



T. C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE SPERM
MORFOLOJİSİNİN KRUGER'İN KESİN
KRİTERLERİNE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hazırlayan
Dr. Aykut KEFİ

Tez Yöneticisi
Prof. İbrahim CÜREKLİBATIR

90978

Ocak 2000
İZMİR

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ÖNSÖZ

“Erkek İnfertilitesinde Sperm Morfolojisinin Kruger’in Kesin Kriterlerine Göre Değerlendirilmesi” konulu tez çalışmamı tamamlamamda, başta sayın hocam ve kliniğimizin kürsü başkanı Prof. Dr. Nurullah Mülazımoğlu olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Orhan Yurtseven, Prof. Dr. Atalay Gürsan, Prof. Dr. Necmettin Çıkılı’ya, başından itibaren her aşamasında tezimle yakından ilgilenen tez moderatörüm Prof. Dr. İbrahim Cüreklibatır’a ve Prof. Dr. Oktay Nazlı, Doç. Dr. Gürhan Günaydın, Doç. Dr. Bülent Semerci, Doç. Dr. Ceyhun Özyurt ve Doç. Dr. Erdal Apaydın’a, ayrıca başasistanlarımız Uz. Dr. Çağ Çal ve Uz. Dr. Barış Altay’a değerli katkılarından dolayı şükranlarımı sunarım.

Yine tez çalışmamda değerli yardımları nedeniyle başta Aile Planlaması, Kısırlık Araştırma ve Uygulama Merkezi müdürü sayın Prof. Dr. Erol Tavmergen başta olmak üzere, Doç. Dr. Ege Tavmergen Göker’e ve tüm çalışanlarına, özellikle Androloji laboratuvarlarında tüm hastaların sperm tetkiklerini titizlikle yapan sevgili biolog ve laborant arkadaşlarıma özverili çalışmalarından dolayı teşekkür ederim.

Beş yıla yakın bir süredir birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin değerli hemşirelerine ve personeline en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	2
Sperm Morfoloji Değerlendirmesinin Günümüze Kadar Olan Gelişimi.....	2
Sperm Morfolojisinin Klinik Önemi.....	3
Normal Sperm Tanımlaması.....	4
Anormal Sperm Tanımlaması.....	8
Sperm Morfoloji Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Boyama Teknikleri.....	20
Sperm Morfoloji Değerlendirilmesi İçin Diff-Quik Boyama.....	22
Kruger'in Kesin Kriterleri.....	22
Sperm Morfolojisinin İnfertilite ile Olan İlişkisi.....	26
Sperm Motilitesi.....	28
Hareket Azlığının (Asthenospermi) Nedenleri.....	30
Varikoselin Sperm Morfolojisi Üzerine Etkisi.....	32
İnfertilitede Yardımlı Üreme Teknikleri.....	33
İntrauterin İnseminasyon (IUI).....	34
İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI).....	36
Embriyo Transferi (ET).....	36
Olgular ve Yöntem	37
Sonuçlar	38
Tartışma	43
Özet	46
Referanslar	47

GİRİŞ VE AMAÇ

Son 15 yıl içerisinde tıpta infertilite konusunda çok önemli gelişmeler kaydedilirken sperm morfolojisinin infertilitedeki yeri ve etkinliği de üzerinde titizlikle durulması gereken bir parametre olmuştur. 13 yıl önce Kruger tarafından ilk kez ortaya konan *Kesin (strict) Kriterler* zaman içerisinde çok tartışılmış ve alternatif yöntemlerle sperm morfolojisi değerlendirilme kapsamına alınmıştır. Bu amaçla sperm morfolojisini değerlendirmek için pek çok test geliştirilmiştir. Bu testler çok detaylı, uygulanması güç, hatta bazen sonuçların yorumlanması bile güç olması açısından her laboratuvar tarafından uygulanabilecek testler değildir. Ancak böyle bir değerlendirmeyle sperm fonksiyonunu yansıtan çok değerli bilgiler elde edilebilir. Özellikle yardımcı üreme tekniklerinin kullanımında başarı oranlarının önceden belirlenmesi mümkün olabilir. Sperm morfolojik değerlendirilmesi iyi bir şekilde öğrenilip uygulanabildiği zaman kolay ve çabuk uygulanabilen bir yöntem olup klinisyene birkaç dakika içerisinde önemli bilgiler verebilmektedir.

Sperm morfolojisini kimi otörler spermin fertilizan kapasitesini belirleyen en önemli semen parametresi olarak kabul etmektedirler (1,2). Dolayısıyla günümüzde infertilite tedavisi öncesinde sperm morfolojisi ve sperm testi önem kazanmıştır. Bu amaçla, bu çalışmada, tez moderatörüm Prof. Dr. İbrahim Cüreklibatır'ın değerli katkılarıyla infertilite ünitesine başvuran bir grup hastanın sperm morfolojileri Kruger'in kesin kriterlerine göre dökümente edildi, fertilizasyon ve gebelik hızları sperm morfolojileriyle karşılaştırıldı.

GENEL BİLGİLER

SPERM MORFOLOJİ DEĞERLENDİRİLMESİNİN GÜNÜMÜZE KADAR OLAN GELİŞİMİ

İnsan spermatozoasının tanımlanması ve çizimi ilk kez 1677'de Antoni van Leeuwenhoek tarafından yapılmıştır. Daha sonra Cary, 1916 yılında erkek infertilitesi ve sperm morfolojisi arasında bir ilişki olabileceğine dikkat çekmiştir. 1925 yılında Williams ve Savage, boğalardaki üreme potansiyelinin sperm başının morfolojisi ile kesin ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Aynı kavramın insanlar için de geçerli olduğunu 1931 yılında Moench ve Holt göstermiştir. 1934 yılında ilk kez yağ immersiyon objektifi ve sperm boyama maddesi kullanan Cary ve Hotchkiss, sperm anomalilerini sınıflama olanağı buldular. Sperm morfolojik olarak ilk kez bölümlere ayıran Williams'tır. 1934 yılındaki çalışmalarında, spermin baş, boyun, orta kısım ve kuyruk olarak tanımlamasını yaptı ve akrozomun varlığını saptayan ilk araştırmacı oldu. Daha sonra aynı araştırmacı sperm anomalilerini 6 gruba ayırarak standardizasyonun ilk adımlarını attı. 1951 yılında MacLeod ve Gold standardizasyon kavramını daha da geliştirdiler. Aynı araştırmacılar daha sonra prekürsör formları da sınıflamaya kattılar. 1966'da bu sınıflamaya katkılarda bulunan Freund, kuyruk anomalilerinin de sınıflandırılmasını sağladı. 1971'de Eliasson, sperm başının ölçülerini saptayarak, büyük/küçük kavramına dikkat çekti. Ayrıca en önemli katkısı, spermin bir bütün olarak ele alınması yolundaki önerisi idi. 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization - WHO), bu kavram ile çelişecek biçimde piriform baş, orta kısım defektleri, sitoplazmik artık ve kuyruk defektleri gibi 4 yeni grup daha ilave ederek 10 ana grup oluşturdu. 1987 yılında yeniden revize edilerek yayınlanan WHO kitabında bu hatalı yaklaşım giderilerek sadece başın değerlendirilmesi değil, tüm sperm kapsayacak yeni bir sınıflama getirildi. Ayrıca pin-head ve yuvarlak baş anomalileri de ilave edildi. 1992 de yayınlanan üçüncü WHO kitabında semen değerlendirilmesinde sperm morfolojisine daha da önem verildi, Bunun sebebi *Kesin Kruger Kriterleri* 'nin giderek daha fazla önemseniyor olmasıydı. Bu sınıflamada, endoservikal kanalın proksimal ve distal kısımlarında bulunan sperm popülasyonlarının

farklı morfolojik özellikler taşıyor olması yönlendirici faktör olmaktadır. Ayrıca Eliasson'un ortaya attığı "sperm bir bütün olarak ele alınmalıdır" kavramına geri döndü.

SPERM MORFOLOJİSİNİN KLİNİK ÖNEMİ

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation - WHO) infertilite tanımlamasını "en az bir yıl süreyle çiftlerin korunmasız olarak koitusta bulunmalarına karşın çocuk sahibi olamamaları" olarak yapmaktadır. WHO'nun çok merkezli araştırmalarının sonucu da infertilite kliniklerine başvuran çiftlerin en az % 48'inde erkeğe bağlı nedenler bulunmaktadır (3).

İnfertilite Nedenleri:

1. Yalnızca kadına bağlı nedenler..... %41
2. Yalnızca erkeğe bağlı nedenler..... %24
3. Kadın ve erkeğe birlikte bağlı nedenler.....%24
4. Nedeni açıklanamayan..... %11

İnfertilite olgularının yaklaşık yarısı erkeğe bağlı olduğundan, iyi bir semen analizi kaçınılmazdır. WHO tarafından tanımlanan konvansiyonel semen analizinde, volüm, aglutinasyon, pH, nonsperm yuvarlak hücre konsantrasyonu gibi parametrelerin yanında, en önemli parametreler, konsantrasyon, motilite ve morfolojidir (4).

Bu konuda birçok komplike metodlar geliştirilmiştir. Öyle ki; bu metodların sperm kalitesini değerlendirmede etkinliği bir tarafa, laboratuvarlar arasında bir standart dahi oluşturulamamıştır. Bununla beraber pratik bir sınıflama ile hücreler normal (oval baş), amorf (irregüler baş), taper baş, büyük veya küçük baş ve immatür baş (5) olarak değerlendirilmiştir. Kesin Kruger (Tygerberg) kriterleri (6) sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde böyle bir standardizasyonu amaçlamıştır. WHO normal değeri %50 olarak belirlemiştir (4). Bununla beraber bu cut-off değerinin infertil çiftte erkek faktörünü sağlıklı test edip etmediği tartışmalıdır.

Erkek fertilitesi değerlendirilmesinde birçok parametreler göz önüne alınmakla beraber bugüne kadar tek başına fertilitite potansiyelini belirleyecek

bir test bulunamamıştır. Kesin kriterler ile değerlendirilen sperm morfolojisi bu yeterliliğe çok yaklaşmıştır. Klasik fertilité araştırmaları arasında yer alan postkoital test, sperm morfolojisi değerlendirilmesinin fikir babası olmuştur. Postkoital test bilindiği gibi, koitus sonrası vaginal duř almaksızın 2 ila 12 saat içinde, servikal kanaldan alınan akıntı örneğinin mikroskop altında değerlendirilmesi ile yapılır. Bu akıntı örneğinde, sperm varlığı ve mevcut spermelerin motilitesi değerlendirilir. İlk kez Menkveld (7) isimli araştırıcı servikal kanalın proksimalinden ve distalinden ayrı ayrı akıntı örnekleri alarak incelemiş ve bu iki fraksiyonda morfolojik yönden farklı sperm popölasyonları olduğunu görmüştür. Distalde yani vajen arka forniksine yakın olan bölümde, şekil itibariyle daha bozuk spermelerin varlığı söz konusu iken, proksimal yani endometrial kaviteye yakın bölümde morfolojik olarak daha düzgün spermelerin zenginliği bu araştırıcının dikkatini çekmiştir. Buradan hareket ederek servikal mukusun spermeler üzerinde adeta bir süzgeç gibi filtre edici etkisi olduğunu düşünmüş ve proksimalde şeklen daha normale yakın spermelerin varlığının da, bu filtrasyonun göstergesi olabileceğini öne sürmüştür. Normal morfolojideki spermeler normal progresif motilitede bulunabilmekte ve ancak bunlar servikal mukusu geçebilmektedirler. Morfolojisi bozuk olan spermeler ancak nonprogresif hareket edebilirler. Servikal kanaldan ise geçemez ve süzülerek tutulurlar.

Morales ve arkadaşları, normal morfolojiye sahip spermelerin anormal spermelerden daha hızlı yüzmelerinden başka, daha yüksek dönme, flagellar hareket sıklığı ve flagellar hareket yüksekliğine de sahip olduklarını göstermişlerdir. Kısaca önce morfoloji düzgün olmalıdır ki, hareketlilik iyi olabilsin.

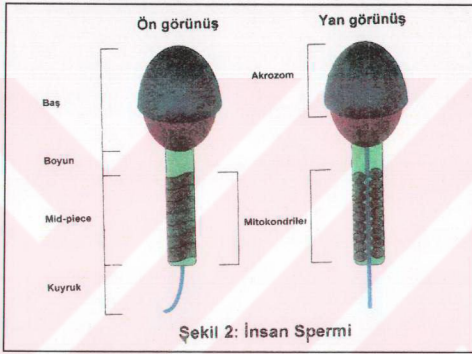
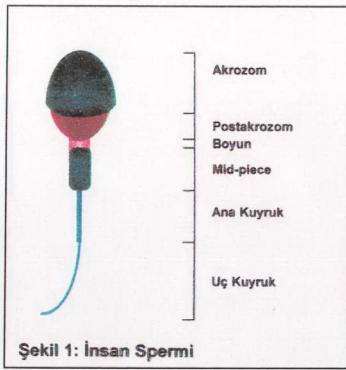
NORMAL SPERM TANIMLAMASI

Bu noktada spermelerin sahip olmaları gereken normal morfolojinin ne olabileceği sorusu gündeme gelmiştir. Menkveld, ilk kez normal olarak kabul edilebilecek sperm yapısını ve boyutlarını, mikron cinsinden kesin kriterlerle tanımlamıştır. Buna göre normal olarak kabul edilebilecek bir sperm şekil 'de görüldüğü gibi, gros olarak baş ve kuyruk bölümlerinden oluşmaktadır. Detaya inecek olursak, baş kısmında akrozom, postakrozom ve

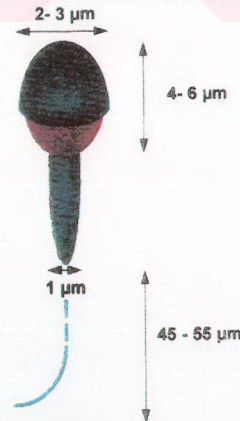
nükleus bulunmaktadır. Daha sonra çok ince bir tabakadan oluşan boyun kısmı vardır ki bu ancak elektron mikroskopunda görülebilir. Boyun kısmından sonra mid-piece (orta kısım) gelir. Bu kısım en önemli bölümlerden biridir, çünkü burada Şekil 2'de görüldüğü gibi, spermilere motilite için gerekli enerjiyi verecek olan mitokondriler bulunur. O halde mid-piece anomali olan bir spermin progresif motil olması beklenemez. Kuyruk kısmı da sırasıyla kalın olan ana kuyruk ve daha sonra nispeten daha ince olan uç kuyruk bölümlerinden oluşur. Kuyruk anomalilerinin motilite bozukluğu yaratacağı şüphesizdir.

Şekil 3'de bir spermin son derece kesin kriterle normal ölçüleri gösterilmektedir (8). Normal bir spermin Spermac boyası ile boyanmış görünümü ise Resim 1,2,3'de verilmiştir.

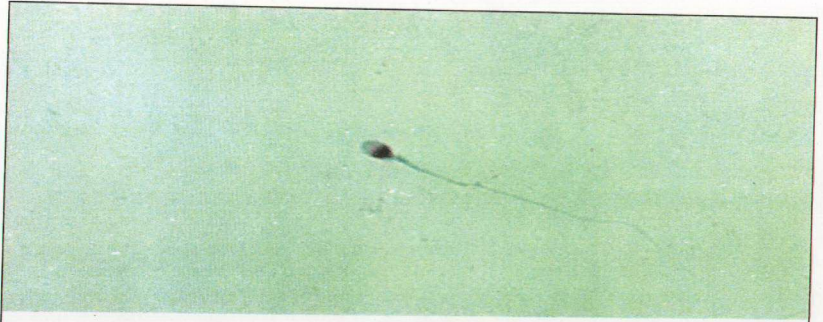




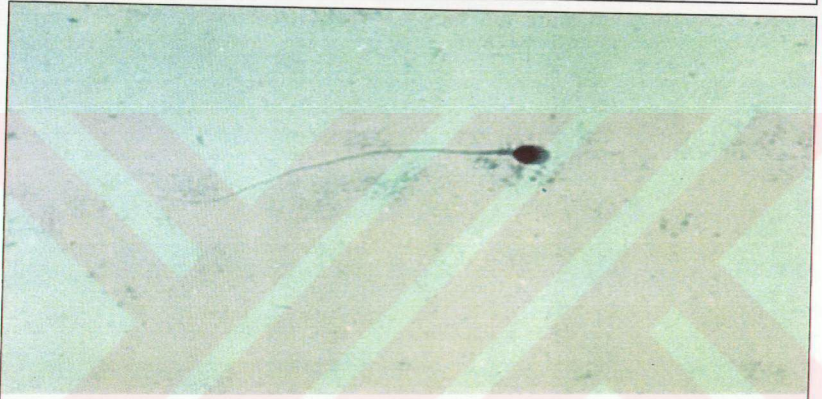
- Baş ovoid, düzgün konturlu, iyi sınırlanmış bir akrozomal kılıf içeriyor, baş boyutları, 4-6 mikron X 2-3 mikron X 1.5 mikron.
- Akrozom baş alanının % 40-70'ini kaplıyor, akrozom altında kalan bölümün konturları düzgün.
- Boyun, mid-piece ve kuyruk anomali yok.
- Mid-piece silindirik ve baş ile aksiyel, eni 1 mikron, uzunluğu baş uzunluğunun 1.5 misli, sitoplazmik droplet içermiyor.
- Kuyruk uniform, mid-piece'den daha ince, kıvrımsız ve 45-55 mikron uzunluğunda.



Şekil 3: Normal Sperm Morfolojisi



Normal



Normal



Normal

ANORMAL SPERM TANIMLAMASI

Kesin kriterler ile sperm morfolojisi değerlendirilmesinde yukarıda boyutları verilerek tanımlanan sperm dışındaki kalan tüm sperm anormal olarak kabul edilir. Anormal sperm formları aşağıdaki şekillerde olabilir (8) (Şekil 4-12) (Resim 4-18):

Baş şekil Anomalileri:

Borderline "sınırdaki" baş anomalileri: Bunlar hafif anomaliler olup, ilgili spermi belirli bir anormal form sınıfına sokmaz.

Piriform: Armut şeklinde olan spermlerdir. Tek taraflı kontur bozulması olduğu durumlarda anormal olarak kabul görmez, ancak çift taraflı kontur bozulmaları anomali olarak kabul edilir.

Sitoplazmik droplet (artık): İmmatürite işaretidir.

Yuvarlak: "Globozoospermia". Genellikle akrozom yokluğu nedeniyle sperm başı yuvarlak şekil alır. İmmatürite işaretidir.

Pin-head: Sperm başı toplu iğne başı şeklindedir.

Diadem defekti: Sperm başı üzerinde yer alan çöküntü alanlarıdır. Nükleus içine doğru olan invajinasyonlardır.

Küçük: Sperm başı, tanımlanan boyutlardan daha ufaktır.

Büyük: Sperm başı, tanımlanan boyutlardan daha büyüktür.

Amorf: Sperm başının ovoid olmaması durumudur.

Tapered: Sperm başının uzun ve sivri olması durumudur. Akrozom yokluğu veya anomalisi durumunda ortaya çıkar.

Elonge: Sperm başı tapered formda olduğu gibi sivri değildir, ancak tanımlanan boyutlardan daha uzundur. Postakrozom kısmında incelleme söz konusudur.

Çift: Tek kuyruk, tek mid-piece olduğu halde sperm başının çift olması durumudur. İmmatürite işareti olabilir (inkomplet seperasyon).

Yarık baş: Aynı sperm başı içinde birden fazla nükleus bulunması durumunda görülebilir. Bu durumda sperm haploid değildir. İmmaturite işareti olabilir.

Vaküol: Sperm başında boya almayan boşluklar vardır.

Akrozom anomalileri:

Primer Akrozom anomalileri: Spermin gelişmesi ve diferansiyasyonu sırasında meydana gelen anomalilerdir. Anormal formasyon, anormal dağılım ve sperm başına anormal bağlanma şeklinde ortaya çıkarlar.

Akrozomal kistler: Primer akrozom anomalileridir.

Nipple kist: Akrozomun en uç kısmında yer alan kistlerdir.

Aberan akrozom: Primer akrozom anomalileridir. Homojen olmayan boya dağılımı ve kontur bozukluğu vardır.

Sekonder Akrozom anomalileri: Sperm membranının eksternal etkenler, yaşlanma veya harabiyetine bağlı olarak akrozom içeriğinin kaybıdır.

Membran bozulması: Akrozom konturlarının düzenli olmaması durumudur.

Küçük: Akrozomun sperm başının % 40'ından daha azını kaplamasıdır.

Büyük: Akrozomun sperm başının % 70'inden daha fazlasını kaplamasıdır.

Vaküol: Akrozom içinde boya almayan alan olarak görünür.

Akrozomsuz: Sperm başında akrozom yokluğu durumudur. Genellikle sperm başı yuvarlak şekilli ve koyu renkli boyanmış görünür.

Ayrılmış: Akrozomun sperm başından hafifçe uzaklaştığı izlenir.

Nukleus Anomalileri: Çekirdek boyanmasının homojen olmadığı ve şekil bozukluğuna sahip olduğu durumlardır.

Nükleus vakuelleri: Çekirdek içinde boşluk alanları vardır.

Mid-piece (orta kısım) Anomalileri: Mitokondrilerin yer aldığı bölüm olduğu için çok önem arz ederler. Spermin enerji desteğinden yoksun kalması söz konusu olabilir ve bu durumlarda sperm immotil olabilir. Mid-piece anomalileri baş veya kuyruk anomalileri ile birlikte olabilir.

Sitoplazmik droplet (artık): İmmatürite işaretidir.

Segmental mitokondrial aplazi: Orta kısmın belirli bir bölümünün ince ve mitokondriden yoksun olması durumudur. Genel mid-piece kalınlığından daha dar bir alan olarak boyanırlar.

Bend (kırılmış): Baş ile kuyruk arasında mid-piece zayıflığı veya yokluğu söz konusudur. Baş ile mid-piece, sitoplazmik bir parça ile birbirine tutunur. Bu spermelerin progresif motilite göstermeleri söz konusu değildir.

Kopuk baş: Mid-piece kısmının tam yokluğu durumunda olabilir.

Büyük: Mid-piece kalınlığı 1 mikrondan daha fazladır.

Küçük: Mid-piece kalınlığı 1 mikrondan daha azdır.

Amorf: Mid-piece konturları düzgün değildir. Enerji destek eksikliği yaratabilir.

Non-axial: Sperm başı ile mid-piece aynı aks üzerinde değildir. Progresif motiliteyi güçleştirir.

Kuyruk Anomalileri: Total motilite yokluğu veya non-progresif motilite şeklinde hareketlilik bozukluklarına yol açabilen defektlerdir.

Kuyruksuz: Kuyruk yokluğu durumudur.

Çift: Tek baş ve çift kuyruk şeklinde olur ve motiliteyi etkiler.

Kısa: Tanımlanan boyutlardan daha kısa kuyruk boyu söz konusudur.

Uzun: Tanımlanan boyutlardan daha uzun kuyruk boyu söz konusudur.

Kalın: Tanımlanan boyutlardan daha kalın kuyruk eni söz konusudur.

Droplet: Kuyruğa yapışık bir artık olması durumudur.

Dag defekti: Kuyruk mikrofibrillerinin anomalisidir. Kuyruk şekil bozukluğu olarak gözlenir. Kuyruğun bütünü anormaldir.

Coiled (kvrık): Progresif motiliteyi engelleyecek şekilde kıvrık bir kuyruk yapısıdır. Kuyruğun uç kısmında veya tümünde olabilir.

Mixed (karışık) Anomaliler: Baş ve kuyruk anomalilerinin aynı sperm üzerinde bulunması durumudur.

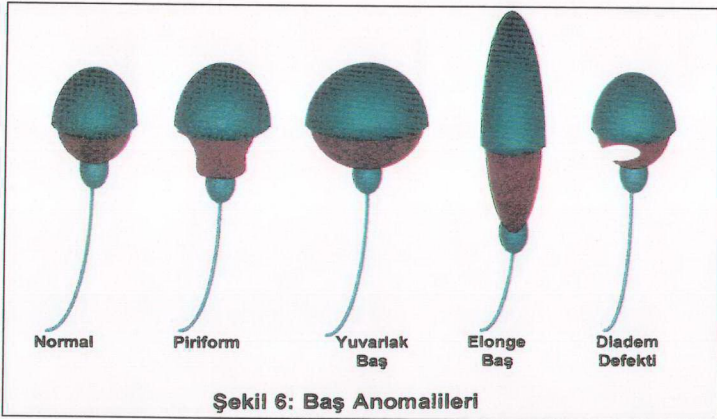
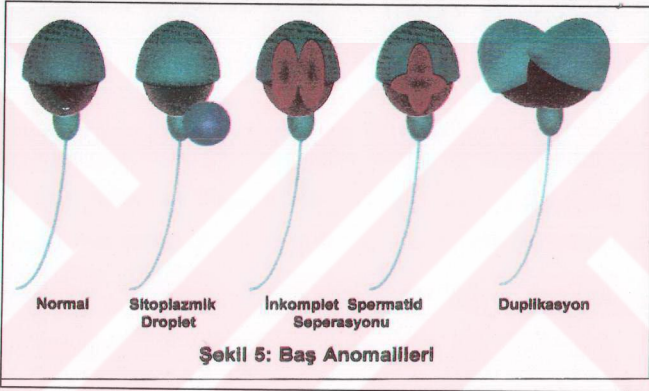
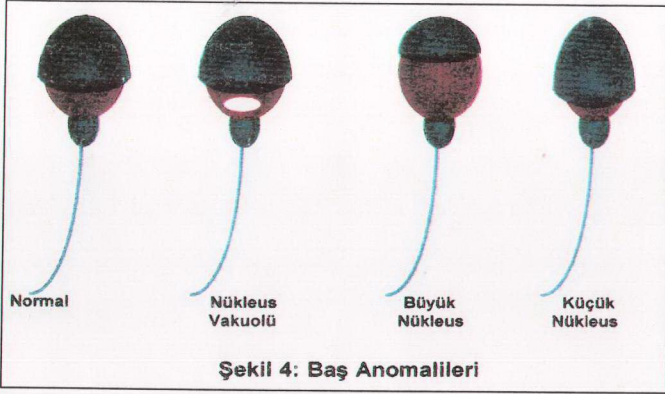
İmmatür Form: Primer ve sekonder spermatositler veya spermatidler olabilir. Çok nükleuslu olabilirler. Kuyruksuz, yuvarlak formda veya immatür kuyruk yapısına sahip olabilirler.

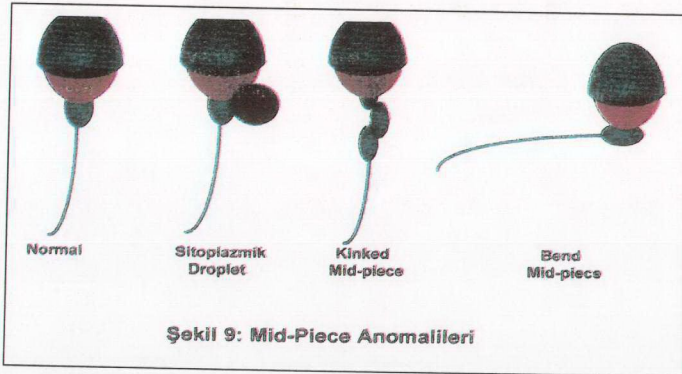
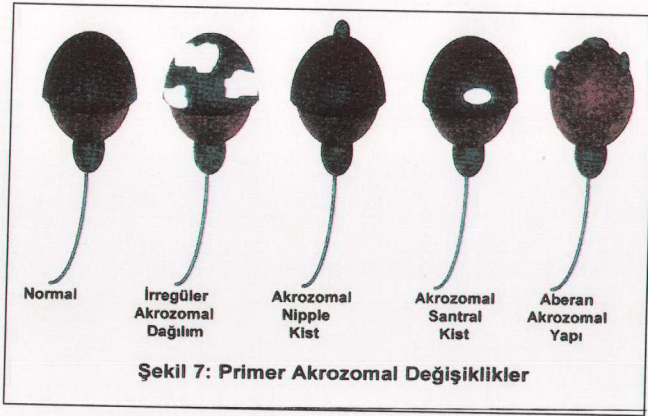
Aglutinasyon: Spermilerin kümelendiği kalabalık alanlardır. İmmünolojik infertilite nedeniyle kümelenme olabilir. Ancak lam üzerine semenin yayılması esnasında yapılabilecek hatalar da aynı kümelenmeye neden olabilir. Değerlendiren kişi, bu tür bir görüntüyü immatürite işareti olan inkomplet seperasyondan mutlaka ayırabilmelidir.

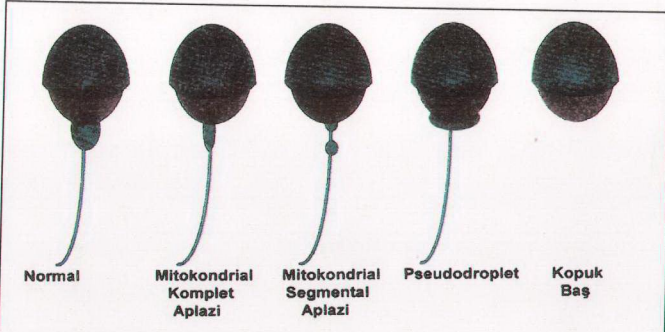
Sınıflandırılmayan: Yukarıda tanımlanan anomalilerden herhangi birine giremeyecek derecede bozuk şekli olan spermelerdir.

Semen sitolojisi: Non-sperm hücrelerin incelenmesini kapsar. Polimorfonükleer lökositler yuvarlak hücrelerdir. Bazı preparatlarda koliform veya diğer formlarda olan boyanmış bakteri grupları görülebilir.

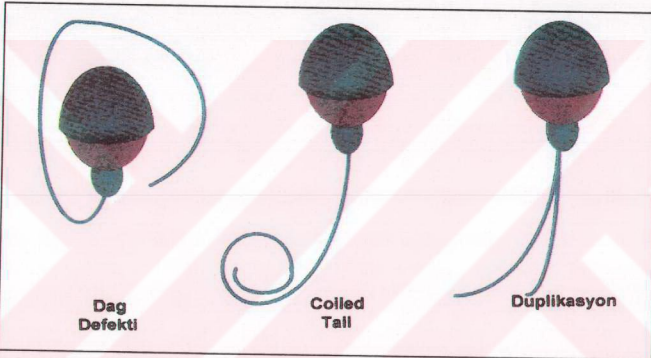




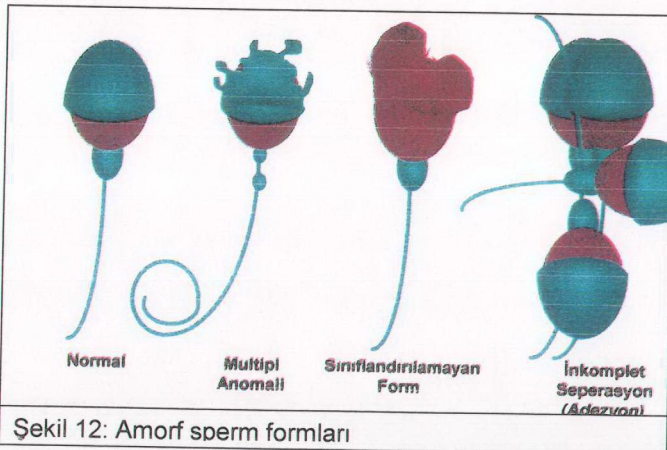




Şekil 10: Mid-Piece anomalileri



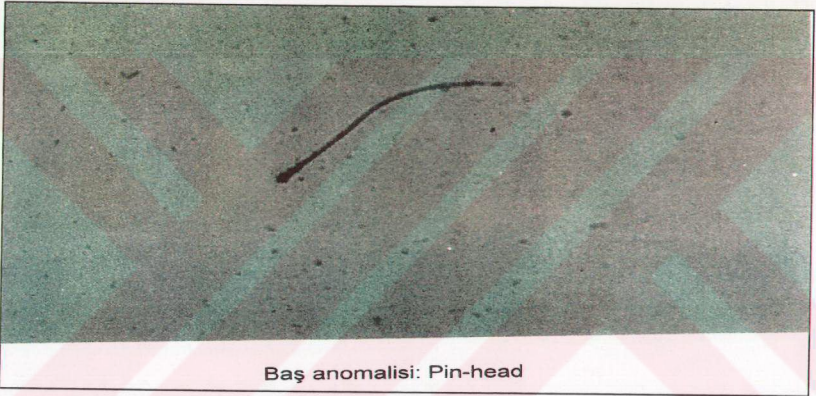
Şekil 11: Kuyruk anomalileri, Kuyruk fibrilleri anomalisi



Şekil 12: Amorf sperm formları



Çift baş

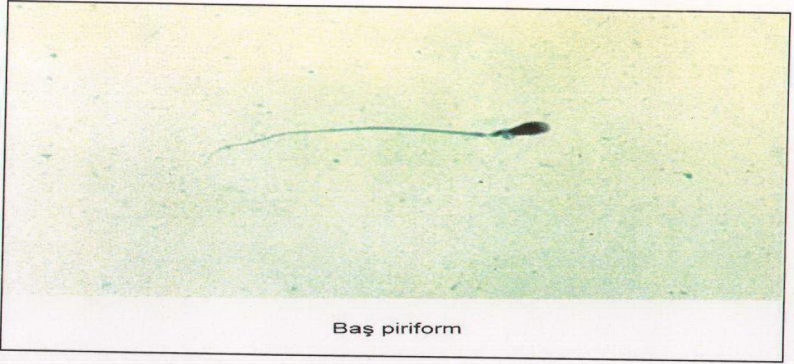


Baş anomali: Pin-head

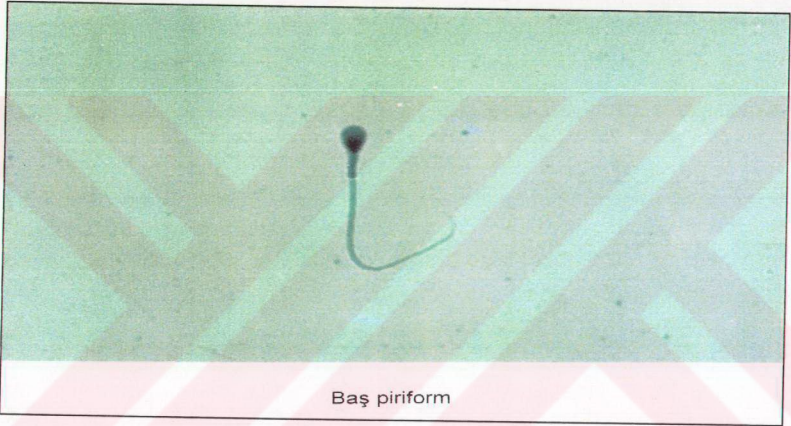


Baş küçük, mid-piece sitoplazmik droplet

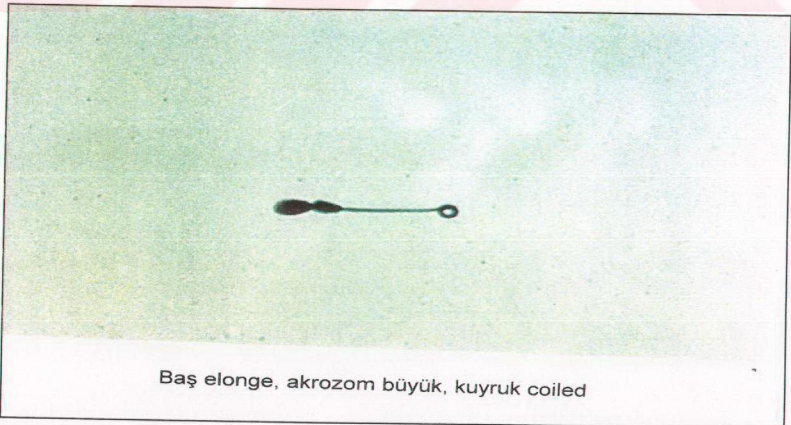
Resim 4,5,6



Baş piriform

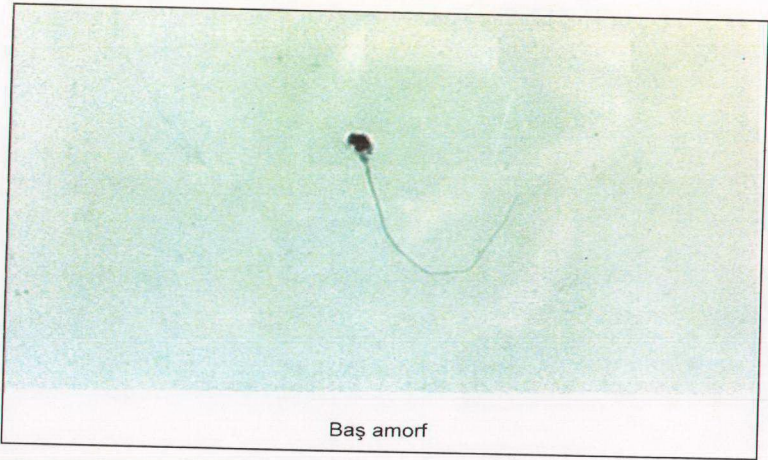


Baş piriform

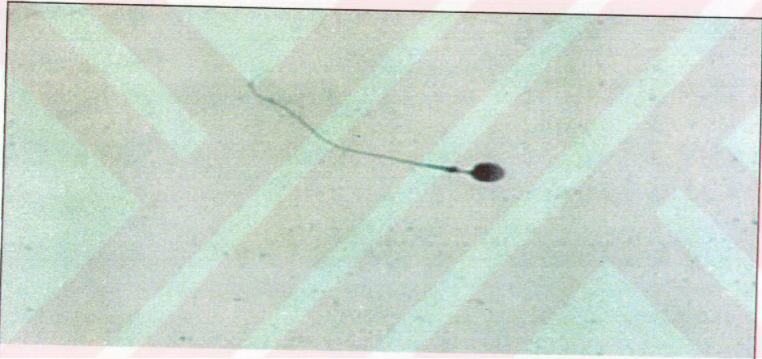


Baş elonge, akrozom büyük, kuyruk coiled

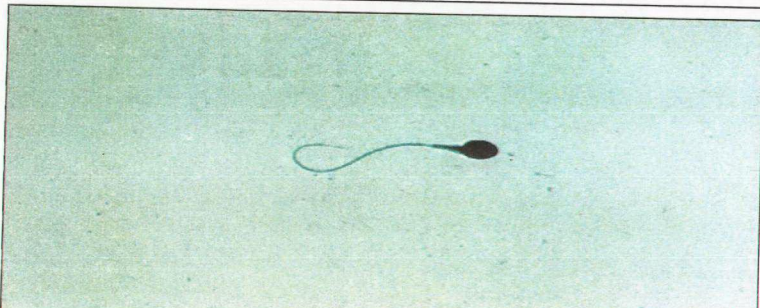
Resim 7,8,9



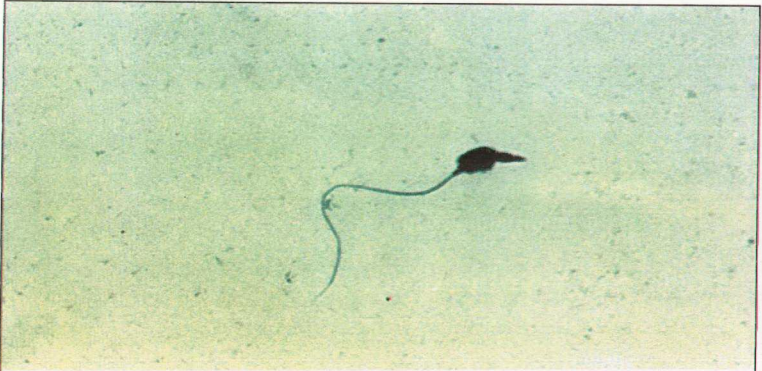
Baş amorf



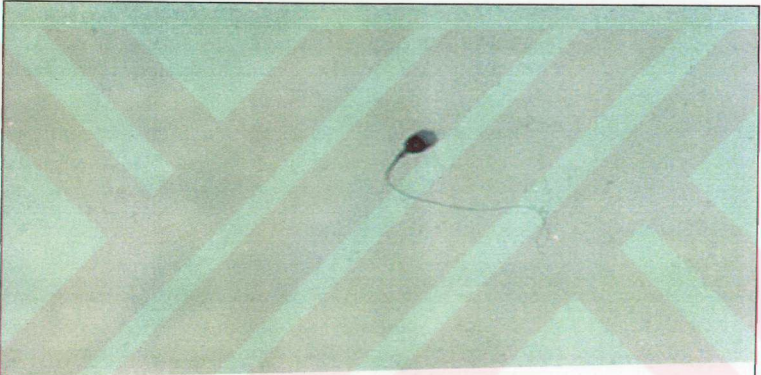
Baş amorf, akrozom büyük, mid-piece segmental aplazi



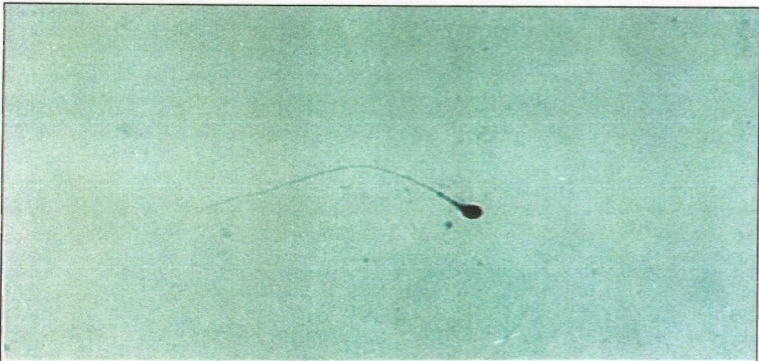
Baş büyük, akrozom küçük, mid-piece non-axial, kuyruk



Baş tapered, mid-piece sitoplazmik droplet

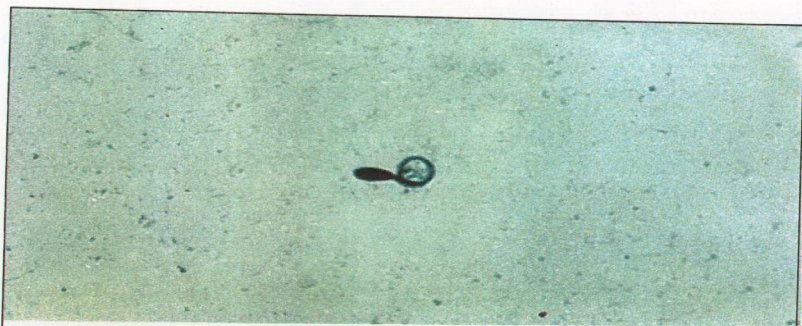


Nükleus kisti, Diadem defekti



Globozoospermi, akrozom yok

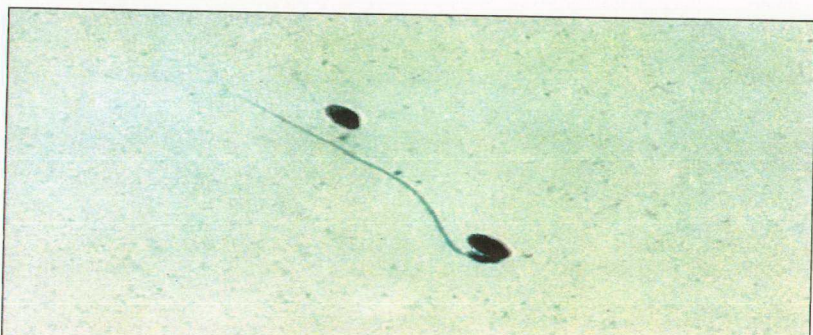
Resim 13,14,15



Mixed anomali: Baş elonge, kuyruk dag defekti



Mid-piece sitoplazmik droplet



Üstteki sperm : Kopuk baş,
Altteki sperm : Mid-piece bend

Resim 16,17,18

SPERM MORFOLOJİ DEĞERLENDİRİLMESİ İÇİN KULLANILAN BOYAMA TEKNİKLERİ

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılabilecek pek çok boyama tekniği WHO tarafından yayınlanan el kitaplarında tanımlanmıştır. Gerek Papanicolaou, Giemza gibi klasik laboratuvarlarda kullanılmakta olan boyalar, gerekse de insan spermi için kullanılan Diff-Quik, Spermac gibi boyalar ile insan spermi morfolojisi değerlendirilebilir. Güvenilir bir morfolojik değerlendirme için kullanılan boyanın ne olduğundan daha çok, değerlendirme tekniğinin nasıl olduğu önemlidir. Değerlendiren kişi hangi boya ile eğitim gördüyse, o boya o teknisyen için en iyi boyadır.

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için farklı boyama teknikleri ileri sürülmüştür. Bunlar arasında Papanicolaou, Giemsa ve Nigrosin-Eosin klasik boyama yöntemleridir. Günümüzde sıklıkla daha kısa sürede yapılan ve sperm morfolojisi hakkında daha detaylı bilgiler veren Spermac ve Diff-Quik gibi hazır boyalar kullanılmaktadır.

Bazı belirgin morfolojik anormallikler boyanmamış semen preparatlarında ışık mikroskobu altında tanımlanabilir. Fakat bu oldukça insensitif bir yöntemdir. Daha ayrıntılı bir morfolojik inceleme faz-kontrast mikroskobu ile yapılabilir. Bununla beraber en doğru değerlendirme için spesimenlerin uygun boya ile boyanması gereklidir. Bir damla semen lam üzerine yerleştirildikten sonra başka bir lamla yayılır. Preparat havada kurutulur; ancak histolojik fiksatif spreylere uygulanması morfolojinin korunması açısından daha iyi sonuç verir. Spesimen daha sonra rutin Papanicolaou (Pap) (9) veya Diff-Quik (10) ile boyanır.

Semen analizinde konsantrasyon ve motilite, boyasız preparatlar ile değerlendirilir. Oysa, sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için sperm hareketlerinin durdurulması ve boyanması gerekmektedir. Sperm boyama teknikleri bölümünde anlatıldığı gibi kullanılan boyanın özelliğine bağlı olarak spermler bir süre fiksatif ve boya maddeleri içinde tutulmakta ve bu esnada spermin özellikle baş kısımları giderek küçülmektedir. Diff-Quik boyalarında bu süre çok kısa olup, sperm boyutları değişmemektedir. Papanicolaou ve Spermac boyalarında bu süre uzun olduğundan küçülme olmakta, ancak

boya kullanılmayan natürel preparatlar ile karşılaştırıldığında, bu küçülme % 95'lik güvenilirlik sınırları dahilinde kaldığından, sorun yaratmamaktadır. Olabilecek tek sorun, bu boyalardan biriyle eğitilen bir teknisyenin diğer boyalarla boyanmış bir preparatı değerlendirmesi esnasında doğabilecek yorum farklılıklarıdır.

Sperm preparatları boyanmasına geçilmeden önce şu bilgiler mutlak hatırlanmalıdır:

- Semen verecek olan hastaya semen verme tekniği iyice anlatılır.
 1. Semen, non-steril kapaklı kutu içine alınır.
 2. Semen alındığı saat ve dakika ve hasta adı, hastanın göreceği şekilde kutu üzerine herhangi bir kalem ile yazılır.
 3. Oda ısısında yarım saat likefaksiyon için beklenir.
- Daha önce Makler Sperm Counting Chamber ile sayılarak 20 milyon/mL'den daha az konsantrasyonda olduğu anlaşılan sperm sayılarında işleme başlamadan önce 10 dakika 1200 rpm santrifüj edilir. Pellet oluşmayan olgularda santrifüj süresi 20 dakikaya veya santrifüj devri 2000 rpm'e çıkarılabilir.
- Oluşan pellet morfoloji için boyanır. Ancak bu işlemin fazla artefakt yaratarak boyama kalitesini bozacağı hatırdan çıkarılmamalıdır.
- Sperm konsantrasyonu 20 milyon/mL'den daha fazla olanlarda bu işleme gerek olmayıp doğrudan boyamaya geçilebilir.
- Lam üzerine sperm yayma esnasında iki lam kullanılır. Birinin üzerine sperm damlacığı konur, ikinci lam ile 45° açı ile bu damlacık çekilerek spermlerin birinci lam üzerine homojen yayılması sağlanır.
- Birinci lam üzerine damlatılacak sperm damlacığının büyüklüğü sperm konsantrasyonuna göre ayarlanmalıdır. Yüksek konsantrasyonda 5 mikrolitre yeterli iken, düşük konsantrasyonlarda 20 mikrolitre damlatılmalıdır. Bunun için hematokrit pipeti veya en ideali volüm ayarlı mikropipet kullanılabilir.
- İki lam arasında 45° açı verilerek, ikinci lam hızlı çekilecek olursa, preparat üzerinde fazla sperm olur. Bu yöntem düşük konsantrasyonlarda uygulanır.

- İki lam arasında 30° açı verilerek, ikinci lam yavaş çekilecek olursa, preparat üzerinde az sperm olur. Bu yöntem yüksek konsantrasyonlarda uygulanır.

SPERM MORFOLOJİ DEĞERLENDİRİLMESİ İÇİN DIFF-QUIK BOYAMA

1. Lam üzerine semen yayılır. Bu işlem için önce hematokrit pipeti ile ufak bir damla lam üzerine yayılır, daha sonra başka bir lam yardımıyla, ince ve homojen yayma yapılır.
2. Bunun kuruması için açık havada ve oda ısısında 20 dakika bekletilir.
3. Lam üzerine yayılıp kuruyan preparatlar Diff-Quik fiksatif solüsyonuna batırılarak 15 saniye bekletilir.
4. Fikse olan spermeler 10 saniye süreyle nükleer boyaya batırılır.
5. Daha sonra 5 saniye süreyle sitoplazmik boyaya batırılır.
6. Değerlendirme, 1000 X büyütmede immersiyon yağı ve objektifi kullanılarak yapılır.

Diff-Quik boyasında fiksatif ve diğer boya maddeleri içinde spermelerin bekletilme süreleri son derece kısadır. Toplam 30 saniye süre içinde boyama işlemi biter. Spermeler boya maddeleri içinde bekletildikleri süre içinde boyut olarak küçülebilirler; Diff-Quik boyasında bu süre çok kısa olduğundan spermelerin küçülmesi söz konusu değildir. Bu nedenle diğer boyalarla karşılaştırıldığında spermeler daha büyük görünürler. Yukarıda değinildiği gibi, her teknisyen eğitim gördüğü boya ile çalışmalıdır, aksi takdirde değerlendirme hataları olabileceği unutulmamalıdır.

KRUGER'İN KESİN KRİTERLERİ

Kruger'in Kesin (Tygerberg) kriterlerinin en önemli özelliği değerlendirmede standardizasyon sağlamış olmasıdır. İlk kez Kruger ve Menkveld (6) isimli araştırmacıların dikkat çektiği bu kriterler, spermelerin in vitro ortamlardaki fertilizasyon potansiyelini belirlemede en sıklıkla başvuru alan değerlendirme yöntemi haline gelmiştir (11). Servikal kanalın en proksimali olan internal ostium'da toplanan spermeler fizyolojik bir süzülme prosesinden

geçmiş homojen bir popülasyon oluştururlar. Bu popülasyon normal sperm kriterleri için örnek oluşturur.

Sperm morfolojisi değerlendirilmesinde her değerlendiren kişinin, değişik zaman aralıklarında yaptığı değerlendirmelerin aynı sonucu vermesi ve değerlendiren değişik kişilerin bu kriterleri esas alması sayesinde yine aynı sonuca varabilmeleri sağlanmıştır. Bu sınıflamaya kesin kriterler denmesinin nedeni, borderline (sınır) formların da "anormal" olarak değerlendirilmeleri ve yalnızca tam kusursuz olanların "normal" olarak kabul edilmeleridir.

Kruger ve ark IVF öncesinde sperm morfolojisini katı kriterler kullanarak fertilizasyon için geçerli bir öngörü saptamaya çalışmışlardır (12). Normal sperm morfolojisinin %4'ün altında bulunduğu olgularda ileri derecede düşük fertilizasyon ve dolayısıyla düşük hamilelik oranları saptanmıştır (12).

Normal morfolojili sperm tanımlaması iki şekilde yapılabilir. WHO'nun tanımlamasına göre morfometrik analiz yapılmaksızın düzgün ve oval bir baş, düzgün orta parça ve kuyruk bulunması normal olarak kabul edilmektedir. İlk kez Kruger tarafından tanımlanan kesin kriterler kullanılarak yapılan sperm morfoloji analizi ise özellikle IVF yapılacak adaylarda daha doğru yönlendirme yapabilmeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Bu sınıflandırmada morfolojileri sınır değerinde olan spermiler de normal dışı kabul edilmekte ve ancak morfometrik olarak normal değerleri taşıyan spermiler normal olarak kabul edilmektedirler. Kruger'in kesin kriterlerine göre bir spermin normal olabilmesi için aşağıdaki parametrelere sahip olması gerekir:

1. Sperm başı ve ovoid ve düzgün sınırlı olmalıdır, iyi sınırlanmış bir akrozomal kılıf içermelidir.
2. Başın boyutları 4-6 x 2-3 x 1.5 mikron olmalıdır.
3. Akrozom başın %40-70'ini kaplamalıdır.
4. Akrozomdan sonra gelen bölümler düzgün olmalıdır.
5. Boyun, orta parça (mid-piece) ve kuyruk anomalisi olmamalıdır
6. Orta parça silindirik ve baş ile aynı doğrultuda bulunmalıdır.
7. Orta parçanın eni 1 mikron, boyu ise başın 1.5 katı olmalıdır.
8. Sitoplazmik artık (droplet) içermemelidir.

9. Kuyruk 45-55 mikron boyunda, düzgün ve orta parçadan daha ince olmalıdır.

Spermin baş kısmı akrozom, hemen bunun altında bulunan ekvatoryal segment ve postakrozomal segmentin geri kalan kısımlarından oluşmuştur. Akrozom içindeki litik enzimleri ile spermin ovumun etrafındaki hücre tabakalarını ve zonayı geçmesini sağlar. Ekvatorial bölge ise spermin ovumu penetrasyonu ve zonayı delmesi esnasında esas rol alan segmenttir. Nükleus ise içindeki DNA'nın sağlamlığına uygun bir morfoloji verir. Bu bölgelerin morfolojik analiz ile gösterilmesi ve değerlendirilmesi, özellikle idiyopatik infertilite olgularında ve yardımcı üreme teknikleri uygulanacaksa çok önem kazanmaktadır. Yuvarlak baş anomalisi akrozom yokluğunun bir göstergesidir. Başta nokta baş ya da küçük baş anomalisi DNA defektini gösterir. Sivri, uzamış başta akrozom defekti bulunabilir. Nükleus anomalileri kromozom bölünmesi anomalisini gösterebilir. Orta kısım anomalileri mitokondri defektine dolayısıyla motilite bozukluğuna işaret eder. Kuyruk anomalileri hareket bozukluğu ve immatürite belirtisi olabilir.

Işık mikroskobu ile incelendiğinde fertil populasyonda gözlenebilecek sperm morfoloji değişiklikleri aşağıdaki oranlarda bulunabilir:

Düzensiz veziküller içeren akrozom	%4
Parsiyel akrozom.....	%3
Parsiyel akrozom ve anormal nükleus.....	%3
Akrozom agenezi.....	%6
Akrozom eksikliği.....	%7
Yuvarlak nükleus.....	%2
Büyük, oval nükleus.....	%2
Amorf nükleus.....	%8
Sivri baş.....	%3
Birden fazla nükleus.....	%1
Ekvatorial segment anomalisi.....	%3
Postakrozomal segment bozukluğu.....	%3
Kromatin degradasyonu.....	%1
Nükleusta büyük vakuol.....	%2

Nükleusta kondansasyon bozukluğu.....	%7
Nükleusta veziküller.....	%16
Nükleusta membran anomalisi.....	%12
Mitokondrial bölge anomalisi.....	%7
Nükleus çevresinde fazla sitoplazma.....	%9
Sitoplazmik fazlalık.....	%33
Subakrozomal sitoplazma birikimi.....	%9
Kuyrukta aksonem anomalisi.....	%4
Kuyrukta kıvrılma.....	%18

Sperm morfolojisi ile fertilitite potansiyeli arasındaki ilişki kesindir.

Kesin kriterlere göre normal sperm morfolojisi gösteren sperm sayısı %14'ün üzerindeyse fertilizasyon oranı %88, %4'ün altında ise %7 olarak bulunmaktadır (12) . WHO kriterlerine göre de normal sperm konsantrasyonu %50'nin üzerindeyse fertilizasyon şansı artmaktadır (13). Sivri sperm başları veya diğer immatürite belirtisi olan morfolojik bozukluklu spermelerin yüksek miktarda bulunması varikozel ya da viral veya bakteriyel enfeksiyonları düşündürür. Çift başlı sperm anomalisi gene varikozelde sık görülür. İmmünolojik reaksiyonlar amorf ve immatür sperm formlarını artırır. Sitoplazma fazlalıklarının bulunması ise epididimal maturasyonda bozulmayı, dolayısıyla epididimal bir patolojiyi gösterir. Kuyruk anomalisi de yine epididimal bir patolojiye işaret edebilir. Bu şekilde değerlendirme her zaman beklenen sonucu vermemekte, başka faktörler de etkileşimde bulunabilmektedir.

Kruger'in kesin kriterleri altında sınıflandırılan sperm morfolojisi, klasik WHO kriterleri ile karşılaştırıldığında İVF sonuçları açısından daha değerlidir. Bu kriterler 1986'da ilk kez yayınlandıktan sonra zamanla değişim göstermiştir. Kimi otörler değişik kriterlerde de aynı terminolojiyi kullanmışlardır (Tablo 1) (7,11,14,15,16).

Tablo 1: Spermin morfolojik sınıflandırmasında kesin kriterler

	KRUGER VE ARK. 1986	KRUGER VE ARK. 1988	MENKVELD VE ARK. 1990	KOBAYASHİ VE ARK. 1991
Uzunluk	Veri yok	5-6 µm	3-5 µm	4-6 µm
Genişlik	Veri yok	2.5-3.5 µm	2-3 µm	2.4-3.5 µm
U/G oranı	Veri yok	Veri yok	1.5-1.67	Veri yok
Boyama	Papanicolaou	Diff-Quik	Papanicolaou	Diff-Quik
Cut-off	Normal fertilizasyon hızı için >%14	Normal fertilizasyon hızı için >%14, çok düşük fertilizasyon hızı için <%4	Veri yok	İVF siklusu başına düşük gebelik hızı için <%12

SPERM MORFOLOJİSİNİN İNFERTİLİTE İLE OLAN İLİŞKİSİ

WHO tarafından tanımlanan normal sperm morfolojisi ile kesin kriterler arasındaki en önemli fark, kesin kriterlere göre değerlendirmede, yalnızca baş kısmı düzgün ve ovoid bir yapıya sahip olan spermelerin "normal" olarak değerlendiriliyor olmasıdır. Kesin kriterlere göre yapılan değerlendirmede, "sınır (borderline) sperm" adı verilen düzgün ovoid baş yapısına sahip, ancak normal boyutlardan daha dar, dolayısıyla ekvatoryal bölümleri daha ince olan sperm de "anormal" olarak yorumlanmaktadır.

Spermin akrozomal kılıfının hemen altında bulunan ekvatoryal segment, akrozomal enzimler içermektedir. Bu özelliğinden dolayı sperm, gerek zona pellucidayı geçerken, gerekse de oollemma ile füzyonu sırasında ekvatoryal bölgedeki enzimleri kullanmaktadır. Kesin kriterlerde bu özellik göz önüne alınmıştır. "Sınır normal" olarak değerlendirilen spermelerde ekvatoryal segmentin dar olması, akrozomal enzim içeriğinin az olmasına neden olabilir. Bu nedenle bu tür sperm "normal" dışı kabul edilmişlerdir. Akrozom anomalileri, sperm-zona pellucida bağlanması ve penetrasyonunda sorun yaratırlar.

Nükleus anomalileri, DNA içerik bozukluğu anlamına gelebilir.

Baş veya mid-piece kısmında sitoplazmik droplet (artık) bulunması immatürite işaretidir. Fertilizasyon bozukluğuna yol açabilir. Sperm başının yuvarlak olması "globozoospermia" genellikle akrozom yokluğu durumunda olur ve immatürite işaretidir. Pin-head ve diadem defekti anomalilerinde nükleusun DNA içeriğinde defekt olması olasılığı vardır. Sperm başının uzun ve sivri olması durumunda (tapered) akrozom yokluğu veya anomalisi olabilir. Uzun sperm başlarında (elonge) postakrozom kısmında incelme söz konusudur, bu akrozomal içerik azalması anlamına gelebilir. İnkomplet seperasyon gösteren spermlerde aynı sperm başı içinde birden fazla nükleus bulunabilir ve bu durumda sperm haploid değildir. İmmatürite işareti olabilir.

Mid-piece (orta kısım) anomalileri, mitokondrilerin yer aldığı bölüm olduğu için çok önemlidirler ve sperm enerjisi desteğinden yoksun kalması söz konusu olabilir. Böylesi bir durumda sperm progresif motiliteden yoksun olabilir veya tümünden immotil olabilir. Mid-piece kısmındaki sitoplazmik droplet (artık) sperm immatür olduğunun işaretidir. Segmental mitokondrial aplazi, bend (kıvrılmış) ve amorf mid-piece durumlarında mitokondri defektlerine bağlı olarak enerji yetersizliği söz konusu olur. Bu spermlerin progresif motilite göstermeleri söz konusu değildir. Non-axial mid-piece durumunda da sperm progresif motilite göstermesi güçleşir.

Kuyruk Anomalileri, total motilite yokluğu veya non-progresif motilite şeklinde hareketlilik bozukluklarına yol açabilen defektlerdir. Çift kuyruk immatürite işareti olabilir ve motilite bozukluklarına yol açabilir. Kuyruğun kısa, uzun ve kalın olması motilite bozukluğu yaratacaktır. Kuyruğa yapışık bir artık olması immatürite işareti olabilir. Dag defekti ve coiled (kıvrık) kuyruk olması, kuyruk mikrofibrillerinin anomalisidir ve progresif motiliteyi engelleyecek yapılardır. İmmatür formlar, primer ve sekonder spermatozoidler veya spermatidler şeklinde olabilirler ve çok nükleuslu yapılardır. Haploid olmayabilirler, ayrıca kuyruksuz formda olabilirler.

Semen sitolojisinde non-sperm hücreler polimorf nükleer lökositler olabilir ve ayrıca bakterilerin varlığı durumunda semen pH'sının etkilenmesi söz konusu olabilir.

Sperm morfolojisinin normal olması, o spermin mutlak fertiliteye sahip olması anlamına gelmez ancak, morfolojinin normal olmadığı spermelerin fertilitelerinin ciddi olarak etkilenmiş olması söz konusudur.

SPERM MOTİLİTESİ

Sperm motilitesinin değerlendirilmesinde 4 önemli faktör bulunmaktadır:

1. sperm kuyruğunun hareket frekansı: kuyruğun biyoelektrik sağlamlığını gösterir.
2. sperm kuyruğunun hareket amplitüdü: kuyruğun mekanik sisteminin sağlamlığını gösterir.
3. spermin ileri gitme hızı: ortamın vizkozitesi ile ilgilidir.
4. spermin yüzme şekli: sperm maturasyonu ve ortamın vizkozitesine bağlıdır.

Sperm motilitesi direk lam-lamel arasına semen konarak Makler cihazı ile veya kompüterize sistemler kullanılarak değerlendirilir. Makler cihazı 10 mikrolitrelik sabit bir hazneye sahiptir (17). Bu nedenle analiz edilen semen volümü daima sabittir. Ayrıca üzerinde bulunan kare bölmeler sayesinde spermatozoanın motilite ve sayısının kantitatif değerlendirmeleri daha kesinlikle yapılabilmektedir. Gelişmiş sperm motilite değerlendirme sistemleri "zaman bağımlı mikrofotografi, multipl görüntülü mikrofotografi ve videomikrografi" esasına göre çalışmaktadır. Kompüterize sistemler ise kısa aralıklarla bir sperm hücresinin katettiği yolu otomatik olarak hesaplar. Ayrıca bu hareketlerin özelliklerini de kaydeder.

Sperm sayısı ve fertilizasyon şansı arasında direkt ilişki vardır (Tablo 2):

Motil Sperm Oranı	Fertillerde görülme oranı
%20.....	% 4
%20-39.....	%10
%40-59.....	% 31
%60 ve üstü.....	% 55

Motil sperm sayısı arttıkça gebelik şansı da yükselmektedir (Tablo 3):

Total Motil Sperm Sayısı (milyon)	Gebelik görülme oranı
1 - 10.....	%11
10 - 20.....	%12
20 - 40.....	%13
40 - 80.....	% 30
> 80.....	% 34

Motil sperm oranı 3 saat içinde en fazla %10-20 azalmalıdır, daha büyük oranda azalması normal değildir. Sperm motilite analizi 37⁰C'de yapılmalıdır. Daha düşük ısıda sperm motilitesi bozulur. Ortam ısısının 23⁰C'den 37⁰C'ye çıkarılmasının spermatozoanın ileri hareketliliğini anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir. Genelde belirtilen oda ısısı kullanımı yanlıştır. Çünkü laboratuvarların ısısı genelde 18⁰ ve 27⁰ C arasında değişmektedir. Oysa sperm için en ideal ısı vücut ısısı olan 37⁰ C'dir.

Motilitenin spermin fertilité kabiliyetinin önemli bir göstergesi olması (18) bu parametrenin daha objektif kriterlerle değerlendirilmesine gerekli kılmaktadır. Bu nedenle spermelerin **forward progresyon dereceleme** olarak bilinen kriterlerle sınıflandırılması spermelerin hareketlerinin videomikrografik yöntemlerle belirlenmesi (19) ve bilgisayar sistemleriyle hareket tipleri ve hızlarını değerlendiren yöntemler (20) geliştirilmiştir.

Motilitenin değerlendirilmesinde forward progresyon sınıflaması sonuçların daha objektif olmasını sağlamaktadır (5,13). Çok sayıda spermin tek bir mikroskop alanında teker teker değerlendirilmesi zordur. Bu nedenle görüntü alanının küçültülmesi veya semenin 37⁰C'de serum fizyolojik ile dilue edilerek görüntü alanındaki sperm sayısının azaltılması gibi teknikler kullanılabilir.

Sperm motilitesinin forward progresyon kriterlerine göre sınıflandırılması:

4. Derece: Tam aktivite, spermeler sağa sola sapmadan düz bir hat üzerinde hızlı bir şekilde hareket ederler. Kuyruk hareketlerini görmek zordur.

3. Derece: Spermiler yine ilerleyici tipte hareket ederler. Fakat hızları daha azdır. Kuyruk hareketleri görülebilir.

2. Derece: Spermiler orta derecede veya zayıf hareketlilik gösterir. Hareketleri genellikle açısız yer değiştirme veya sağa sola sapma şeklindedir.

1. Derece: Spermiler bulunduğu yerde kıvılcıdanma hareketleri gösterirler.

0. Derece: Spermde hiğbir hareket yoktur.

Motilitenin kalitatif derecesi spermilerinin çoğunluğunun gösterdiği hareket özelliği ile ifade edilmektedir ki normalde bu 2. dereceden fazla olmalıdır (3 ve yukarısı). Motilite oranı forward progresyon derecelemede 3. ve 4. derecede hareketli spermilerin toplamının oranı olarak ifade edilir. Bu kalitede hareketli sperm oranı %50'den fazla olmalıdır (21). Motilite %50'den az ise vitalite boyaması (Eosin Y ve Nigrosin) yapılarak motilite azlığının sperm canlılığına mı yoksa çevre şartları gibi başka bir sebebe mi bağlı olduğu araştırılmalıdır. Ölü spermiler Eosin Y ile kırmızıya boyanır, canlı spermiler ise boyanmazlar.

HAREKET AZLIğININ (ASTHENOSPERMİ) SEBEPLERİ:

A- Artefaktlar:

Sperm motilite bozukluğunun artefaktlara bağlı olup olmadığını anlayabilmek için bazı faktörler ekarte edilmelidir. Motiliteyi etkileyebilen faktörler 2 grupta toplanabilirler.

a- Semen elde edilmesiyle ilgili faktörler:

1. Semen prezervatif ile elde edilmişse prezervatifler sperm için toksik materyaller içerebilirler.
2. Semen koitus yardımı ile elde edilmişse materyalin vaginal sekresyonlarla bulurşma olasılığı söz konusudur.
3. Masturbasyon sırasında kullanılan bazı lubrikanlar (sabun, tükürük, kremler) sperme toksik etki yapabilir (22).
4. Eksik materyal elde etme: Ejakulasyon sırasında ejakulatın bir kısmı kap içine alınamayabilir.

5. Materyalin aşırı soğuk veya sıcak ile temas etmesi. Materyalin laboratuara getirilme süresinin aşırı uzun olması.

b- Laboratuardaki teknik faktörlere bağlı durumlar:

1. Kullanılan kaplar, lam, lamel, pipetler ve diğer aletlerdeki aşırı ısı farkları sperme şok etkisi yapabilir (23).
2. Islak, kontamine malzemelerin kullanılması motiliteyi etkileyebilir
3. Yaş preparatlarda uygun olmayan semen kalınlığı motilitenin hatalı değerlendirilmesine sebep olabilir (24).

B-Sperm yapısında anormallikler:

1. Sperm başındaki yapı anormalliği (round head sendromu)
2. Ara parça (mid-piece) anormallikleri
3. Kuvruk anormallikleri (Kartagener sendromu, short tail sendromu)

C-Kalıtımsal faktörler:

1. Spermatojenез sırasında spermin oluşması ve olgunlaşmasıyla ilgili kalıtsal anormallikler
2. Duktal sistemde transportu etkileyen faktörler
3. Prostat ve vezikula seminalis fonksiyon bozuklukları

D-Diğerleri:

1. Varikosel
2. Hemospermi
3. Kromozomal anormallikleri
4. Bakteriyel enfeksiyonlar
5. Anormal pH
6. Bazı metallerin veya iyonların fizyolojik olmayan konsantrasyonlarda semende bulunması (25).

VARİKOSELİN SPERM MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ

Varikosel spermatik kord içinde plexus pampiniformisin dilatasyonudur. Normalde sağlıklı erkeklerin %10-15'inde bulunurken, bu oran infertil erkeklerde %21-41 arasında değişmektedir. Sol tarafta sağa göre daha sıktır. Varikoselin bilateral görülme oranı sağlıklı genç erkeklerde %1'den azken, infertil erkeklerde bu oran %20'yi geçmektedir. Varikosel çeşitli mekanizmalarla testiküler disfonksiyona yol açmaktadır:

1. Oluşan venöz staz sonucunda testiküler basıncı artışı spermatogenezde inhibisyona yol açmaktadır. Normalde skrotal ısı vücut sıcaklığından daha düşüktür. Vücut ısısı ile skrotal ısı arasındaki bu fark varikoseli olan kişilerde azalmıştır. Yapılan çalışmalarda oligozoospermik varikoselli hastalarda intraskrotal ısı varikoseli olmayanlara göre 0.6-0.8cc, intratestiküler ısı 0.7-0.8 cc daha fazla olduğu saptanmıştır (Zorgniotti ve MacLeod 1973). Varikoselin tek taraflı olması durumunda bile her iki testiste de testiküler ısı artmaktadır.
2. Adrenal gland ve böbreklerden toksik metabolitler retrograd akım sonucunda testise ulaşarak spermatogenezini olumsuz yönde etkileyebilir. Yapılan çalışmalarda varikoselli hastalarda internal spermatik venede katekolamin seviyeleri kontrol gruplarına göre daha yüksek bulunurken kortizol ve renin düzeyleri kontrol grupları ile aynı bulunmuştur. Bir diğer çalışmada böbrekten reflü olduğu düşünülen prostaglandin E2 ve F2α'nın internal spermatik ven düzeyleri periferik venöz kana göre daha yüksek bulunmuştur. Varikoselektomi sonrası semende fosfolipaz A2 düzeyinin önemli derecede azalması bu teoriyi desteklemektedir. Prostaglandin F2α hem vazokonstriksiyon ile testiküler kan akımını azaltarak hem de testiste LH reseptörlerine bağlanarak hipospermatogenezine yol açmaktadır.
3. Varikosel nedeniyle oluşan venöz staz intratestiküler hipoksi pH'da azalma ve pCO2'de artmaya neden olarak hipospermatogenezine yol açar.
4. Varikoselli hastalarda hipotalamus-hipofiz-gonadal aksı hormonal disfonksiyon oluşur. Varikosel nedeniyle testis Leydig hücrelerinde testosteron yapımında azalma meydana gelir. Bunun nedeni 17α hidroksi

progesteronu testosterona dönüştüren enzim olan 17α hidroksi progesteron aldolaz enziminin varikoselle birlikte oluşan intratestiküler ısı artışından dolayı fizyolojik etkisini yerine getirememesidir. Serum testosteron seviyesinin azalması ile testosteronun hipofiz ve hipotalamus üzerindeki (-) feed-back etkisi giderek azalır. Böylece FSH ve LH seviyesinde yükselme meydana gelir.

Tüm bu mekanizmaların etkisi altında varikoselde testis histolojisinin immatür germ hücrelerinin deskuamasyonunun eşlik ettiği hipospermatogenez, tubulusların çaplarında azalma ve peritubuler fibrozis, spermatid veya spermatozoid seviyesinde matürasyon arresti gibi değişiklikler görülür. (26, 27)

İNFERTİLİTEDE YARDIMLI ÜREME TEKNİKLERİ

İnfertilite konusunda ilerlemeler ve yeni tekniklere rağmen spermatogenez düzeltmeye yönelik tedavi imkanları halen sınırlıdır. Anormal sperm özellikleri olan erkeklerin fertil olabilme ihtimali az da olsa bulunmaktadır. Sperm sayısı ml de 5 milyonun altında olduğunda normal fertilizasyon ihtimali çok azalmaktadır (28). Ayrıca motilite ve morfoloji anormallikleri de varsa fertilizasyon şansı daha da azalmaktadır. Medikal ve cerrahi tedavilerle infertilitesi düzeltilemeyen hastalarda yardımcı üreme teknikleri olarak adlandırılan metodlarla başarılı neticeler elde edilmesi, son yıllarda infertilite tedavisinde dikkatlerin bu konuya yoğunlaşmasına neden olmuştur.

Belirgin anormallikler gösteren semende bile potansiyel olarak dölleme kapasitesi olan spermilerin bulunabileceğinden hareketle, kaliteli spermilerin çeşitli tekniklerle ayırt edilmesi (sperm processing) ve bunların ovuma ulaşmasındaki bir takım engelleri ortadan kaldırarak in vivo veya invitro yöntemlerle fertilizasyonun sağlanması bu metodların temel prensibini oluşturmaktadır.

Yardımlı üreme teknikleri:

- IUI (Intrauterin inseminasyon)
- IVF (In vitro fertilizasyon)
- GIFT (Gamet intra fallopian transfer)
- ZIFT (Zigot intra fallopian transfer)

Mikromanipulasyon teknikleri:

- ZD (Zona delinmesi)
- PZD (Parsiyel zona disseksiyonu)
- SUZI (Sub zonal injeksiyon)
- ICSI (Intrastoplazmik sperm injeksiyonu)
- TESA (Testiküler spermle asiste üreme tekniği)
- MESA (Mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu ile asiste üreme tekniği)

İNTRAUTERİN İNSEMİNASYON

Intrauterin inseminasyon konsantre, motil spermlerin fertilizasyonun doğal yeri yakınına yerleştirilmesi yapılmaktadır. *Sperm process*, ovulasyon gününün tayin edilmesi aşamalarıdır.

Normal koitten sonra fertilizasyon olabilmesi için mukustan geçerek uterus ve fallop tüplerine ulaşması gerekmektedir. Histerektomi uygulanan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki vaginadaki her 5000 spermin sadece biri servikal mukozaya ulaşmakta ve bunların da ancak üçte biri fallop tüplerine ulaşabilmektedir (29). Yüksek konsantrasyonda motil spermlerin servikal mukusu atlayarak uterus içerisine yerleştirilmesi ile fallop tüplerine ulaşan sperm sayısı çoğaltılıp fertilizasyon ve gebelik ihtimali artırılabilir.

IUI'nun başarı oranları:

Erkek faktör infertilitede IUI yöntemi yıllardır kullanılmasına rağmen etkinliği hakkındaki tartışmalar devam etmektedir. Hipospadias, retrograd ejakulasyon, nörolojik impotans, tedaviye dirençli ağır premature ejakulasyon, ve psikojenik impotanstaki başarısı kesin olup tartışmaya gerek

bulunmamaktadır. Ancak bunların dışındaki çeşitli erkek ve kadın faktör infertilite vakalarında etkinliği mevcut patolojilerin ağırlığı ve tipi ile orantılı olarak çok değişkendir. Bu durum yapılmış çalışmalarda açıkça gözlenmektedir. Genel olarak IUI uygulamalarında %0 ile %66 arasında çok farklı gebelik oranları bildirilmektedir (30). Bu çalışmaların birçoğu kontrollü çalışma özelliğinde değillerdir. IUI için kullanılan spermin kalitesi, sperm processing yöntemi, ovulasyon takip tarzı, sperovulasyonun yapılıp yapılmaması ve kullanılan ovulasyonu stimulasyon maddesi gibi çok sayıda faktör gebelik oranını etkilemektedir. Bu nedenle sonuçlar çok farklı olmakta ve kıyaslanmaları güçlük göstermektedir.

IUI başarısını değerlendirmede bir önemli faktör de bu hastalarda spontan gebeliklerin oluşabilmesidir. Semen anormallikleri olan 584 erkekte yapılan takipte her hangi bir tedavi uygulamaksızın %12.5 oranında spontan gebelik oluştuğu bildirilmiştir (31). IUI ile gebelik oluşturulamamış hastalarda daha sonra spontan gebelik oluşma oranları araştırıldığında elde edilen veriler IUI'nu değerlendirmede önemli ip uçları vermektedir. Bu alışmalarda IUI ile tedavi seanslarından sonra %18 oranında gebelik olmasına karşılık IUI başarısızlığı olan hastaların daha sonraki takiplerinde %14 oranında spontan gebelik oluşmuştur (32). Bunun yanında olgu özelliklerinin standardize edilememesi çeşitli çalışmalarda oldukça farklı sonuçların bildirilmesine neden olmaktadır. Erkek faktör infertilite olgularında normal koit sikluslarında, sperm parametrelerindeki anormalliklerle orantılı olarak %0 ile %2-3 nispetinde spontan gebeliklerin olduğu bildirilmektedir (33,34). Diğer yandan IUI uygulamalarının tedavi edilmemiş kontrollere üstünlüğünün olmadığı da iddia edilmektedir (35).

Kadında servikal mukus üretim ve kalite bozuklukları ve serviks patolojilerinde IUI başarısı diğer patolojilere kıyasla yüksek olmaktadır. Bu gibi durumlarda post-coital test (PCT) tedavi kararı vermede önemli rol oynamaktadır. Erkek faktör infertilitesinde "normal motilite ve morfoloji gösteren oligospermik hastalarda başarı nispeten iyi olmakla birlikte motilite ve morfoloji bozuklukları olanlarda başarı düşüktür (36). IUI da hedef uterus içerisine 5 milyon motil sperm yerleştirmektedir. Sperm sayısı 15 milyonun

altında ve motilitesi iyi olmayan olgularda IUI'nun başarısı düşük olmaktadır (37). Zira bu durumlarda sperm processing ile elde edilebilen motil sperm sayısı düşmektedir.

IUI'nun iyi seçilmiş hastalarda başarısı yanında hekimin bir şeyler yapabilme baskısıyla rasgele kullandığı bir metot olması nedeniyle metodu değerlendirirken dikkatli olmak gerekmektedir.

Intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI):

Spermin oosit sitoplazması içerisine injeksiyonu fertilizasyon işlemlerinin en invazividir ve bu yöntemle penetrasyon için spermin önündeki tüm mekanik engeller aşılmaktadır (38). Oosite travma riski PZD, ZD, ve SUZI' den olmaktadır. Bu yöntemin çok az sperm gerektirmesi, fertilizasyon ve gebelik oranlarının sperm kalitesinden bağımsız olması gibi avantajları mevcuttur (39).

SUZI' de olduğu gibi hazırlanmış spermelerden tek bir sperm mikro enjektörle çekilerek mikropipet ile sabitleştirilmiş ovum içine enjekte edilir. İğne ooplazma içine girdikten sonra bir miktar ooplazma aspire edilir ve sonra sperm enjekte edilir. İşlemden sonra oositler 37 derecede %5 CO₂' li kültür ortamında inkübe edilerek ikinci polar cismin atılması ve pronukleus oluşması ile fertilizasyon takip edilir.

Embriyo transferi:

Fertilizasyon gerçekleştiğinde 3-5 embriyo alınarak steril şartlarda uterus içine IUI'dekine benzer şekilde yerleştirilir ve gebelik belirtileri biyokimyasal olarak takip edilir. Şüphesiz her fertilizasyon ve embriyo gelişmesinden sonra gebelik ortaya çıkmamaktadır. Erkeğe bağlı olmayan infertilitede IVF'de %70-90 fertilizasyon ve embriyo oluşmasına rağmen uterusu transferden sonra ancak %20-30 oranında implantasyon ve gebelik meydana gelmektedir (40). Embriyo transferinden sonra beta hCG seviyesinde yükselme gebeliğin biyokimyasal göstergesidir. Ancak ultrasonda gestasyonel kesenin görülmesi ile gebelik klinik olarak anlaşılır.

OLGULAR VE YÖNTEM

1998 Ocak – 1999 Mayıs tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Aile Planlaması ve İnfertilite ünitesine başvuran 45 erkek hasta çalışmaya dahil edildi. Tüm hastaların infertilite nedeni yapılan başvuruları retrospektif olarak , anamnez ve fiziksel bakı, spermioqram, swim-up sonuçları, Kruger'in kesin kriterlerine göre morfolojik analizi ile gerekli hastalarda skrotal ultrason ile değerlendirildi.

Hastalardan, ejakulat örnekleri 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası, masturbasyon yoluyla alınarak, spermioqram, swim-up sonuçları ile Kruger' in kesin kriterlerine göre morfolojik değerlendirmesi aynı teknisyen tarafından yapıldı. Preparatlar Diff-Quik boyasıyla hazırlandıktan sonra spermin tümünün morfolojik incelemesi yapıldı, değerlendirmeler 1000x büyütme altında yapılarak, değerlendirme sırasında hücre kümelerinin bulunduğu bölgelerdeki spermler değerlendirme dışı bırakıldı, preparatın değişik bölgelerinde minimum 100 hücre sayıldı.

Hastalar 3 gruba ayrıldı; herhangi bir androlojik patoloji saptanmayan, 15 hasta 1. Grubu, %30 veya altı hareketli sperme sahip, normo- veya oligozoospermili izole motilite bozukluğu olan 15 hasta 2. Grubu ve klinik olarak belirgin unilateral veya bilateral varikoseli olan ve ameliyat olmamış 15 hasta da 3. grubu oluşturdu.

İzlemde normal yolla gebe kalamayan çiftlere yardımcı üreme teknikleri kullanıldı. Swim-up sperm processing yöntemi ile elde edilen 1 milyon veya daha yüksek sayılardaki spermlerle en az 3 kez intrauterin inseminasyon (IU) denenen hastalardan başarılı olunamayanlara oositin folikülden aspirasyonu ile eş zamanlı olarak tekrar semen alınarak swim-up sonrası intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) uygulandı. Swim-up sonrası 0-1 milyon arası sperm hücresi elde edilebilen olgulara da direkt ICSI uygulandı.

Fertilizasyon gerçekleşen olgularda embriyo transferinden sonra gebeliğin biyokimyasal göstergesi olarak beta hCG seviyesinde yükselme esas alınarak, tüm olgularda ultrasonda gestasyonel kesenin görülmesi ile gebelik tanısı klinik olarak konuldu.

İstatistik olarak çalışma gruplarının yaş ortalamalarını, sperm morfolojilerini ve kendi aralarındaki sperm sayı, motilite ve swim-up değerlerini karşılaştırmak için Student's t testi; sperm morfolojileriyle bu parametreleri korele etmek için Pearson Korelasyonu uygulandı.

SONUÇLAR

Hastaların ortalama yaşları $34,11 \pm 4.43$ yıl, eşlerinin ortalama yaşları $29,87 \pm 3.42$ yıl ve ortalama infertilite süreleri $7,47 \pm 2.56$ yıldır. Grupların erkeklerin sırayla yaş ortalamaları 34.20 ± 3.39 , 33 ± 3.98 ve 35.13 ± 5.91 olup 1 ve 2. Gruplar arasında anlamlı bir fark yokken ($p=0.408$), 1 ve 3. Gruplar arasında istatistiksel bir fark bulundu ($p=0.048$, $p<0.05$). Ancak bu fark ihmal edilebileceğinden gruplar yaş itibarıyla homojen kabul edildi. Her 3 grubun olgularının Kruger'in kesin kriterlerine göre sperm morfoloji sonuçları Tablo 4,5 ve 6'de verildi.

Tablo 4. Grup 1'in Kruger kriterlerine göre sperm morfolojisi ve fertilizasyon-gebelik sonuçları

1.Grup	Normal(%)	Baş(%)	Boyun(%)	Kuyruk(%)	Sonuç
1	10	84	2	4	Gebe*
2	12	86	0	2	ET**
3	20	78	0	2	Gebe
4	12	80	8	0	Gebe
5	6	94	0	0	ET
6	12	86	2	2	Gebe
7	20	78	2	0	Gebe
8	18	76	4	2	Fert.yok***
9	16	78	4	2	Gebe
10	8	90	0	2	ET
11	4	94	2	0	ET
12	16	80	4	0	Gebe
13	8	90	2	0	Gebe
14	12	80	8	0	Gebe
15	20	78	0	2	Gebe

* : Spontan veya yardımcı üreme tekniklerinin herhangi biriyle gebelik

** : ICSI ile fertilizasyon elde edildikten sonra embriyo transferi (ET) yapılmış ancak gebelik oluşmamış olgular

***: ICSI ile fertilizasyon sağlanamamış olgular

Tablo 5. Grup 2'in Kruger kriterlerine göre sperm morfolojisi ve fertilizasyon-gebelik sonuçları

2.Grup	Normal(%)	Baş(%)	Boyun(%)	Kuyruk(%)	Sonuç
1	8	86	4	2	ET
2	0	100	0	0	ET
3	2	96	2	0	ET
4	4	92	4	0	ET
5	6	92	2	0	ET
6	0	100	0	0	ET
7	2	98	0	0	Gebe
8	0	100	0	0	Fert. Yok
9	3	91	4	2	ET
10	0	100	0	0	Fert. Yok
11	6	94	0	0	ET
12	4	96	0	0	ET
13	3	97	0	0	Fert. Yok
14	1	99	0	0	ET
15	5	94	1	0	Gebe

Tablo 6. Grup 3'ün Kruger kriterlerine göre sperm morfolojisi ve fertilizasyon-gebelik sonuçları

3.Grup	Normal(%)	Baş(%)	Boyun(%)	Kuyruk(%)	Sonuç
1	8	92	0	0	IUI*
2	0	98	2	0	IUI
3	4	96	0	0	IUI
4	0	100	0	0	IUI
5	3	95	2	0	ET
6	14	86	0	0	Gebe
7	6	92	2	0	Gebe
8	4	96	0	0	ET
9	2	98	0	0	IUI
10	4	96	0	0	IUI
11	0	100	0	0	IUI
12	2	94	2	2	IUI
13	6	94	0	0	IUI
14	4	92	2	2	IUI
15	12	86	2	0	Gebe

* : İntrauterin inseminasyon

Spermiogramları normal sınırlarda, androlojik açıdan patoloji saptanmayan 1. Gruptaki 15 olgunun Kruger kriterlerine göre sperm morfolojileri değerlendirildiğinde normal hücre oranı %12.93, baş anomalili hücre oranı %83.47, boyun anomalili hücre oranı %2.50, kuyruk anomalili hücre oranı %1.20 olarak bulundu. Motiliteleri %30 ve altı olan 2. Gruptaki 15

olgunun Kruger kriterlerine göre sperm morfolojileri normal hücre oranı %2.93, baş anomalili hücre oranı %95.67, boyun anomalili hücre oranı %1.13, kuyruk anomalili hücre oranı %0.27 olarak bulundu. Unilateral veya bilateral varikoseli olan 3. Gruptaki 15 olgunun Kruger kriterlerine göre sperm morfolojileri normal hücre oranı %4.60, baş anomalili hücre oranı %94.33, boyun anomalili hücre oranı %0.27, kuyruk anomalili hücre oranı %0,80 olarak bulundu (Tablo 7).

Tablo 7. Grupların Kruger kriterlerine göre morfolojik dokümantasyonu

	Normal (%)	Baş (%)	Boyun (%)	Kuyruk (%)
1. Grup	12.93	83.47	2.50	1.20
2. Grup	2.93	95.67	1.13	0.27
3. Grup	4.60	94.33	0.27	0.80

Grupların ml'de sperm sayıları, motilite ve swip-up sonuçlarına göre sperm morfoloji yüzdeleri Tablo 8,9, ve 10'de verildi.

Tablo 8. Grup 1'in sperm dansiteleri ve motiliteleri ile swip-up sonuçlarının Kruger kriterlerine göre normal sperm morfolojisi oranları

1.Grup	Sayıxmil/ml	Hareket (%)	Swip-up (mil)	Normal Morfoloji (%)
1	30	60	16	10
2	72	70	65	12
3	90	70	15	20
4	85	60	15	12
5	25	60	10	6
6	95	70	35	12
7	140	70	25	20
8	45	65	25	18
9	42	70	28	16
10	30	65	3	8
11	100	65	10	4
12	44	70	23	16
13	75	75	35	8
14	95	60	22	12
15	95	70	30	20

Tablo 9. Grup 2'in sperm dansiteleri ve motiliteleri ile swip-up sonuçlarının Kruger kriterlerine göre normal sperm morfolojisi oranları

2.Grup	Sayıxmil/ml	Hareket (%)	Swip-up (mil)	Normal Morfoloji (%)
1	30	30	8	8
2	8	20	0	0
3	1,5	10	1	2
4	8	20	6	4
5	5	30	0	6
6	6,8	20	0	0
7	10	30	1	2
8	16	0	0	0
9	18	20	4	3
10	1,5	30	0,5	0
11	4	30	1	6
12	1	25	0	4
13	4	20	2	3
14	6	15	1	1
15	12	30	2	5

Tablo 10. Grup 3'ün sperm dansiteleri ve motiliteleri ile swip-up sonuçlarının Kruger kriterlerine göre normal sperm morfolojisi oranları

3.Grup	Sayıxmil/ml	Hareket (%)	Swip-up (mil)	Normal Morfoloji (%)
1	12	60	4	8
2	4	55	1,5	0
3	12	70	20	4
4	12	65	6	0
5	10	52	2	3
6	4	60	4	14
7	50	70	38	6
8	1	70	0	4
9	10	40	1	2
10	11	50	1	4
11	22	40	8	0
12	10	60	4	2
13	30	50	2	6
14	25	65	1	4
15	5	68	1	12

Bu oranlar karşılaştırıldığında 1. grupta ortalama 70.87 mil/ml sperm, %66.7 hareket, swim-up sonrası 23.80 mil sperm elde edilirken normal morfoloji %12.93 olarak kaydedildi. 2. Grupta ortalama 8.79 mil/ml sperm, %22.00 hareket, swim-up sonrası 1.77 mil sperm elde edilirken normal

morfoloji %2.9 olarak kaydedildi. 3. Grupta ortalama 14.53 mil/ml sperm, %58.33 hareket, swim-up sonrası 6.23 mil sperm elde edilirken normal morfoloji %4.60 olarak kaydedildi (Tablo 11).

Tablo 11. Grupların sperm sayısı, hareket ve swim-up sonrası değerleri ile Kruger kesin kriterlerine göre morfoloji yüzdeleri

	Sayı (mil/ml)	Hareket (%)	Swim-up (mil/ml)	Morfoloji (%)
Grup 1	70.87	66.67	23.80	12.93
Grup 2	8.79	22.00	1.77	2.93
Grup 3	14.53	58.33	6.23	4.60

Kontrol grubu olgularının sperm morfolojileri normal olanları, izole motilite bozukluğu ve varikoseli olan gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.000$). Ancak böyle bir fark 2. ve 3. Gruplar arasında mevcut değildi ($p=0.313$).

1. ve 2. Grupların sperm sayısı, motilite ve swim-up değerleri arasında anlamlı fark mevcutken ($p<0.01$), 2. ve 3. Grupların sperm sayısı ve swim-up değerleri arasında böyle bir fark bulunmadı ($p=0.145$, $P=0.115$). Tüm grupların motilite açısından birbirleriyle arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.000$). Ayrıca Pearson korelasyonuna göre normal morfoloji oranlarıyla grupların sperm sayısı, motilitesi ve swim-up değerleri anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0.000$). Bu grupların Kruger kriterlerine göre normal morfolojili sperm yüzdeleri de (%12.93, %2.93 ve %4.60) birbirine göre anlamlı farklar oluşturduğundan hipomotilitesi olan infertil erkeklerde Kruger kesin kriterlerine göre normal morfoloji oranları da düşük beklenebilir.

Kruger'in kesin kriterlerine göre sperm morfolojileri elde edilen 3 gruptaki olguların fertilizasyon ve gebelik oranları sırasıyla 1. Grup için %93.33 ve %66.67, 2. Grup için %80 ve %13.33, 3. Grup için %33.33 ve %20 olarak bulundu. Ancak Kruger kriterlerine göre fertilizasyon ve gebelik oranları, spontan gebelik bildirilen ve mikromanipulatif yardımcı üreme tekniği olarak ICSI uygulanan olguların oluşturduğu serilerde anlamlı olacağından bu koşullara uygun 1. ve 2. grup karşılaştırıldı (Tablo 12).

Tablo 12. Grup 1 ve 2'nin normal sperm morfoloji oranlarıyla fertilizasyon ve gebelik hızları

	Normal Morfoloji	Fertilizasyon	Gebelik
Grup 1	%12.93	%93.33	%66.67
Grup 2	% 2.93	%80	%13.33

Buna göre 1.grupta 14 olguda fertilizasyon (%93.33), 10 olguda gebelik (%66.67) elde edildi. 2. grupta ise 12 fertilizasyon sağlanırken sadece 2 olguda gebelik (%13.33) saptandı. Özellikle 2. Grubun fertilizasyon sonuçları literatüre göre daha iyi görünse de gebelik hızları literatürle uyumludur. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı da olsa ($p=0.000$), hasta sayılarının azlığı nedeniyle bu çalışmada prediktif bir cut-off değeri vermek mümkün değildir.

TARTIŞMA

Spermiogramlarındaki motilite yüzdeleri açısından anlamlı bir fark bulunmadığından 1. ve 3. grupların normal sperm yüzdeleri arasındaki fark da varikoselin morfoloji üzerine direkt etkisiyle açıklanabilir. Bu gruptaki hastalarda fertilizasyon ve gebelik sonuçları hakkında sadece spontan gebelik bilgilerine ulaşılabildi. Çünkü büyük çoğunluğuna IUI uygulandığından fertilizasyon ve gebelik oranlarına maternal faktör etkisi ekarte edilemedi, en azından ICSI de olduğu gibi bir standardizasyon sağlanamadığı için bu grup hastalar değerlendirme dışı bırakıldı. IUI için kullanılan sperm kalitesi, sperm processing yöntemi, ovulasyon takip tarzı, süperovulasyonun yapıp yapılmaması ve kullanılan ovulasyonu stimülasyon maddesi gibi çok sayıda faktör gebelik oranını etkilemektedir. Bu nedenle sonuçlar çok farklı olmakta ve kıyaslanmaları güçlük göstermektedir. Bu hastalarda sadece elde edilen spermiogram ve swim-up değerleriyle Kruger'in kesin kriterlerine göre sperm morfolojileri bakılabildi. Sonuçlar kısmında verildiği üzere bu parametreler açısından kontrol grubu ile anlamlı farklar kaydedildi.

Literatürde motilite azaldıkça ve anormal morfolojili spermilerin oranı arttıkça fertilizasyonun azaldığı gösterilmiştir (41). Genel olarak sperm konsantrasyonu ml'de 10-20 milyondan az ve motilite %30-40'ın altında

olduğunda fertilizasyon oranları düşmektedir (42). Motil sperm konsantrasyonları ile IVF deki fertilizasyon oranlarının araştırıldığı bir çalışmada motil sperm sayısı 12 milyon/ml üzerinde olduğunda fertilizasyon oranı %87, motil sperm 6-12 milyon/ml olduğunda %77, motil sperm sayısı 5 milyon/ml altında olduğunda ise %47 olarak tespit edilmiştir (43).

Sperm motilitesi eşit fakat kesin kriterlere göre normal morfoloji oranları %14' ün üzerinde ve altında olan 2 grupta IVF uygulaması sonucunda fertilizasyon oranları sırasıyla %76 ve %63.9 bulunmuştur (16). Kruger'in kesin morfoloji kriterlerinin tek parametre olarak ele alındığı bir diğer IVF çalışmasında normal morfoloji oranı %14 üzerindeki grupta %94 fertilizasyon, %43,9 gebelik; %3-14 arasında normal morfoloji gösterenlerde %85.7 fertilizasyon, %33.3 gebelik, %4' ün altında normal spermleri olan grupta ise %14.5 fertilizasyon, %6.6 gebelik oranları tespit edilmiştir (6).

Donnelly ve ark. yaptığı bir çalışmada (44) sperm motilite ve morfolojisinin IVF ve gebelik oranlarına etkisi araştırılmış. %50 baz alındığında bunun üstü ve altı fertilizasyon oranlarının motilite parametreleri ve persentil normal morfoloji değerleriyle korele olduğu saptanmış. Bu parametrelerin IVF sonuçlarının tahmininde belirleyici rol oynadığı ileri sürülmüş. Yardımlı üreme tekniklerinde sperm morfolojisinin belirlenmesinin gerekliliği üzerinde durulmaktadır. Hatta bir IVF siklusunun sonucunu öngörmek için en belirleyici faktörün sperm morfolojisi olduğu bildirilmiştir (6,45,46). Ancak hala sperm morfolojisindeki herhangi bir defektin spermin fertilizasyon yeteneğini ne oranda etkilediği ya da böyle bir defektin normal bir sperm popülasyonunda hangi oranda bulunduğu belirsizliğini korumaktadır. Fertilizasyonda olduğu gibi gebelik oranları da sperm morfolojisiyle doğru orantılıdır. Sperm morfolojisi motilite ve konsantrasyondan bağımsız olarak spermin fertilizasyon kapasitesini gösteren bir biyomarker'dır. Kesin kriterlerin uygulanmasıyla teratozoospermia (47) ve astenozoospermi (6) olgularında da normal morfoloji cut-off değeri %4 alındığında fertilizasyon ve gebelik oranları anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Bir grup çalışmada morfolojinin fertilizasyon üzerine daha sınırlı belirleyici etkisi olduğu ileri sürülmüştür

(48,49). Bu farklı sonuçlar, boyama tekniklerindeki, sperm hazırlama protokollerindeki ve morfoloji sınıflandırma sistemlerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (6,17). Literatürde Kruger (6) ve Yue ve ark. (46) yaptığı 2 ayrı çalışma da Donnelly'nin sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Embriyo kalitesi de sperm morfolojisinden özellikle baş anomalilerinden etkilenmektedir (44).

Sevenster ve ark. 1990 yılında yaptıkları bir çalışmada normal sperm morfolojisinin %15'in altında olduğu olgularda İVF sonuçlarını araştırmışlar (49). Bu retrospektif çalışmada sadece erkek faktöründe morfolojik bozukluk olan olgular çalışılmış. Hastalar, 1. grup normal morfolojisi %0-5, 2. grup %6-10 ve 3. grup %11-14 olarak üç gruba ayrılmış. Sırayla oosit fertilizasyon hızları %76.9, %82.2, %83.7 iken kontrol grubunun ise %78.8 olarak bulunmuş. Rogers ve ark. infertil erkeklerin %73'ünü sperm sayıları ve motilitesi normal olduğu halde morfolojilerinin bozuk olduğunu bildirmişlerdir (1). Değişik çalışmalarda normal sperm morfolojisinin %15'in altında olduğu olgular fertilizasyon ve klivaj hızları açısından değerlendirilmiş (50). Mahadevan ve Trounson (51) morfolojik olarak anormal sperm yüzdesinin fertilizasyon hızıyla anlamlı ölçüde ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Kruger ve ark. (6) normal sperm morfolojisinin %15'in altında olduğu olgularda fertilizasyon hızının %37'lerde kaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada alınan sonuçlar tüm gruplarda kontrol grubuyla benzer sonuçlar vermişlerdir. Kruger'in çalışmasında hiç gebelik rapor edilmezken Sevenster'ın çalışmasında normal sperm morfolojileri %5-14 arasında olan gruplarda toplam 8 gebelik (%10) bildirilmiştir. Ancak normal sperm morfolojisi %11'in altındaki olgularda gebelik hızı %4'lere düşmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmamızda infertilite nedeniyle başvuran çiftlerde erkek faktörünün fertilizasyon ve gebelik sonuçlarına etkisini önceden tahmin etmeyi mümkün kılabilen bir parametre olarak Kruger'in kesin kriterlerine göre belirlenen normal morfolojili sperm sayısının önemi vurgulanmıştır. Kullanımı başlangıçta zor görünse de iyi bir boya seçimi ve uzmanlaşmış bir laboratuvar ekibi ile pratikte kolaylıkla yerini alabilen bu tetkik erkek infertilitesinin araştırılmasında geçerliliğini sürdürmelidir.

ÖZET

Her birinde 15 erkek hasta kaydıyla normal spermiogram değerlerine sahip urolojik patolojileri olmayan olgulardan 1. grup, spermiogramlarında hipomotilite saptanan normo- veya oligozoospermili olgulardan 2. grup ve klinik olarak belirgin unilateral veya bilateral varikoselli, ameliyat olmamış olgulardan da 3. grup oluşturuldu. Tüm hastaların spermiogramları yanı sıra swim-up'ları ve Kruger'in kesin kriterlerine göre morfolojik incelemeleri yapıldı. Fertilizasyon ve gebelik sonuçları dokümente edildi.

Kesin kriterlere göre gruplarda normal sperm morfolojileri sırasıyla %12.93, %2.93 ve %4.60 bulundu. Buna göre 1.grupta 14 olguda fertilizasyon (%93.33), 10 olguda gebelik (%66.67) elde edildi. 2. grupta ise 12 fertilizasyon sağlanırken sadece 2 olguda gebelik (%13.33) saptandı. 3. Grupta yardımcı üreme tekniği olarak çoğunlukla IUI kullanıldığından diğer gruplarla sadece spermiogramları ve kesin kriterlere göre morfoloji sonuçları karşılaştırıldı. Buna göre sperm sayıları, motiliteleri ve swim-up değerleri 1.gruba göre düşük olan 2. ve 3. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken Kruger'in kesin kriterlerine göre sperm morfolojilerinde de anlamlı korelasyon saptandı.

Sonuç olarak erkek faktörüne bağlı infertilitede spermiogram parametreleri ve swim-up değerleriyle, Kruger'in kesin kriterlerine göre bakılan sperm morfolojisinin korelasyon göstermektedir. Fertilizasyon ve gebelik oranları açısından bu kriterlere göre bakılan sperm morfolojisi önemli bir parametredir. Ancak belirli bir cut-off değeri elde etmek için daha geniş ve homojen hasta gruplarıyla çalışılmalıdır.

REFERANSLAR

1. Rogers BJ, Bentwood H, Van Campen G, Helmbrecht D, Soderdahi D, Hale RW: Sperm morphology assesment as an indicator of human fertilizing capacity . J Androl 1983; 4:119-125
2. Hinting A, Comhaire F, Vermeulen L, et al: Value of sperm characteristics and the result of in vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction. Int J Androl 1990; 13: 59-64
3. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple (1983). Rowe PJ, Hargreave TB, Mellows HJ, Comhaire FH (eds), Cambridge, Cambridge University Press
4. WHO laboratory manual for the examination of semen and sperm cervical mucus interactions (1992). Cambridge, Cambridge University Press, 3rd ed.
5. Macleod J: The semen examination. Clin Obstet Gynaecol 1965; 8:115-21
6. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH , Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *vitro* fertilization. Fertil Steril 1986; 46:1118-23
7. Menkveld, R., Stander, F.S.H., Kotze, T.J.W., Kruger, T.F. and van Zyl, J.A.: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to strict criteria. Hum Reprod, 1990; 5: 586-92
8. Sperm Morfoloji Atlası (1995). Orhon E (editör). Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları No:4
9. Macleod J: Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. Int J Fertil 1964; 9:1281-5
10. Kruger TF, Ackerman SH, Simmons KF, et al: A quick reliable staining technique for sperm morphology. Arch Androl 1987; 18: 275-8
11. Check JH, Adelson HG, Schubert BR, et al. Evaluation of sperm morphology using Kruger's strict criteria. Arch Androl 1992; 28: 15-7
12. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al: Predictive value of abnormal sperm morfology in in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49:112-7

13. WHO: Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction (1987). Cambridge University press, 6, 2nd ed.
14. Barratt CLR: On the accuracy and clinical value of semen laboratory tests. Hum Reprod, 1995; 10(2): 247
15. Kobayashi T, Jinno M, Sugimura K, Nozawa S, Sugiyama T, and Iida, E.: Sperm-morphological assessment based on strict criteria and *in vitro* fertilization outcome. Hum Reprod, 1991; 6: 983
16. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF and Oehninger S: Predictive value of abnormal sperm morphology (strict criteria) in *in vitro* fertilization. Fertil Steril, 1988; 49:112-7
17. Makler A: The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility. Fertil Steril, 1980; 5: 586-92
18. MacLeod J: Human male infertility. Obstet Gynecol Surv 1971; 26:335
19. Katz DF, Overstreet JW: Sperm motility assessment by videomicrography, Fertil Steril 1981; 35:188
20. Overstreet JW, Katz DF: Semen Analysis. Urol Clin North Am 1987; 14: 441
21. Bongso TA, Ng SC, Mok H, et al: Effect of sperm motility on human *in vitro* fertilization. Arch Androl 1989; 22: 185-90
22. Goldenberg RL, White R: The effect of vaginal lubricants on sperm motility *in vitro*. Fertil Steril 1975; 26:872
23. Appel RA, Evans PR: The effect of temperature on sperm motility and viability. Fertil Steril 1977; 28:1329
24. Makler A: The thickness of microscopically examined seminal samples and its relationship to sperm motility estimation. Int J Androl 1978; 1:213
25. Kesseru E, Leon F: Effect of different solid metals and metallic pairs on human sperm motility, Int J Fertil 1974; 19:81
26. Sigman M. Howards S.: Varicocele, In : Campbell's Urology. Ed: Walsh PC, Gittles RF et al. Philadelphia WB Saunders Co. pp:682, 1992(K SF:959)

27. Turek PJ, Lipshultz IL: The Varicocele Controversies 1. Etiology and Pathophysiology. In AUA Update Series. Ed:Ball P.T., Donald E.N. pp: 106-1, 1995
28. Jouanner P, Feneaux D: Sperm Analysis. *Ann Biol Clin* 1987; 45:335
29. Settlage DS, Motoshima M, Treadway DR: Sperm transport from the external cervical os to the fallopian tubes in women : A time and quantitation study, *Fertil Steril* 1973; 24:655
30. Belker Am, Cook CL: Sperm processing and intrauterine insemination for oligospermia, *Urol Clin North Am* 1987; 14:597
31. Aafjes JK, Vijfer JC, Schenck PE: The duration of infertility: an important datum for the fertility prognosis of men with swim up abnormalities. *Fertil Steril* 1978; 30:423
32. Nachtigall RD: Artificial insemination: Current Concepts, In: Contemporary Management of Impotence and Infertility, Tanagho EA, Lue TF, McClure RD (Ed), Williams and Wilkins Co, Baltimore, 313, 1988
33. Kerin J, Peek J, Warnes G: Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen, *Lancet* 1984; 1:533
34. Velde ER, Kooy RJ, Waterreus JH: Intrauterin insemination of washed husband's spermatozoa: A controlled study, *Fertil Steril* 1987; 47:259
35. Allen N, Herbert C, Maxon W: Intrauterine insemination: a critical review, *Fertil Steril* 1985; 44:569
36. Davajhan V: Intrauterin insemination, In: Common problems in infertility and Impotence, Rajfer J (Ed), Year Book Med Pub, Chicago, 83,1990
37. Brody S, Gibbons WE, Lamb DJ: Assisted reproductive techniques in the treatment of male infertility, In: Male infertility Lipshultz LI, Howards SS, (Ed), Mosby Year Book (1978) 30: 510
38. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, et al: A preclinic evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes, *Fertil Steril* 1988; 49: 835
39. Schlegel PN: Micromanipulation of gametes for male factor infertility, *Urol Clin North Am* 1994; 21: 477

40. Sigman M: Assisted reproductive techniques and male infertility, Urol Clin North Am 1994; 21:505
41. Mahadevan M, Tounson AO, Wood C: Effect of oocyte quality and sperm characteristics on the number of spermatozoa bound to zona pellucida of human oocytes inseminated in vitro. J In Vitro Fert Embryo Transfer 1987; 4:223
42. Jouanner P, Feneaux D: Sperm Analysis, Ann Biol Clin 1987; 45:335
43. Yovich JN, Stanger JD: The limitations of in vitro fertilization from males with severe oligospermia and abnormal sperm morphology. J In Vitro Fert Embryo Transfer 1984; 1: 172.
44. Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, et al: In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. Fertil Steril 1998; 70(2): 305-14
45. Liu DY, Baker HWG. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. J Reprod Fertil 1992; 94: 71-84
46. Yue A, Meng FJ, Jorgensen N, et al: Sperm morphology using strict criteria after Percoll density separation. Hum Reprod 1995; 10: 1781-5
47. Enginsu ME, Dumoulin J, Pieters M, et al: Evaluation of human sperm morphology using criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. Human Reprod 1991; 6:854-9
48. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, et al: Estimating fertility potential via semen analysis data. Hum Reprod 1993; 8: 65-70
49. Robinson JN, Lockwood GM, Dokras A, et al: Does isolated teratozoospermia affect performance in in vitro fertilization and embryo transfer? Hum Reprod 1994; 9:870-4
50. Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simmons, K.F: A new method of evaluating sperm morphology with predictive value for IVF, Urology 1987; 30: 248-51
51. Mahadevan M, Tounson AO: The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. Fertil Steril 1984; 42: 400-5