 0,82$	0,003
	$r_{(Host, AntiHOST)} = 0,80$	0.005
$r_{(Motilite, HOST)} = 0,43$		0,02
$r_{(motilite, AntiHOST)} = 0,47$		0,01
$r_{(Eozin Y, HOST)} = 0,75$		0,000
$r_{(Eozin Y, AntiHOST)} = 0,69$		0,000
$r_{(HOST, AntiHOST)} = 0,85$		0,000

5. TARTIŞMA

Günümüzde spermanın analizi amacıyla kullanılan, konsantrasyon, total spermatozoa sayısı, motilite ve morfoloji kriterleri fertilitenin indikatörleri olarak önemli sınırlamalara sahiplerdir ve bu testlerin daha güvenilir olabilmeleri için geliştirilmeleri gerekmektedir (16). Yardımcı üreme tekniklerinin yaygınlaşması ile infertilite nedenleri daha çok araştırılmakta ve fertilizasyonda önemli rolü olan spermiyumun fonksiyonel membran bütünlüğünün önem kazandığı konusunda birçok çalışmada bulunmaktadır.

Jeyandran ve ark. 1984 yılında yaptıkları faz kontrast mikroskop ile HOST uygulanan spermiyumları incelemişlerdir. Spermiyumlardaki değişiklikler ilk 30 dakikada şekillenmiş. Kuyruğun HOST' a olan ilk tepkisi, tepesinde veya orta kısım ile olan birleşmesinde meydana gelen hafif bir şekilde genişlediğini, daha sonra ise, değişimlerin kuyruk başlangıcında şişmiş bir alanın varlığı, kuyruğun kıl ucu eğriliği, kısalmış ve kalınlaşmış kuyruk veya kıvrılmış kuyruğu kısmen ya da tamamen kaplayan şişmiş bir bölge ile karakterize olduğunu izlemişler (9). Bizde çalışmamızda HOST ve Anti-HOST uyguladığımız spermiyumları faz kontrast mikroskopla incelediğimizde benzer bulgular saptarken, Anti-HOST uygulanan spermiyumlarda motilitede artış gözledik.

HOST; zar bütünlüğünü biyokimyasal olarak tespit ederken, Eozin Y membrana bağlanarak (Schrade ve arkadaşları, 1983) membran bütünlüğünü fiziksel olarak belirler. Fiziksel olarak bozulmaya maruz kalan membran şişmeyecektir. Fiziksel olarak sağlam görünen bir membran biyokimyasal olarak bütün olmayabilir. Bundan dolayı, yapılan çalışmalarda, HOST ile Eozin Y sadece kısmi olarak birbirleri ile korale bulunmuşlardır (r=0,52) (9). Ayrıca, bir spermatozoonun motil olabilmesi içini, membranlarının biyokimyasal olarak bütün olması gerekir (16). Biz çalışmamızın infertil vakalarında HOST ile Eozin Y arasında (r=0,75) korelasyon saptadık.

Motilite, ölü-canlı spermiyum oranı, anormal spermiyum oranı ve spermiyum yoğunluğu gibi standart parametreler üzerinden gerçekleştirilen spermatolojik muayene yöntemleri çoğu kez bir ejakülatın fertilite düzeyinin önceden belirlenmesi amacıyla yeterli sonuçlar vermez (7). Spermiyum plazma membranı akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon gibi hayati öneme sahip fizyolojik olaylar dışında

fertilizasyon olgusunun şekillenmesi sırasında da aktif olarak sürece katılır ve oosit plazma membranı ile spermiyum membranı arasında füzyon sağlanması gibi bazı önemli fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumludur (57). Son yıllarda Spermatozoon membran bütünlüğünün ve fonksiyonun önemi nedeniyle daha detaylı yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (8).

Supravital boyalar spermiyum plazma membranın fiziksel olarak sağlam olduğunu gösterir. Fiziksel olarak sağlam ancak biyokimyasal olarak inaktif olan plazma membranı fertilizasyonu sağlamada yetersizdir. Hücre membranının biyokimyasal aktivitesi hakkında fikir vermesi nedeniyle HOST supravital boyalara tercih edilir (58). HOST testi neticesinde kuyruk plazma membranı sağlam olan spermiyumların muhtemelen baş plazma membranının da sağlam olabileceği kanısına (14) rağmen HOST değerleri sınırda olan ejakülatlarda supravital boyalar ile HOST' un birleştirilmesi hatalı pozitif sonuçları azaltarak daha doğru bir tahmin olanağı sunmaktadır (58). Bu iki yöntemin birleştirilerek kullanılmasını ve böylelikle de aynı spermiyum üzerinde ve aynı anda hem baş hem de kuyruk membranlarının durumunun belirlenmesinin yararlarını bildiren çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (58,59,60). Ancak supravital boyalar kullanılınca spermiyum IVF' te kullanılamamaktadır.

Spermiyum membranının fonksiyonel bütünlüğünün; akrozom reaksiyonu, kapasitasyonu, metabolizması ve ovum yüzeyine bağlanması olaylarında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır.

Fertil ve infertil (oligospermi, oligoastenospermi, astenospermi) grubundaki hastaların tümüne standart spermiyogram, HOST ve Anti-HOST işlemleri uygulanarak elektron mikroskobu için tüm gruplardan materyaller alındı.

Literatür araştırmasında HOST uygulamasını takiben oluşan spermiyum kuyruk kıvrılmaları, çeşitli araştırıcılar tarafından, farklı şekillerde tiplendirilmiştir. Çalışmamızda fertil ve infertil gurupta HOST uygulamasını takiben yapılan faz kontrast mikroskobik incelemelerde ise; spermiyumların baş, boyun ve kuyruk bölgelerinde şişme tespit edilmiştir. Bu bulgularımız ışığında HOST sonrası morfolojik tiplendirme yapmadığımız halde en çok şişmenin spermiyum kuyruk bölgelerinde olduğu gözlerken (9,10,15,16,50,53,61) baş ve boyun bölgelerinde ise, HOST sonrası daha az morfolojik değişimler gözlenmekteydi (16). Bu bulgularımız

daha önceki literatürlerle örtüşmekteydi.

Yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT), son yıllarda erkek infertilitesine yönelik olarak yapılan uygulamalarda HOST yöntemi kullanılmaya başlanmıştır (15). Çalışmamız öncelikli olarak spermiyum membran bütünlüğü araştırmak amacıyla yapılmış, yeni bir yöntem olarak Anti-HOST uygulaması kullanılmıştır. HOST uygulamasının amacı, ICSI de kullanılacak olan spermiyum seçiminde, spermiyumun fonksiyonel bütünlüğünün değerlendirilmesidir. HOST uyguladıktan sonra, şişen spermiyumların, baş, boyun ve kuyruk bölgeleri morfolojik olarak incelenerek, en iyi morfolojiye sahip spermiyum seçilerek ICSI' da kullanılmaktadır (62-66). Bu uygulamalar çeşitli araştırmacılar tarafından da araştırılmış ve fertilizasyon şansını artırdığını bildirmişlerdir.

HOST uygulamasının spermiyumlarda ozmotik strese neden olarak, yapısal ve fizyolojik değişikliklere neden olup olmadığını düşündürmektedir (67,68). Fretilizasyon şansını arttırabilmek, en iyi ve sağlıklı spermiyumu seçebilmek için uygulanan HOST acaba bazı olgularda zararlı etkiler göstererek, fertilizasyon şansını azaltmakta mıdır diye düşündürmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda Anti-HOST diye adlandırdığımız bir uygulama tarafımızdan geliştirilerek HOST sonrası spermiyumlara uygulanmıştır. Anti-HOST sonrası spermiyumların, HOST öncesi fizyolojik ve morfolojik özelliklerini koruyup korumadığı incelenmiştir. Bu düşüncelerimiz başka bilim adamlarınca da dile getirmişlerdir.

Çalışmamızdaki bulgular özellikle Astenozospermisi olan infertil erkeklerde, HOST sonrası kullanılacak olan bir Anti-HOST mediyumunun, sağlıklı spermiyumların seçilmesinde, klinisyenlere faydalı olacağını desteklemektedir.

Yaptığımız incelemede HOST' un neden olduğu membran ve kuyruk değişikliklerinin Anti-HOST sonrası normospermik ve oligoastenospermik gurupta spermiyumların HOST öncesi görünümlerine yakın olduğu; ancak astenospermi gurubunda HOST sonrasında meydana gelen dejenaratif değişikliklerin, Anti-HOST sonrasında da devam ettiği gözlenmiştir.

Gruplara ait verilerin istatistiksel olarak incelenmesinde; tüm gruplarda HOST sonrası, Anti-HOST uygulanan spermiyumlarda, spermiyum motilitesinin HOST grubundan daha yüksek olduğu saptanmıştır.

HOST sperm immobilizasyonunu ve spermiyum seçiminde kolaylık sağladığı

için, şişmiş ve immobil spermiyumlar embriyologlar tarafından ICSI uygulamalarında kullanılmaktadır (69-71).

Çalışmamızda Anti-HOST uygulanan spermiyumlarda HOST sonrasındakinden daha fazla sayıda hareketli spermiyum saptanması çarpıcı bir bulgu olarak tespit edilmiştir. Bu özellik fertilizasyon şansını artırmak amacıyla, Anti-HOST uygulamasının kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ancak bu konuda da yeni ve daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

HOST uygulanmayan tüm gruplardaki sperm morfolojisine ait elektron mikroskopik bulgular, bu konuda daha önce yapılmış olan çalışmalar ile uyumluluk göstermekteydi (72,73).

HOST uygulanan gurupların TEM ile yapılan incelemelerinde ise HOST sonrası özellikle spermatozoon akrozamal bölgesinde vakuol oluşumu dikkat çekici bir bulgu olarak tespit edilmiştir. Ayrıca spermiyum membranında da yer yer dejenerasyonlar olduğu gözlenmiştir. HOST grubundaki elektron mikroskopik düzeyinde elde edilen diğer bulgular olan spermiyum baş ve boyun bölgelerinde oluşan morfolojik değişikliklerin literatürlerde daha önce bildirilen değişikliklerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (72,73).

HOST en çok astenospermik hastalarda uygulanmaktadır. Bu hastalarda sperm seçiminde, HOST uygulandıktan sonra, Anti-HOST kullanımı sonucu yaptığımız çalışmada, TEM ile spermium membran bütünlüğünün korunmadığını izledik. Bu bulgular doğrultusunda yapılan literatür araştırmalarında bu konuyla ilgili elektron mikroskopik herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Bu bağlamda, bulgularımızdan yola çıkarak bu konuyla ilgili (HOST ve Anti-HOST) elektron mikroskopik yeni ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

İnfertil grupta sperm canlılığının değerlendirilmesinde; Eozin Y ve HOST karşılaştırıldığında Pearson korelasyon analiziyle iki uygulama arasında istatistiksel olarak %75 oranında ($r = 0,75$, $p < 0,000$), Eozin Y ve Anti-HOST arasında %69 ($p < 0,000$), HOST ve Anti-HOST arasında ise %85 ($p < 0,000$) pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır.

Bu bulgular uygulamaya yeni katmaya çalıştığımız Anti-HOST' un Eozin Y ve HOST' u destekleyen bir teknik olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

HOST sonrası seçilen spermiyumlara uygulanacak olan Anti-HOST ile daha

sağlıklı spermiyumlar seçilerek, fertilizasyon şansı artırılabilecektir. Çalışmamızda Anti-HOST olarak isotonik bir medium olan Pure Sperm Wash mediumu kullanılmıştır. Bu medium sperm yıkamada ve seçiminde kullanılmaktadır. Bu nedenle metodumuzu ICSI' da ekstra bir tedavi masrafına neden olmayarak, kullanışlı ve ekonomik bir yöntem olarak değerlendirmekteyiz.

Çalışmamız ICSI uygulamalarına bir yenilik katmak amacıyla Anti-HOST yöntemi planlanmış ve uygulanmıştır. HOS testinin aslında spermiyumların membran bütünlüğünü belirlemede ne derece öneme sahip olduğunu işaret etmektir. TEM ile HOST uygulamasının literatürle uyumlu olarak sperm ultrastruktüründe dejeneratif sayılabilecek değişikliklere neden olmadığı, Elde edilen bulgular anti HOS' un, spermiyum morfolojini değerlendirilmesinde, dolayısıyla daha sağlıklı spermıyumların seçiminde yararlı olduğunu ancak Anti-HOST sonrasında seçilecek spermiyumlarla fertilizasyon şansının artıracağını desteklemektedir. Anti-HOST uygulamasının normospermi ve oligospermi gruplarında uygulanabileceği ancak astenospermik vakalarda dejeneratif değişikliklere neden olduğundan Anti-HOST yeni bir görüş ve yöntem olarak, öncelikle astenospermik hastalarda faydalı olmayacağı gibi gözükmektedir. Spermatozoon potansiyel fertilite düzeyinin belirlenmesi sırasında motilite, anormal spermiyum oranı ve ölü-canlı spermiyum oranı gibi diğer konvansiyonel parametrelerle birlikte kullanılmasının daha doğru sonuçlara ulaşılması açısından yeni olanaklar sunduğu kanısına varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu bulgular ışığında çalışmamızda; Normospermide HOST uygulamasının özellikle akrozomal bölgede dilatasyonlar şeklinde etki ettiği, astenospermi grubunda daha belirgin olmak üzere diğer gruplarda (Normospermi, oligospermi ve oligoastenospermi) akrozom ile birlikte boyun bölgesinde de dilatasyon ile kendini gösteren değişikliklere neden olduğu belirlendi. Anti-HOST uygulamasının ise astenospermi grubu dışında diğer gruplarda minimal plazma membranı dejenerasyonuna neden olduğu gözlenmekle birlikte kontrole yakın duruma geldiği belirlenirken astenospermi gurubunda Anti-HOST uygulamasının spermiyumda baş ve boyun bölgesinde yer yer dejeneratif değişikliklere neden olduğu belirlendi.

Sonuç olarak; çalışmamızda HOST uygulamasının literatürle uyumlu olarak sperm ultrastruktüründe dejeneratif sayılabilecek değişikliklere neden olmadığı belirlemiştir. Anti-HOST uygulamasının ise normospermi ve oligospermi gruplarına uygulanabileceği ancak astenospermik vakalarda dejeneratif değişikliklere neden olduğu görülerek uygulanmaması gerektiği kanısına varılmıştır.

Sperm plazma membran bütünlüğünün ortaya konulabilmesi için scanning elektron mikroskobu (SEM) ve immonohistokimyasal metodlarla çalışma yapılması önerilir.

KAYNAKLAR

1. Barbieri RL. Female infertility. In Strauss FJ, Barbieri RL (eds), Reproductive endocrinology. 5th ed. Pensylvania Elsevier Inc 2004; 633-668.

2. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives. Second edition. Taylor&Francis 2004; 5:65-90

3. Aydos K. "İnfertil erkeğin değerlendirilmesi". http://www.kaanaydos.net/ 10.09.2009.

4. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Laboratuvar El Kitabı. İnsan Semeni ve Sperm-Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. Çeviri editörü: Günalp S. 4. baskı, Ankara Tıp Teknik Kitabevi 2002; 1-76.

5. Kruger TF, Ackerman SB, Sımmons KF, Swanson RJ, Brugo SS and Acosta AA. A Quıck, Relıable Staınıng Technıque For Human Sperm Morphology. Archıves of Andrology 1987;18:275-277

6. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger TF, Zyl J. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 5(5): 566-592.

7. Amann RP. Can the Fertility Potential of a Seminal Sample Be Predicted Accurately? J Androl 1989;10(2): 89-98.

8. Curry MR and Watson PF. Osmotic Effects on Ram and Human Sperm Membranes in Relation to Thawing Injury, Cryobiology, 1994;31:39-46.

9. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Plaez M, Crabo BG and Zaneveld LJD: Development of an Assay to Assess The Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and Its Relationship to Other Semen Characteristics. J Reprod Fertil 1984;70:219-228.

10. Rogers JB, Parker RA. Relationship between the Human Sperm Hypo-Osmotic Swelling Test and Sperm Penetration Assay. J Andrology 1991;12(2):152-158.

11. Fuse H, Kazama T, Katayama T. Relationship Between Hypoosmotic Swelling Test, Semen Analysis, and Zona-Free Hamster Ovum Test. Systems Biology in Reproductive Medicine 1991;27(2):73-78

12. Moskovtsev SI, Wıllıs J, Azad A and Mullen JBM. Sperm DNA Integrıty: Correlatıon wıth Sperm Plasma Membrane Integrıty ın Semen Evaluated for Male Infertılıty. Archives of Andrology 2005;51:33–40.

13. Jeyendran RS, Zaneveld LJD. Human sperm hypoosmotic swelling test. Fertil Steril 1986;46:151–4

14. Jeyendran RS, Van der Ven HH and Zaneveld LJD. The Hypoosmotic Swelling Test: An Uptade. Arch Androl 1992;29:105-116

15. Check JH, Shanis BS, Epstein R, Wu CH, Nowroozi K, Bollendorf A. The Hypoosmotic Swelling Test as a Useful Adjunct to The Semen Analisis to Predict Fertility Potential. Fertility and Sterility 1989;52(1):159-161

16. Van Der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Perez-Pelaez M, Diedrich K, Zanaveld LJD. Correlation Between Human Sperm Swelling in Hipoosmatic Medium (Hypoosmotic Swelling Test) and in Vitro Fertilization. J Androl 1986;7: 190-196.

17. Cincik M, Ergur AR, Tutuncu L, Muhcu M, Kilic K, Balaban B and Urman B. Combination of Hypoosmotic Swelling/Eosin Y Test for Sperm Membrane Integrity Evaluation: Correlations with Other Sperm Parameters to Predict ICSI Cycles, Arch Androl 2007;53:25-28.

18. İrez T, Kucur M, İşman FK. Androloji Laboratuarı El Kitabı. Nobel Tıp Kitabevleri. 2007.

19. Richard SM, Bianchi NO, Bianchi MS, Peltomaki P, Lothe RA, Pavicic W. Ethnic variation in the prevalence of AZF deletions in testicular cancer. Mutat Res 2004;554:45-51

20. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. 4.th edition, Philedelphia, Lippincott: Williams & Wilkins 2003:689-696.

21. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. cilt. 2. baskı Ankara Güneş Kitabevi 1997;417-420.

22. Kierszenbaum AL. Histology & Cell Biology. Introduction to Pathology. Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Ankara Palme yayıncılık 2006;20:531-545

23. Sadler TW. Langmann Medikal Embriyoloji, Başaklar AC. 9. baskıdan çeviri. Ankara Palme yayıncılık 2005;1:3-29

24. Şeftaioğlu A. Genel & Özel İnsan Embriyolojisi. 3. baskı. Ankara Tıp Teknik Yayıncılık 1998.

25. Guyton & Hall. Texbook of Medikal Physiology 11. edh. 2006;14:996-999.

26. Junqueıra LC, Carneıro J. Temel Histoloji. Text & Atlas. Çev. Editörleri; Aytekin Y, Solakoğlu S. 10. baskı. Ankara Nobel Tıp Kitabevleri 2006; 431-438.

27. Koyuncu İ. Varikoselli hastalarda sperm morfolojisinin değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.

28. Blue Histology Laboratory Guides, http://www.bluehistology.com Erişim tarihi: 22.12.2008.

29. Gartner LP and Hıatt JL. Color Textbook of Histology. W.B. London, Saunnders company 1997; 21:403-421.

30. Kadıoğlu A, Çayan S, Semerci B. ve ark. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. Türk Androloji Derneği Aytekin Y, Solakoğlu S. 2004;3.

31. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. Theriogenology 2003;59:73-86.

32. Moore KL, Persaud TVN. Çeviri ed. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. İnsan Embri-yolojisi Klinik Yönleri ile. 6.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2002;18-23.

33. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. Hum Reprod 1991;6:979-982.

34. Stevens A. Lowe J. Histology Mosby Year Book Europa Land Hong Kong 1993;309-310.

35. Çıray HN. Yardımla Üreme Laboratuarı Pratik Bilgiler. 2003;25-26.

36. Bilgiç E. Normal normospermik fertil erkeklerde spermiyumun antijenik yapısı ve bu yapının varikoselli hastalardaki değişiminin incelenmesi Işık mikroskobu düzeyinde İmmunositokimyasal çalışma, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı 2007.

37. http://www.wikipedia.com. Erişim tarihi: 20.09.2009.

38. Nur Z. Donmuş Boğa Spermasına Uygulanan Isı Farklılıklarının Eritme Sonrası Oluşturulan Soğuk Şokuna Etkileri. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı 2001.

39. Correa, J.R., Pace, M.M., Zavos, P.M. Relationships Among Frozen-Thawed Sperm Characteristics Assested Via The Routine Semen Analysis, Sperm Functional Tests and Fertility of Bulls in an Artificial Insemination Program.Theriogenology 1997;48:721-731.

40. Kumi-Diaka J. Subjecting Canine Semen to The Hypo-osmotic Test. Theriogenology 1993;39(1):1279-1289.

41. Nagy Sz, Házas G, Bali Papp A, Iváncsics J et al. Evaluation of Sperm Tail Membrane Integrity by Light Microscopy. Theriogenology 1999;52:1153-1159.

42. Söderquist L, Janson L, Larsson K, Einarsson S. Sperm Morphology and Fertility in A.I. Bulls. J Vet Med 1991;38(A):534-543.

43. Katz DF, Mills RN, Pritchett TR. The Movement of Human Spermatozoa in Cervical Mucus. J Reprod Fert 1978;53:259-265.

44. Bacınoğlu S. Boğa Spermasında Farklı Eritme Süreleri ve Eritme Sonrasında Oluşturulan Soğuk Şoklarının Spermatolojik Özelliklere Etkisi.Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı 2002.

45. Correa JR, Pace MM, Zavos PM. Relationships Among Frozen-Thawed Sperm Charecteristics Assesed via the Routine Semen Analysis, Sperm Functional Tests and Fertility of Bulls in an Artificial Insemination Program. Theriogenology 1997;48:721-731

46. Woolley DM, Richardson DW. Ultrastructural Injury to Human Spermatozoa after Freezing and Thawing. J Reprod Fert 1978;53:389-394.

47. Liu Z, Foote RH. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. J Dairy Sci 1998;81:1868-1873.

48. Nagy Sz, Meresz L, Varszegi J, Szasz F, Ivancsics J, Kovacs A. Relationship Between Sperm Membrane Integrity and Motility. Theriogenology 2000;53(1):204.

49. Pérez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, Garcia-Casado P. A Short Hypoosmotic Swelling Test for The Prediction of Boar Sperm Fertility. Theriogenology 2000;56:387-398.

50. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic Test in Equine Spermatozoa. Theriogenology 1999;51:721-727.

51. Borg K, Colenbrander B, Fazeli A, Parlevliet J, Malmgern L. Influence of Thawing Method on Motility, Plasma Membrane Integrity and Morphology of Frozen-Thawed Stallion Spermatozoa. Theriogenology 1997;48:531-536.

52. Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Håård MGM et al. Effect of Cooling Rates on Post-Thawed Sperm Motility, Membrane Integrity, Capacitation Status and Fertility of Dairy Bull Semen Used for Artificial Insemination in Sweden. Theriogenology 1999;52:641-658.

53. Vazguez JM, Martinez EA, Martinez P, Garcia-Artiga C, Roca J. Hypoosmotic Swelling of Boar Spermatozoa Compared to Other Methods for Analysing the Sperm Membrane. Theriogenology 1997;47:913-922.

54. Nie GJ, Wenzel JGW. Adaptation of The Hypoosmotic Swelling Test to Assess Functional Integrity of Stallion Spermatozoal Plasma Membranes. Theriogenology 2001;55:1005-1018.

55. Zavos PM, Correa JR, Zarmakoupis-Zavos PN. Measurement of The Sperm Motility Index via the Sperm Quality Analyzer and Its Relationship to Other Qualitive Sperm Parameters. Theriogenology 1996;46:421-427.

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

57. Tamuli MK and Watson PF. Effect of Temperature of Incubation on the Development of Resistance to Cold Stress and Hypoosmotic Stress in Boar Spermatozoa Incubated for up to 24 Hours, Proc 12th Int Congr Anim Reprod, The Hague, The Nedherlands 1992;1484-1486.

58. Tartaglione CM and Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen, Theriogenology 2004;62:1245-1252.

59. Correa JR and Zavos PM. The Hypoosmotic Swelling Test: Its Employment as an Assay to Evaluate the Functional Integrity of The Frozen-Thawed Bovine Sperm Membrane. Theriogenology, 1994;42;351-360.

60. Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini PG, Martelli F and Genazzani AR. Membran Integrity Evaluation in Rabbit Spermatozoa, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002;102,53-56.

61. Misro MM and Chaki SP. Development of a rapid, sensitive, and reproducible laboratory test kit for the assessment of plasma membrane integrity of human sperm. Fertility and Sterility. January 2008; 89(1):223–227

62. Check JH, Epstein R, Nowroozi K, Shanis BS, Wu CH, Bollendorf A. The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. Fertil Steril.1989;52(1):159-61.

63. Check JH, Katsoff D, Check ML, Choe JK, Swenson K. In vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection is an effective therapy for male factor infertility related to subnormal hypo-osmotic swelling test scores. J Androl 2001;22:261-265.

64. Tartagnı M, Schonauer MM, Cıcınellı E, Selman H, Zıegler DD, Petruzzellı F and D'addarıo V. Usefulness of the Hypo-Osmotic Swelling Test in Predicting Pregnancy Rate and Outcome in Couples Undergoing Intrauterine Insemination. Journal of Andrology 2002;23(4):498–502.

65. Sallam HN, Farrag A, Agameya AF, El-Garem Y, Ezzeldin F. The use of the modified hypo-osmotic swelling test for the selection of immotile testicular spermatozoa in patients treated with ICSI: a randomized controlled study. Human Reproduction 2005;20(12):3435-3440.

66. Matyas Sz, Papp Gy, Kovacs P et al. Intracytoplasmic sperm injection with motil and immotile frozen-thawed testicular spermatozoa (the Hungraian exprience). Andrologia 2005;37:25-28.

67. Drevius LO. Bull spermatozoa as osmometers. J Reprod Fertil 1972;28:29-39.

68. Watson PF, Kunze R, Cramer P and Hammerstedt RH. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fovl and bull spermatozoa. J Androl 1992;13:131-138.

69. Tartagnı M, Cıcınellı E, Schonauer MM, Causıo F, Petruzzellı F, Loverro G. Males with subnormal hypo-osmotic swelling test scores have lower pregnancy rates than those with normal scores when ovulation ınduction and timed ıntercourse ıs used as a treatment for mild problems with sperm count, motility or morphology. Journal of Andrology 2004;25(5):781-783.

70. Ahmadi A. The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection Fertılıtya and Sterılıty 1997;68(2):346-350.

71. Casper R, Meriano J, Jarvi K, Covan L, Lucato ML. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. Fertil Steril 1996;65:972-976.

72. Cueva FIC, Rigau T, Bonet S, Miro J, Briz M, Rodriguez-Gill JE. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotıc ıncubatıon: Effects of ouabaın. Theriogenology 1997;47:765-784.

73. Menkveld R, Oettle EE, Kruger TF, Swanson RJ, Acosta AA and Oehninger S. Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation. USA Williams & Wilkins 1991.

EKLER

EK-1: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

EK-2: HASTA DEĞERLENDİRME FORMU

EK-3: HASTA DEĞERLENDİRME FORMU

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU **EK-1**

72 saatlik cinsel perhizden sonra alınan insan spermasındaki sağlam hücre zarının yarı geçirgenliğine bağlı olarak az yoğun ortamlarda (hipotonik ortam) suyun hücre içine girmesiyle spermatozoon hacminde meydana gelen artışları (şişme) tespit etmek, spermatozoada meydana gelen hacimsel artışların yapısal tiplerini belirlemek, meydana gelen hacimsel artışın kısırlık problemi olan ve olmayan erkekler arasındaki ilişkiyi tespit etmek ve hacimsel artış gösteren örneklerin diğer rutin sperm analiz yöntemleri ile (Motilite, Morfoloji, Konsantrasyon) ilişkisini ortaya koymak amaçlandı. Ayrıca az yoğun ortama bırakılan spermanın tekrardan çok yoğun ortama (hipertonik) bırakılmasıyla hücre zarı bütünlüğünde meydana gelen değişikliklerin ışık ve elektron mikroskop düzeyde incelenmesi amaçlanan bir çalışmadır.

Bu araştırma dahilinde size mevcut kullandığınız ilaçlar yada hastalığınız gereği kullanmanız gereken ilaçlar dışında hastalığınızla yada başka bir nedenle ilgili olarak herhangi bir ek ilaç tedavisi, fiziki müdahale yada diğer bir terapötik yaklaşım uygulanmayacaktır. Bu nedenle size bu araştırma sonucunda herhangi bir zarar verilmesi söz konusu değildir.

Bu çalışmada elde edilecek tüm bilgiler araştırma amacıyla kullanılacak ve yayınlanacaktır. Ancak bu süreçte hiçbir şekilde sizin yada yakınlarınızın kimliği, klinik durumu açığa vurulmayacak ve açıklanmayacaktır.

Araştırmada yapılacak tüm görüşmelerin ve ölçeklerin tüm masraflarının araştırıcı tarafından karşılanacağı tarafıma taahhüt edildi.

Bu çalışmanın amacı, hedefleri ve yöntemleri bana ayrıntılı biçimde anlatıldı.

Çalışmaya kendi rızamla katılmayı, gerekli ölçeklerin uygulanmasını kabul ediyorum.

Adı, Soyadı : **Tarih : …../….**/2009

Doğum Yeri ve Yılı :

İletişim Adresi ve/veya Telefonu:
İMZA:…….

Eşinin Adı, Soyadı :
İMZA:…….

Araştırıcının Adı, Soyadı : Yekbun TUTŞİ **Tanık:**

Tlf: 0 505 594 79 75 **Tlf:**

Not: Bu olur formu tek bir sayfadan oluşmaktadır.

KLİNİK ARAŞTIRMADA KULLANILACAK HASTA DEĞERLENDİRME FORMU **EK-2**

HASTA BİLGİ FORMU (…) FERTİL GRUB
(…) İNFERTİL GRUB

A. KİMLİK VE ADRES BİLGİLERİ:

Adı, Soyadı : **Tarih : …./…./**2009

Doğum Yeri ve Yılı : **Dosya No:**

Mesleği :

Eğitim Durumu :

Sigara / Alkol kullanımı :

İletişim Adresi ve/veya Telefonu:

B. ÖZGEÇMİŞİ:

Başvuru Zamanı :

Yapılan tedaviler :

Kullandığı İlaçlar :

Tanı :

Cinsel perhiz süresi :

C-HASTAYA AİT FİZİK MUAYENE VE LABORATUVAR BULGULARI:

İlk makroskobik değerlendirme

-Likefaksiyon :
-Görünüm :
-Hacim :
-Viskozite :
-pH :

Mikroskobik testler;

Motilite :
Morfoloji :
Konsantrasyon :
Ölü - Canlı oranı :
Hipoozmotik şişme testi (HOST) :
Anti-HOST :

D- MUAYENE BULGULARI:

FORMU HAZIRLAYAN: Yekbun TUTŞİ, D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji A.D.

EK-3: HASTA DEĞERLENDİRME FORMU

NORMAL:_____

AMORF BAŞ: _____
***Hafif : ……..……**
***Şiddetli: ……....**

-Akrozomal: _____
- Akrozomal şekil bozukluğu ……
- İrregüler akrozomal dağılım ……
- Akrozomal kist ……
- Akrozomal vokuol ……..

-Nüklear: _____
- Nüklear şekil bozukluğu ……
- Diadem ……..
- Nüklear kist ……
- Nüklear vokuol ……..
- Ridged ……....

-Round head :_____
-Pin head: _____
-Tapered :_____
-Abeksiel implantasyon : _____
-Head base vokoul :_____
-Parsiyel seperasyon _____
-Miacellaneus : _____

BÜYÜK BAŞ ANOMALİSİ: _____
KÜÇÜKBAŞ ANOMALİSİ: _____
UZUN BAŞ ANOMALİSİ : _____
MULTİPLE BAŞ ANOMALİSİ :_____
NORMAL BAŞLI BOYUN VEYA KUYRUK ANOMALLİLİ SPERM
_____

SERBEST BAŞ:_____
- Normal :……..
- Anormal :……

SİTOPLAZMİK DROPLET : _____

BOYUN – ORTA KISIM : _____
- Kinked : ……
- Segmental Mitokondrial aplazi : ……....
- Mitokondrial kayıp : ……
- Kırık boyun : ……

KUYRUK ANOMALİSİ : _____
- Çift :……
- Tail Stump :……
- Dag Defect : ……...
- Kıvrık Kuyruk :……..
- Kısa Kuyruk : ……
- Uzun Kuyruk : ……..
- Kalın Kuyruk : ……...

ADI : ……..

SOYADI : ……..

DOĞUM YILI : ……..

EŞİNİN ADI :……..……

TARİH: ……..……

HİPOOSMOTİK SWELLİNG TEST	Şişen Sperm Sayısı	Şişme Oranları
Baş		
Boyun		
Kuyruk		
TOPLAM		

ANTİ HOST	Şişen Sperm Sayısı	Şişme Oranları
Baş		
Boyun		
Kuyruk		
TOPLAM		

ÖZGEÇMİŞ

01.11.1976 tarihinde, Diyarbakır ili Silvan ilçesinde doğdum. 1993 yılında Gaziantep Şehit Şahinbey Lisesinden mezun oldum. 1994 yılında kazandığım Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1999 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldum. 2003 yılında Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalında doktoraya başladım. 2005 yılı itibarı ile Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Eğil İlçe Tarım Müdürlüğü' ne atanarak 3 yıl Veteriner Hekim olarak çalıştım. 2008 yılından beri Tarım ve Köyişleri Bakanlığı İl Kontrol Laboratuar Müdürlüğü' nde görev yapmaktayım.

Yekbun TUTŞİ