



T.C.

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hasan CÜCE

**ERKEK GERM HÜCRELERİNİN MORFOLOJİSİNİN FARKLI HİSTOLOJİK
BOYALARLA IŞIK MİKROSKOBU DÜZEYİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Emine AKSOY

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. T. Murad AKTAN

KONYA- 2008

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Hasan CÜCE

ERKEK GERM HÜCRELERİNİN MORFOLOJİSİNİN FARKLI HİSTOLOJİK
BOYALARLA IŞIK MİKROSKOBU DÜZEYİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Emine AKSOY

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. T. Murad AKTAN

KONYA- 2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR.....	V
TABLO DİZİNİ.....	VII
ŞEKİL DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 İNFERTİLİTE.....	2
2.1.1 İnfertiliteye yol açan nedenler.....	2
2.2 ERKEK GENİTAL SİSTEMİ.....	6
2.2.1 Genital Sistem Embriyolojisi.....	6
2.2.1.1.Gonadlar.....	7
2.2.1.2 Testisler.....	9
2.2.1.3 Genital Kanallar.....	10
2.2.1.3.1 Farklanmamış evre.....	10
2.2.1.3.2 Genital kanalların Gelişiminin Moleküler düzeyi.....	11
2.2.1.3.3.Genital Kanallar ve Bezlerin Gelişimi.....	12
2.2.1.4 Dış Genital Organlar.....	12
2.2.1.4.1 Farklanmamış Evre.....	12
2.2.1.4.2 Erkek Dış Genital Organların Gelişimi.....	13
2.2.2 Erkek Genital Sistemi Anatomisi, Histolojisi.....	14
2.2.2.1 Testisler.....	14
2.2.2.2 Epididimis.....	17
2.2.2.3 Duktus Defferens.....	18
2.2.2.3.1 Funikulus Spermatikus.....	18
2.2.2.4 Duktus Ejakulatoryus.....	19
2.2.2.5 Gl. Vesikülosa.....	19
2.2.2.6 Gl. Prostatika.....	20
2.2.2.7 Gl. Bulboüretalis.....	21
2.2.3 Semen.....	22

2.2.4 Spermatogenezis, Spermiyogenezis.....	22
2.2.5 Spermatozoa.....	25
2.3 SPERMATOZOA MORFOLOJİSİ ve FERTİLİZASYONDAKİ ROLÜ.....	28
2.3.1 WHO 1980 Sınıflaması.....	31
2.3.2 WHO 1987 Sınıflaması.....	31
2.3.3 David'in Çok Girişli Sınıflaması.....	31
2.3.4 Basitleştirilmiş Çok Girişli Sistem.....	32
2.3.5 David'in Çok Girişli Sınıflamasının Modifikasyonu.....	32
2.3.6 Tygerberg Kesin Kriter Sınıflaması.....	32
2.3.7 WHO 1992 Sınıflaması.....	33
2.4 SPERMATOZOA MORFOLOJİSİNİN KLİNİK ÖNEMİ.....	34
2.5 ANORMAL SPERMATOZOA TANIMLAMASI.....	34
2.5.1 Baş Şekli Anomalileri.....	34
2.5.2 Akrozom Anomalileri	35
2.5.3 Nükleus Anomalileri.....	36
2.5.4 Mid-piece Anomalileri.....	36
2.5.5 Kuyruk Anomalileri.....	36
2.5.6 Karışık Anomaliler.....	37
2.6 Spermatozoa Analizi.....	37
2.6.1 Normal spermatozoa Analizi değerleri.....	38
2.7 Boyalar.....	39
2.7.1 H-E.....	39
2.7.2 Eosin.....	39
2.7.3 T. Blue.....	39
2.7.4 Giemsa.....	40
2.7.5 Wright.....	40
2.7.6 Weigert'in Demirli Hematoksilen boyası.....	41
2.7.7 Orange G.....	41
2.7.8 Anilin Blue.....	42
2.7.9 Shorr Metodu.....	42
2.7.10 Papanicolau Metodu.....	42
2.7.11 Berg Metodu.....	42
2.7.12 Light Green.....	43

2.7.13 Akridine Orange.....	43
2.7.14 Janus Green.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
4. BULGULAR.....	47
4.1 H-E Boyası.....	47
4.2 T. Blue Boyası.....	47
4.3 Giemsa Boyası.....	47
4.4 Wright Boyası.....	50
4.5 Weigert'in Demirli Hematoksilen Boyası.....	50
4.6 Orange G Boyası.....	50
4.7 Eosin- Anilin Blue Boyası.....	50
4.8 Shorr Metodu.....	53
4.9 Papanicolau Boyası.....	53
4.10 Berg Metodu.....	53
4.11 Light Green Boyası.....	53
4.12 Akridine Orange Boyası.....	53
4.13 Janus Green Boyası	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
6. ÖZET.....	76
7. ABSTRACT.....	78
8. KAYNAKLAR.....	79
9. TEŞEKKÜR.....	87

KISALTMALAR

A	: Arter
AMH	: Antimüllerian hormon
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
AO	: Acridine Orange
ASA	: Anti Sperm Antikor
CASMA	: Bilgisayar yardımlı sperm morfometrik analizi
CMA 3	: Chromamycine A3
DBCP	: Dibromokloropropan
F	: Fasia
FSH	: Follikül Stimüle Hormon
GIFT	: Gamet İntra Fallopian Transfer
GL	: Glandula
H-E	: Hematoksilen- Eozin
ICSI	: İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IM	: Işık Mikroskobu
ISAS	: Integrated Semen Analysis System
IUI	: İntra Uterin İnseminasyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
L	: Lamina
LH	: Luteinize Hormon
Lig	: Ligament
M	: Muskulus
MESA	: Mikrocerrahi olarak Epididimal Sperm Aspirasyonu
MIS	: Müllerian inhibe edici madde
N	: Nervus
ODF	: Outer dense fiber
PESA	: Perkutan Sperm Aspirasyonu
PI	: Pleksus
PZD	: Parsiyel Zona Diseksiyonu
R	: Ramus
SCSA	: Sperm Chromatin Structure Assay
Sp Ad	: Spermatogonyum A dark

Sp Ap	: Spermatogonyum A pale
SRY	: Sex determining region on Y
SUZI	: Sub Zonal İnjeksiyon
TESA	: Testiküler Sperm Aspirasyonu
T. BLUE	: Toluidin Mavisi
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TBF	: Testis belirleyici faktör
T	: Tunika
TUNEL	: Tdt-mediated dUTP nick and labeling
V	: Ven
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ZD	: Zona delinmesi
ZIFT	: Zigot İntra Fallopian Transfer

TABLO DİZİNİ

TABLO 1: İnfertilite Etiyolojisi

TABLO 2: Erkeklerde fertilitiyi bozan ilaçlar ve bunların etki yerleri

TABLO 3: Radyasyonun spermatogenezise etkileri

TABLO 4: WHO Spermatozoa Parametreleri

TABLO 5: Spermatozoa Baş Uzunluğu ve Genişliğinin H-E, T. Blue, Shorr ve Papanicolaou ile boyanmış yaymalarda ölçüm değerleri

TABLO 6: Spermatozoa baş uzunluğu ve genişliğinin gruplar arasında, gruplar içinde ve tamamındaki ölçüm ortalamaları

TABLO 7: Ölçüm yapılan spermatozoa dört boya grubuna göre değerlendirilmesi

TABLO 8: Spermatozoa hazırlama yöntemleri kullanım oranları

TABLO 9: Spermatozoa boyama yöntemleri kullanım sıklığı

ŞEKİL DİZİNİ

- ŞEKİL 1:** 3 Haftalık embriyo, premordiyal germ hücreleri
- ŞEKİL 2:** 6 Haftalık embriyo, Farklanmamış gonadlar
- ŞEKİL 3:** A. 8 ve 16 Haftalık embriyo, Testis Gelişimi
- ŞEKİL 4:** 6 Haftalık embriyo, Erkek ve Dişi Genital Kanallar
- ŞEKİL 5:** 16 Haftalık embriyo, Erkek Genital Kanalları
- ŞEKİL 6:** 4 ve 6 Haftalık embriyo, Dış genital Organların Farklanmamış Evreleri
- ŞEKİL 7:** 10 Haftalık embriyo, Erkek dış Genital Organların Gelişimi
- ŞEKİL 8:** Testis, Panoromik Görüntü
- ŞEKİL 9:** Testis H-E
- ŞEKİL 10:** Spermatozoa EM görüntüsü
- ŞEKİL 11:** H-E boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 12:** T. Blue Boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 13:** Giemsa boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 14:** Wright boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 15:** Weigert'in Demirli Hematoksilen boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 16:** Weigert'in Demirli Hematoksilen- Eosin boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 17:** Orange G boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 18:** Eosin- Anilin Blue boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 19:** Shorr boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 20:** Shorr boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 21:** Papanicolau boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 22:** Berk boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 22:** Light Green boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 23:** Akridine Orange boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 24:** Akridine Orange- Hematoksilen boyası ile boyanmış spermatozoalar
- ŞEKİL 25:** Janus Green boyası ile boyanmış spermatozoalar

1.GİRİŞ

Eşlerin istemelerine ve herhangi bir gebeliği önleyici yöntem kullanmamalarına rağmen en az 1 yıl içerisinde çocuk sahibi olamaması primer infertilite olarak tanımlanmaktadır. Normal bir çiftin bir ay içerisinde gebe kalma şansı %20-25, 6 ay içerisinde %75 ve bir yıl içerisinde ise %90'dır. Çiftlerin yaklaşık % 15'inde infertilite sorunu vardır. İnfertilite olgularının yaklaşık %20' si tamamıyla erkeğe ait faktörlerden, %30-40'ı ise hem erkek hem de kadın faktöründen kaynaklanır. Bu da çiftlerin yarısında erkek faktörlü infertilite olduğunu göstermektedir(1,2).

Son yıllarda androloji dalındaki ilerlemeler ve yardımcı üreme teknikleri alanındaki gelişmeler sayesinde erkek faktörlü infertilite tedavisinde önemli gelişmeler olmaktadır. Bu amaçla klinisyenler, androloji laboratuvarlarından tanı ve tedavi amaçlı yardımlar alırlar. İntra Uterin İnseminasyon (IUI), İn Vitro Fertilizasyon (IVF), Gamet İntra Fallopian Transfer (GIFT), Zigot İntra Fallopian Transfer (ZIFT), Sub Zonal İnjeksiyon (SUZI), Zona delinmesi (ZD), Parsiyel Zona Diseksiyonu (PZD), İntra Sitoplazmik Spermatozoa Enjeksiyonu (ICSI), Testiküler Spermatozoa Aspirasyonu (TESA), Testiküler Spermatozoa Ekstraksiyonu (TESE), Mikrocerrahi olarak Epididimal Spermatozoa Aspirasyonu (MESA), Perkutan Spermatozoa Aspirasyonu (PESA) gibi yöntemlerle infertilite tedavisinde başarılı sonuçlar elde edilmektedir. İlk kez 1992 yılında Palermo ve arkadaşları tarafından uygulanan ICSI erkeğe bağlı infertilitesi olan ve daha önce tedavi edilemeyen birçok çiftte tedavi sağlamıştır(3). Daha sonra 1993 yılında Van Steirteghem ve arkadaşları erkeğe bağlı infertilite hastalarında geniş serilerde ICSI yöntemini kullanarak yüksek fertilizasyon ve implantasyon oranları elde etmişlerdir(4).

Yardımcı üreme teknikleriyle başarılı bir fertilizasyon elde edilmesi ve erken embriyonik gelişimin devamının sağlanmasında spermatozoa seçimi önemli faktörlerden biridir. Semen parametrelerinden spermatozoa morfolojisinin araştırılması fertilite çalışmalarının, semen analizinin önemli bir parçası olup kaliteli spermatozoa seçiminde en önemli kriterdir (5).

Bu çalışmada erkek infertilitesinin tanı ve tedavisinde önemli parametrelerden biri olan spermatozoa morfolojisini, ışık mikroskobu düzeyinde farklı histolojik boyalarla değerlendirip, genel panoramik görünüm ve mikrometreyle ölçümlerini yaparak Kruger kriterlerine göre kıyaslama yapıp istatistiksel olarak hangi boyanın morfolojik değerlendirmede daha üstün olduğunu göstermeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE

Günümüzde yardımcı üreme tekniklerinin hızlı bir gelişme göstermesi ile infertilite nedenleri daha fazla araştırılmaya başlanmıştır. Eskiden sadece kadın odaklı olduğu düşünülen infertilite nedenlerinin son çalışmalarda önemli oranda erkek faktörüne ait olduğu görülmüştür(6).

Bir yıllık evli ve düzenli cinsel yaşantıları olan ve hiç çocuk sahibi olamayanlar primer infertil, daha önce çocuk sahibi olanlar sekonder infertil olarak değerlendirilir(2). Bir yıl içerisinde korunma olmaksızın yapılan normal cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamayan çiftlerin oranı yaklaşık % 15 kadardır. Erkeğin bu durumdaki oranı saf olarak yaklaşık % 20 iken, kadın eş ile beraber ve açıklanamayan grup da içine alındığında bu oran % 50'lere varmaktadır. Reprodüktif yaştaki erkeklerin % 6'sında infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bu olguların yaklaşık % 90'ında da bozulmuş bir spermatogenez vardır(7).

İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde şu hedefler esas alınmalıdır:

Düzeltililebilir durumların(8), başka yöntemlerle düzeltililemeyen ancak erkeğin spermatozoa kullanılarak yapılan yardımcı üreme tekniği ile tedavi edilebilecek nedenlerin (9), bu tekniklerle de tedavi edilemeyen veya evlat edinmeyi gerektirecek nedenlerin (10), altta yatan önemli tıbbi patolojilerin (11) ve hastayı ya da çocuğunu etkileyebilecek genetik ve/veya kromozomal bozuklukların belirlenmesidir (12).

2.1.1. İNFERTİLİTEYE YOL AÇAN SEBEPLER:

Testisler esas tutularak değerlendirme yapıldığında üç ana başlık altında infertilite etiyolojisini inceleyebiliriz:

1. Pre-testiküler nedenler
2. Testiküler nedenler
3. Post-testiküler nedenler
4. Sebebi bilinmeyen (Tablo 1).

Tablo 1: İnfertilite etyolojisi (13).

1. Pre testiküler nedenler : Hipotalamik Hastalıklar: Gonadotropin eksikliği (Kallman Sendromu) İzole LH eksikliği İzole FSH eksikliği Konjenital hipogonadotropik sendromlar Hipofizer Hastalıklar: Hipofizer yetmezlikler Tümör– Radyasyon – İnfiltratif hastalıklar – Operasyonlar Hiperprolaktinemi Ekzojen hormonlar Testosteron – Östojen – Kortizon Tiroid hormonları Büyüme hormonu yetersizliği Hipertiroidi Hipotiroidi Enfeksiyonlar İmmunolojik nedenler Seksüel disfonksiyon 2. Testiküler nedenler: Kromozomal: Klinefelter sendromu XXY XX seks reversal sendrom XYY sendromu Noonan sendromu (erkek Turner sendromu) Myotonik distrofi Vanishing testis sendromu (bilateral anorşi) Sertoli cell only sendrom (germ cell aplazisi) Y kromozom mikrolelesyonu Gonadotoksinler Radyasyon İlaçlar Sistemik hastalıklar Renal yetmezlik Karaciğer yetersizliği Anemi Defektif androjen aktivitesi Orşit	Torsiyon Travma Kriptoorsidizm Varikozel İdiopatik 3.Post testiküler nedenler Obstrüksiyonlar Konjenital Vas deferens yokluğu Young sendromu İdiopatik epididimal obstrüksiyon Polikistik böbrek hastalığı Ejekülatuar duktus obstrüksiyonu Akkiz Vazektomi Kasık cerrahileri Enfeksiyon Fonksiyonel blokaj Sempatik sinirlerdeki harabiyet İlaçlar Spermatozoa fonksiyon ve motilite bozuklukları: İmmotil silia sendromu Maturasyon defektleri İmmunolojik infertilite Enfeksiyon Koît problemleri: İmpotans Hipospadias Zamanlama ve sıklık Ejekülasyonu bozan ilaçlar: Antihipertansifler Alfa adrenerjik blokerler Tiazidler Antipsikotikler Tioridozin Haloperidol Chlordiazepoxide) Antidepresanlar İmipramin Amitriptilin 4. Sebebi bilinmeyen
--	--

Kabakulak enfeksiyonunu erişkin çağda geçirenlerde %15-25 oranında orşit oluşur, bununda %10'u bilateralidir. Testis atrofi 1-6 ay ile yıllar arasında sürebilir. İki taraflı orşit olanların 1/3'den azında spermatozoa parametreleri düzelebilir(2).

Sigara spermatozoa sayısını, hareketini ve yapısını olumsuz etkiler. Spermatozoa sayısı azalır. Spermatozoa akrozomunda oluşan bükülme spermatozoa motilitesinde azalma ve anormal şekilli germ hücrelerinde artmaya yol açar. Sigara içen erkeklerin eşlerinde abortus ihtimalinin arttığı belirlenmiştir(2).

Alkol impotans ve spermatozoa üretiminin bozulmasına dolayısıyla infertiliteye neden olur. Kronik alkolizm vakalarında testisler küçülür, testosteron üretimi bozulur.

Esrar (Marijuana) ve diğer uyuşturucu maddeler; spermatozoa kalitesini ve üretimini olumsuz etkiler. Spermatozoa sayı ve motilitesi azalır. Anormal morfoloji artar. Ayrıca hormonal dengesizliğe yol açar (14).

Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar, kemoterapötik ajanlar spermatozoa üretimini olumsuz etkiler (Tablo 2).

Tablo 2: Erkeklerde Fertiliteyi Bozan İlaçlar ve Bunların Etki Yerleri (15).

A. Hipotalamik-hipofizer-testiküler aksı bozanlar: 1. Androjenler: Testosteron veya anabolik steroidlerin enjeksiyonları* 2. Yüksek doz kortikosteroid kullanımı 3. Luteinizan hormon salgılatıcı hormon agonistleri 4. Anti-androjenler: Cyproterone, spironolakton cimetidin 5. Esrar* B. Testis: 1. Sitotoksik ajanlar: Methotreksat 2. Kolsişin 3. Nitrofurantoin, niridazol 4. Sulfasalazine 5. Kokain* 6. Alkol* C. Epididimis 1. Amiodarone	D. Spermatozoa 1. Fertilizasyon: a. Nifedipine b. Allopurinol c. Kolsişin d. Nikotin* 2. Motilite: a. Lidocaine, prokain b. Propranolol c. Kinin d. Klorpromazin e. Minocycline, Klortetrasiklin E. Ejakülasyon 1. Alfa-blokör ajanlar, ganglion blokörleri 2. Trisiklik antidepresanlar 3. Monoamine oksidaz inhibitörleri 4. Fenotiazinler F. Erektile fonksiyon 1. Beta-blokör ajanlar 2. Tiazid diüretikleri (*İlaç suistimali yapıldığında)
--	---

Kimyasal Madde ve tarım ilaçları da spermatozoa üretimini olumsuz etkiler. Böcek zehiri olarak kullanılan DBCP (Dibromokloropropan), Etilendibromid, çözücü olarak kullanılan Karbon disülfid ayrıca 2-metoksietanol / 2-etoksietanol gibi glikol eterleri Kurşun (Pb), Cadmium(Cd), Manganez (Mn), Civa (Hg) gibi elementler spermatozoalar üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Yüksek ısı özellikle sauna ve sıcak su banyoları spermatozoa üretimini olumsuz etkiler. Bilgisayar, cep telefonları spermatozoaları olumsuz etkiler(14).

Testislerde spermatozoa üreten Sertoli hücreleri radyasyona çok duyarlıdır. Meydana gelen hasarın derecesi ve kalıcılığı radyasyon dozuna bağlıdır. 100- 300 Rad kalıcı hasar yapabilir. Radyoterapi gören hastalarda spermatozoa üretimi 3-5 yıl içinde tekrar başlayabilir (Tablo 3).

Tablo 3 : Radyasyonun spermatogenezise etkileri (16).

Doz (cGy)	Etki	Reversibilite
<10	Önemsiz etki	-
10-50	Orta derecede oligozoospermi	6 ay
50-75	Şiddetli oligozoospermi	6 ay
75-100	Azoospermi	6 ay
200-300	Azoospermi	1-2.5 yıl
>300	Azoospermi	5 yıl ya da irreversibl

Erkek infertilitesinin klinik geliş şekillerine göre de 5 ana grup sınıflandırılmaktadır(17):

Tip I: Mekanik infertilite :(% 0.3-7) Yetersiz koitus söz konusudur. Bu anatomik bozukluklar, erektil veya ejakülatuar bozukluklar nedeniyle olabilir.

Tip II: Azospermi :(% 0.9-16) Ejakülatta spermatozoa olmaması halidir. İnfertil erkeklerde %10-15 oranında gözlenir. Primer veya sekonder testiküler yetmezlik durumlarında (nonobstrüktif) veya genital trakt obstrüksiyonlarında ortaya çıkar (obstrüktif).

Tip III: İmmunolojik infertilite :(%3.4-25) Spermatozoa fonksiyonu antikor bağlanması ile bozulmuştur. Spermatozoa sayısının normal olduğu izole hareket bozuklukları,

spermatozoa agglütinasyonu ya da anormal postkoital test varlığında ASA (Anti Sperm Antikor) değerlendirilmesi yapılmalıdır.

Tip IV: Anormal semen kalitesi: (%23-48) 3 ana parametre olan sayı, hareket ve morfolojide ya tek tek ya da 2'li 3'lü kombinasyonlar şeklinde bozukluk vardır.

Tip V: Spermatozoa disfonksiyonu : (%0-25) 3 ana parametre olan sayı, hareket ve morfolojide bir bozukluk yoktur, fakat spermatozoalar fertilizasyon olayını gerçekleştirememektedirler (Açıklanamayan infertilite).

2.2. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Spermatozoa üretiminin gerçekleştiği ve depolandığı erkek genital sisteminin genel yapısı ve fonksiyonlarının bilinmesi yararlı olacaktır.

Erkek Genital Sistemi'ni dört ana bölüme ayırarak sınıflandırırsak;

1. Erkek gonadları olan testisler skrotal kese içine yerleşmiş bir çift organdır. Testisler erkek gamet hücresi spermatozoanın üretiminden ve başta testosteron olmak üzere erkek seks hormonları salgılanmasından sorumludurlar.
2. Her biri duktus efferents, epididimis, duktus deferents ve ejakülator kanalı içeren bir çift kanallar sistemidir. Herbir testis spermatozoanın depolanması ve hareketinden sorumludur. Üretra üzerinde birleşen ejakülator kanalların içindeki spermatozoalar çiftleşme sırasında dışı genital yol içine gönderilir, sürüklenir.
3. Bir çift seminal vezikül ve tek prostat bezinden oluşan iki ekzokrin glanddır. Seminal sıvı olarak bilinen besleyici, kayganlaştırıcı sıvıyı sekrete eder. Bu sıvı spermatozoayı dışı genital yola taşır. Ejekülasyon sırasında dışarı atılan semen; seminal sıvı, spermatozoa ve kanalı döşeyen birçok dökülen hücreleri içerir.
4. Kopulasyon organı penistir. Cowper bezi (Bulboüretal gland) ejakülasyon sırasında semen pasajı için kayganlığı sağlayan sıvıyı sekrete eder(19).

2.2.1. GENİTAL SİSTEM EMBRİYOLOJİSİ

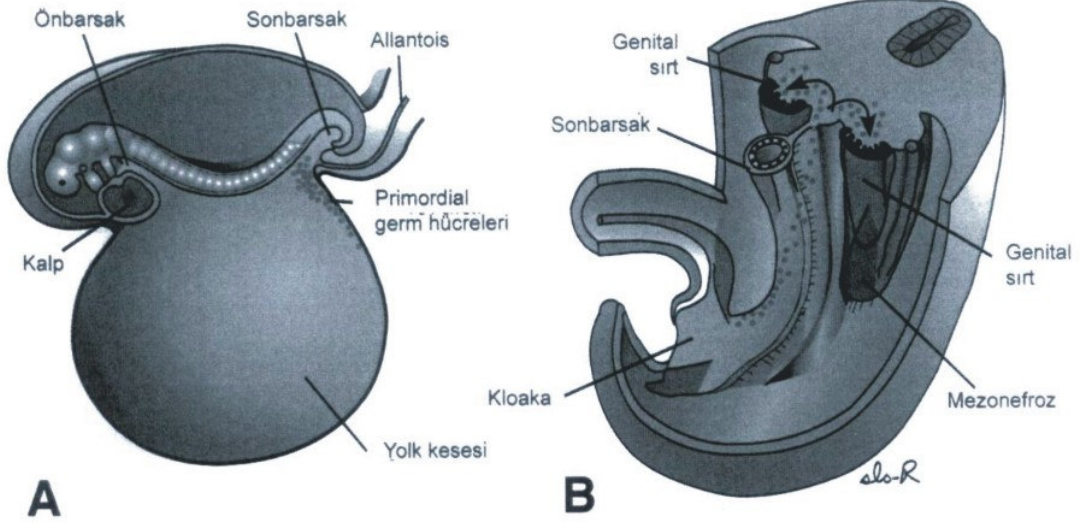
Kromozomal ya da genetik cinsiyet fertilizasyonda belirlenir ve sekonder oositi dölleyen spermatozoanın x ya da y cinsiyet kromozomu tarafından belirlenir. Cinsiyetin farklanması, bazıları otozomal olan çok sayıda genin rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı, kısa kolunda (Yp11) SRY genini (sex determining region on Y) taşıyan Y kromozomudur. Bu genin protein ürünü rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür.

SRY proteini testis belirleyici faktördür (TBF). Bu faktörün varlığıyla fetüsün cinsiyeti erkek tipinde, yokluğunda da kız tipinde gelişir(20, 21).

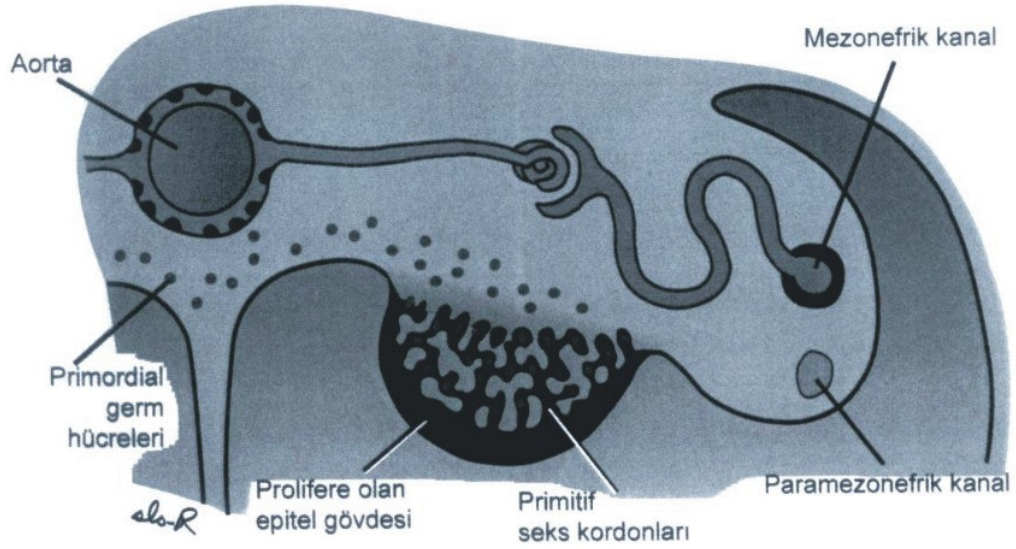
2.2.1.1GONADLAR

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan daha fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildir. Genital sistem erken dönemde her iki cinste de birbirine benzer. Genital sistemin gelişiminin başlangıç periyodu olan bu evre seksüel gelişimin farklanmamış safhası olarak bilinir. Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar. Bunlar posterior abdominal duvarın mezodermal epiteli altındaki mezanşim ve primordiyal germ hücreleridir. Gonadlar başlangıçta bir çift uzunlamasına, kölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezanşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş genital veya gonodal sırtlar halinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına kadar bu genital sırtlar içinde germ hücreleri yoktur(19, 21).

Oldukça geniş, sferikal primordiyal germ hücreleri gelişimin erken evrelerinde yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler(20, 22). Son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital sırtları işgal ederler. Bu hücreler genital sırtlara ulaşamaz ise gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testise farklanmasında primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır. Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital sırtın epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri altlarındaki mezanşimin içine gömülürler. Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz kordonları oluştururlar. Embriyoda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadları birbirinden ayırt edilemez. İşte bu devredeki gonad farklanmamış gonad olarak bilinir(19, 20).Bakınız, Şekil 1 ve 2 (20).



Şekil 1: A. 3 haftalık embriyoda, yolk kesesi duvarında, allantois bağlantısına yakın bir yerde premordial germ hücrelerini gösteren çizim. B. Primordial germ hücrelerinin, sonbarsak ve dorsal mezenter boyunca genital sirta doğru giden göç yolu.



Şekil 2: 6 haftalık embriyonun lumbar bölgeden geçen transvers kesitinde, primitif cinsiyet kordonlarıyla birlikte farklanmamış gonad görülmektedir. Bazı primordial germ hücreleri primitif cinsiyet kordonlarına ait hücrelerle çevrelenmiştir.

(20)

2.2.1.2. TESTİSLER

Embriyo genetik olarak erkekse, primordiyal germ hücrelerinin cinsiyet kromozomları XY'dir. Testislerin gelişimi koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır(20,22). Testis belirleyici faktörü kodlayan Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları testis veya medüller kordonları oluşturmak üzere, çoğalmaya devam edip medullanın derinliklerine doğru ilerlerler. Bu kordonlar bezin hilusuna doğru, daha sonra rete testis tübüllerini oluşturacak ince hücre sıralarından ibaret bir ağ şeklinde dağılırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde testis kordonlarının yüzey epiteliyle olan ilişkileri tunika albuginea adlı yoğun fibröz bir bağ dokusunun araya girmesiyle sona erer. 4. ayda testis kordonları at nalı şeklini alır ve bu at nalının uçları rete testis ile devam eder. Bu durumda testis kordonları artık primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden köken almış Sertoli hücreleri (destek hücreleri)'nden meydana gelmiştir. Gonadal sırtın orijinal mezanşiminden köken alan interstisyel Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur ve bu kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlar.

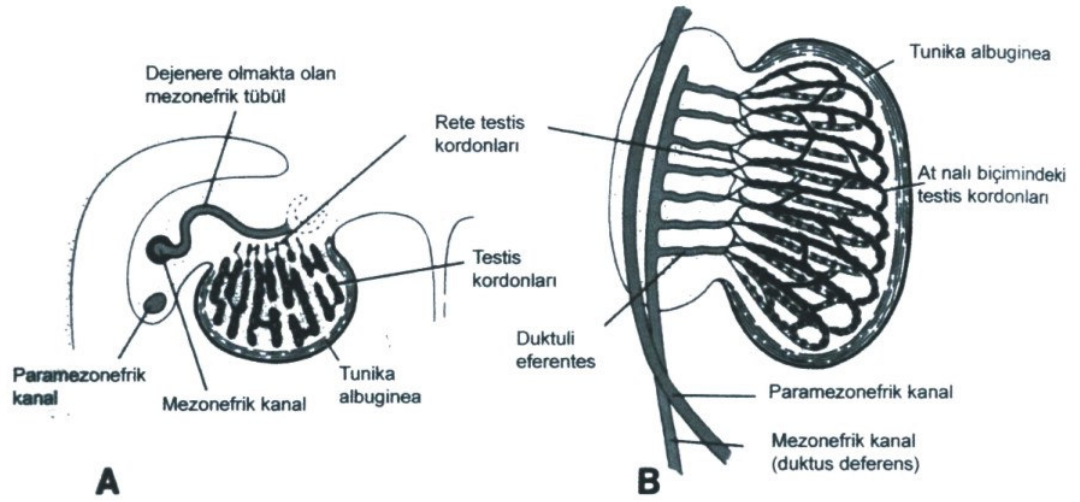
Plasental Gonadotropik Hormon ya da Luteinize Hormon anne kanından fetüse geçerek çok sayıda Leydig hücrelerini stimüle eder ve testosteronun sentez ve salgılanmasını sağlar. Testosteronun varlığı embriyoda erkek genital sistemin farklılaşması için gereklidir. Embriyodaki Leydig hücreleri gebeliğin 4,5 ayına kadar tam farklılaşmış olarak kalır. Sonra gerilemeye başlar. Daha sonra puberteye kadar dinlenmeye çekilir(21).

Gestasyonun 8. haftasında Leydig hücreleri testosteronu üretmeye başlarlar. Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini maskülinizasyon yönünde etkileyecek hale gelmiştir(20). Testosteron üretimini insan korionik gonadotropin hormonu (hCG) stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerdedir. Testosterona ilaveten fetal testisler glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon(AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) denilen bir hormonu da salgılamaktadır. Antimüllerian hormon, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Hormonun salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH paramezonefrik(müllerian) duktusların gelişimini baskılar, atrofiye uğratar(22).

Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonları pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüller haline gelirler. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur: Testisin yüzey epitelinden gelişen destek hücresi olan Sertoli hücreleri ile primordiyal germ hücrelerinden farklılaşan primordiyal germ hücreleri olan spermatogonialardır(21,22). Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübülleriyle birleşir ve duktuli

efferenteslere girerler. Bunlar mezonefrik sistemin geride kalmış boşaltım tübülleridir. Duktus deferens olarak bilinen bu kanallar rete testis ile mezonefrik veya Wolffian kanallarını birbirine bağlarlar(20, 22).

Embriyonun cinsiyetinin fertilizasyon sırasında belirlendiği ve tümüyle spermatositin X veya Y kromozomuna sahip olup olmamasına bağlı olduğu söylenebilir. XX cinsiyet kromozomuna sahip bir embriyoda, gonadın medüller kordonları geriler ve kortikal kordonların sekonder jenerasyonu oluşur. XY cinsiyet kromozomu taşıyan embriyolarda ise, medüller kordonlar testis kordonlarına dönüşür, sekonder kortikal kordonlar gelişmez (20). Bakınız Şekil 3(20).

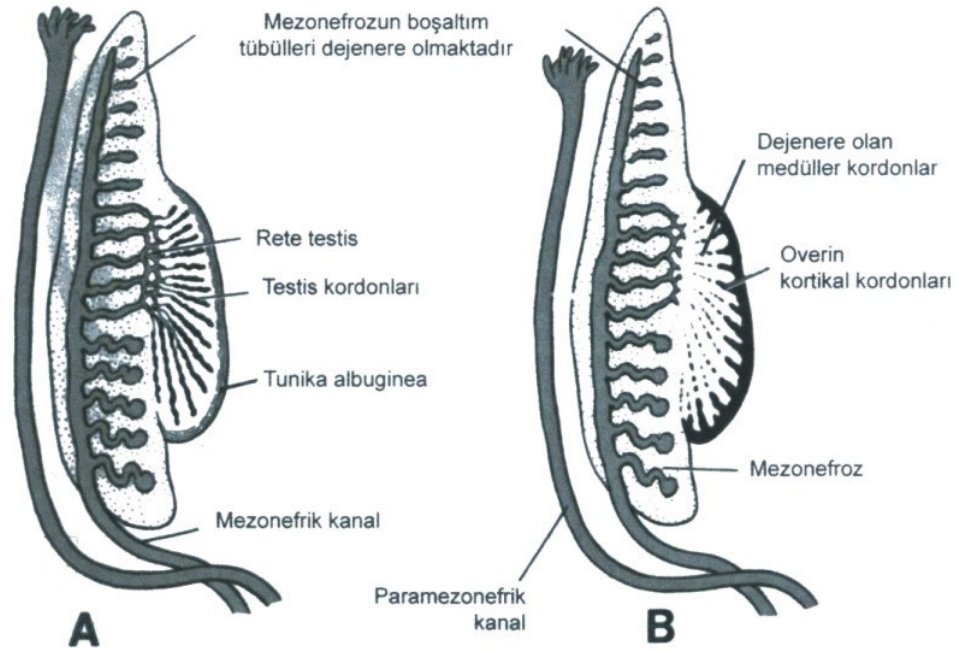


Şekil 3: A. Gelişimin 8. haftasında testisten geçen ve tunika albuginea, testis kordları, rete testis ve primordial germ hücrelerini gösteren transvers kesit. B. Testis ve genital kanalın 4. aydaki görünümü.

2.2.1.3.GENİTAL KANALLAR

2.2.1.3.1. Farklanmamış Evre

Gelişimin 5-6. haftalarında erkek ve dişi embriyoların ikisinde birden iki çift genital kanal vardır: mezonefrik kanallar (Wollfian) ve paramezonefrik (Müllerian) kanallar. Mezonefrik kanallar erkek üreme sisteminin gelişiminde rol oynarken paramezonefrik kanallar dişi üreme sistemi gelişiminde rol oynar(20, 21, 22). Bakınız Şekil 4(20).



Şekil 4: Gelişimin 6. haftasında erkek (A) ve dişi (B) genital kanallar.

2.2.1.3.2. Genital Kanalların Gelişiminin Moleküler Düzeni

Testisin gelişimi üzerinde en temel rolü oynayan SRY geni gonadal sırtı doğrudan, mezonefrik kanalları da dolaylı şekilde etkilemektedir. SRY geni testisten mezonefrik kanal tübüllerinin gonodal sırtı penetre edebilmesine ve testislerin daha ileri gelişimini sağlayan kemotaktik bir madde salgılamaları için uyarmaktadır. Bu tübüller genital sırtı penetre edemedikleri takdirde testisin gelişmesi mümkün değildir. SRY aynı zamanda Sertoli ve Leydig hücrelerinin farklılaşabilmesi için gerekli olan ve etkisini bir başka transkripsiyon faktörü olan SOX9 üzerinde gösteren steroidogenezis faktörü 1'in salgılanmasını düzenlemektedir. Sertoli hücreleri tarafından 6-7. haftadan itibaren salgılanan müllerian inhibe edici madde de paramezonefrik (müllerian) kanalların gerilemesini sağlamaktadır. Leydig hücreleri tarafından 8. haftadan itibaren salgılanan testosteron da hedef dokulardaki hücrelerin içine girip ya öylece kalır ya da 5 α redüktaz enzimiyle dihidrotestosterona dönüştürülür. Testosteron ve dihidrotestosteron hücre içinde, bu hormonlara karşı özel ve yüksek afinitesi olan bir reseptör proteine bağlanırlar. Bu reseptör kompleksi de dokuya özgü transkripsiyon genlerinin ve bu genlerin protein ürünlerinin ortaya çıkabilmesi için DNA'ya bağlanır. Testosteron reseptör kompleksi mezonefrik kanalların virilizasyonunu sağlarken, dihidrotestosteron reseptör kompleksi de erkek dış genital organlarının diferansiye olmalarına yardım eder(20,22).

2.2.1.3.3. Erkek Genital Kanalları ve Bezlerinin Gelişimi

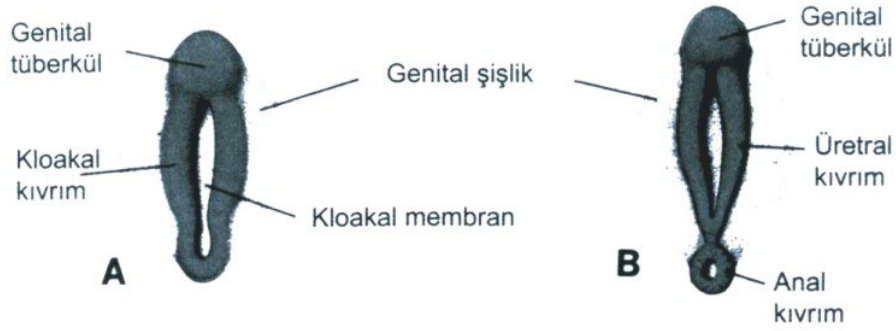
Mezonefroz gerilerken, epigenital tübüller adı verilen birkaç boşaltım kanalı rete testis kordonlarıyla ilişki kurarak sonunda duktuli efferentesleri oluşturur. Testisin kaudal kutbundaki boşaltım kanalları ise, paragenital tübüller, rete testis kordonlarıyla birleşmez. Bunların kalıntıları topluca paradidimis olarak bilinir. Mezonefrik kanallar en kranialdeki kısımları, apendiks epididim, dışında sebat ederek ana genital kanalları oluştururlar. Mezonefrik kanallar efferent duktusların giriş yerinin hemen altından itibaren uzayıp kıvrıntılı bir yapı halini alarak, duktus epididimisi oluştururlar. Duktus deferens mezonefrik kanalın, epididimin kuyruğundan, seminal vezikül tomurcuğuna kadar kalın bir kas kılıfına bürünmesiyle oluşur. Mezonefrik kanalların kaudal uçlarının lateralinden dışa doğru seminal veziküller gelişir. Çift olan bu bezler spermatozoaların beslenmesini sağlayan sekresyon yaparlar. Duktus deferensin seminal vezikülden sonraki parçasına ejakulatuar kanal denir. Paramezonefrik kanallar erkeklerde kranial uçlarındaki küçük bir kısım dışında (appendiks testis) dejenere olurlar. Üretranın prostatik parçasından meydana gelen çok sayıda endodermal çıkıntı etraftaki mezanşim içine büyür. Prostatın bez epiteli bu endodermal hücrelerden gelişirken epitel hücreleriyle ilgili mezanşimden ise organın stroması ve düz kasları meydana gelmektedir. Bezelye şeklindeki bulboüretral bezler ise üretranın spongiyoz parçasından çift halde dışarıya doğru büyüyen hücrelerden gelişirler. Düz kas hücreleri ve stroma bölgedeki mezanşim hücrelerinden köken alırlar. Bezlerin salgısı semenle karışmaktadır(20,22,23,24). Bakınız, Şekil 5(20).

2.2.1.4. DIŞ GENİTAL ORGANLAR

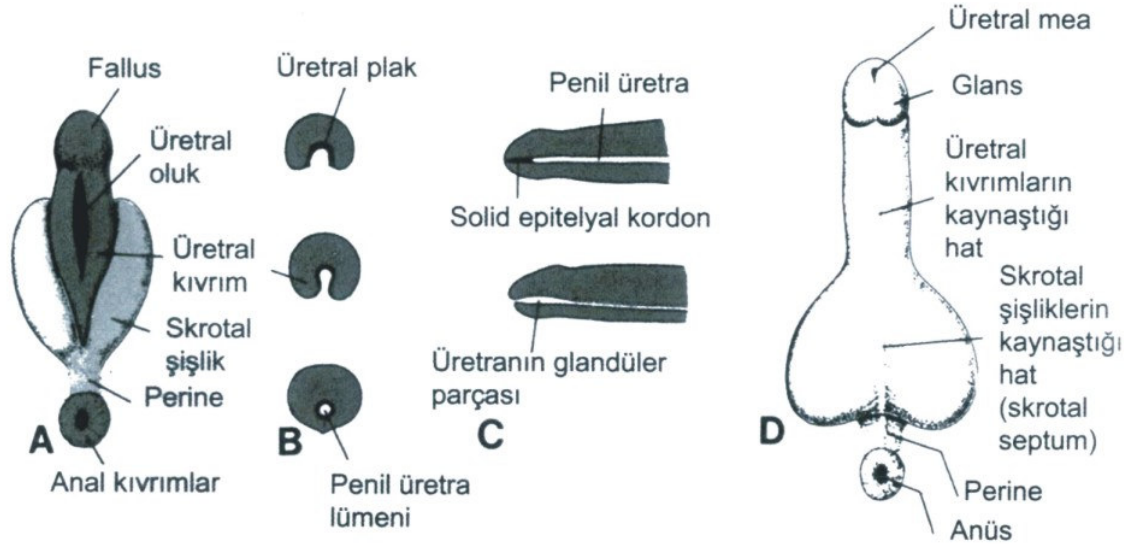
2.2.1.4.1. Farklanmamış evre

Gelişimin 3.haftasında primitif çizgiden köken alan mezanşim hücreleri, kloakal membranın çevresine kloakal kıvrım adı verilen bir çift hafifçe yüksek bir şişlik oluşturmak üzere göç ederler. Bu kıvrımlar kloakal membranın kranialinde birleşerek genital tüberkülü oluştururlar. Altıncı haftada, kloakal membran ürogenital ve anal membranlara ayrılırken, kloakal kıvrımlar da, önde üretral kıvrım arkada anal kıvrıma bölünür. Bu sırada üretral kıvrımların her iki yanında genital şişlik adı verilen bir çift başka yükselti ortaya çıkar Bunlar daha sonra erkeklerde skrotal şişlikleri kızlarda da labia

majörleri oluşturacaklardır. Yine de fetüsün cinsiyetinin anlaşılması 6. haftanın sonundan önce mümkün değildir(22). Bakınız, Şekil 6 ve 7 (20).



Şekil 6: A. ve B. Dış genital organların farklanmamış evreleri. A. Yaklaşık 4. hafta. B. Yaklaşık 6. hafta.



Şekil 7: A. 10. haftada erkek dış genital organlarının gelişimi. B. Penil üretranın oluşumu sırasında fallusdan geçen transvers kesitler. Üretral kıvrımlar ürogenital oluk üzerinde oluşturduğu köprüler. C. Penil üretranın glandüler kısmının gelişmesi. D. Yenidoğan.

2.2.1.4.2. Erkek Dış Genital Organları

Erkeklerde dış genital organların gelişimi, fetal testislerden salgılanan androjenlerin etkisi altındadır ve artık fallus adını almış olan genital tüberkülün hızlı uzamasıyla karakterizedir. Bu uzama sırasında fallus üretral kıvrımları öne doğru çekerek üretral oluğun lateral duvarının oluşmasını sağlar. Bu oluk uzayan fallusun kaudaline kadar gelir; ancak en uç noktasına glansa ulaşamaz. Bu oluğun endodermal kökenli epiteli üretral oluğu oluşturur. Üçüncü ayın sonunda, üretral kıvrımlar üretral plak üzerinde kapanarak penil üretrayı oluştururlar. Bu kanal fallusun ucuna kadar uzanmaz. Üretranın en distal kısmı 4. ayda

glansın ucundaki ektodermal hücrelerin içe doğru penetre olarak, kısa bir epitelyal kordon oluşturmasıyla tamamlanır. Bu kordonun içinin lümenleşmesiyle eksternal üretral meatus oluşur. Erkeklerde skrotal şişlik olarak bilinen genital şişlikler, önce inguinal bölgede yerleşmiştir. Gelişimin daha ileri evrelerinde kaudal yönde ilerleyerek her şişlik kendi tarafındaki hemiskrotumu oluşturur. İki hemiskrotum birbirinden skrotal septum ile ayrılmıştır(20, 21).

2.2.2. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ ANATOMİSİ, HİSTOLOJİSİ

Erişkin erkek genital organları dış ve iç genital organlar olarak iki gruba ayrılır. Dış genital organlar, penis, üretra, skrotum olup diafragma ürogenitale ile arkus pubikusun altında yerleşmişlerdir. İç genital organlar ise testis, epididimis, duktus deferens, glandula(gl) prostatika, gl. vesiküloza ve gl. bulboüretralis'tir. Erkek genital organları fonksiyonları gereği dört farklı yapıya sahiptirler. Bunlar;

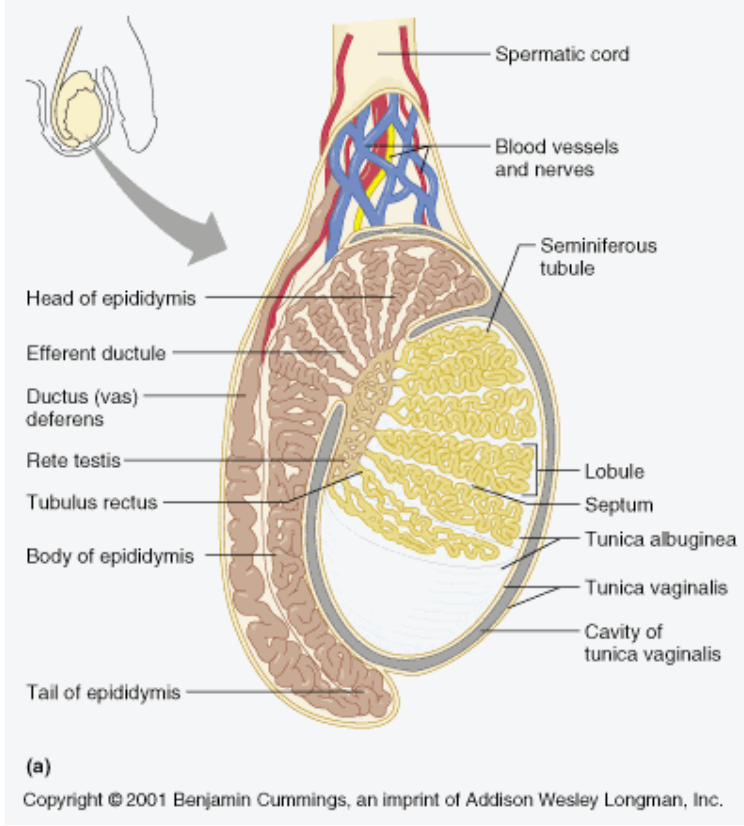
- Spermatozoa ve erkek seks hormonu testosteronu üreten testisler,
- Spermatozoanın penise geçişini kolaylaştıran sıvıların salgıladığı yardımcı bezler,
- Yardımcı bezler ile testis salgılarını penise ileten yardımcı kanallar,
- İdrar ve semeni üretra vasıtasıyla dış ortama taşıyan penistir(25).

2.2.2.1. TESTİSLER

Funikulus spermatikus'a asılı olarak kıvrımlı bir deri kesesi olan skrotum içine yerleşmiş, spermatozoa üreten bir çift erkek üreme organıdır. Oval şekilli olup, yetişkinlerde yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm eninde, 3 cm anteroposterior çapında ve 12 g ağırlığındadır. Testislerin skrotum içindeki duruşları vertikal olmayıp, organın uzun eksenini yukarıdan aşağı ve önden arkaya eğik, biri (genellikle sol testis) diğerlerine göre biraz daha aşağı pozisyonundadır. Böylece günlük hareketlerde rahatsızlık verici hareket olmaz. Ayrıca bu pozisyonda skrotumun testislerin karın içinden daha düşük ısıda saklanması rolü vardır(26). Testisin fasies medialis ve fasies lateralis olmak üzere iki yüzü; margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı; extremitas superior ve extremitas inferior olarak iki ucu vardır. Margo anterior peritonum visseralenin uzantısı olan epiorşim ile kaplıdır. Margo posteriorun medial bölümünde korpus epididimis oturur. Margo posterior'un orta kısmında testis damar ve sinirleriyle spermatozoanın kanallarının geçtiği mediastinum testis denilen yapı bulunur. Extremitas superior üst uç

olup kaput epididymis yerleşmiştir. Extremitas inferior testisin alt ucu olup kauda epididymis ile örtülüdür(25).

Şekil 8: Testis (27)



Testis dıştan içe tunika(t) vaginalisin lamina(l) visseralisi(epiorşium), t.albuginea ve t. vaskülosa olmak üzere üç tabaka ile sarılıdır(25, 28). T. vaginalis denilen bu zar ince tabaka seröz sıvı ile ayrılmış pariyetal ve visseral olmak üzere iki tabakadan oluşur. Aradaki sıvı mezotel hücrelerince salgılanır ve kayganlaştırıcı görevi vardır. Ayrıca skrotal kese içinde testislerin serbestçe hareketini sağlar.

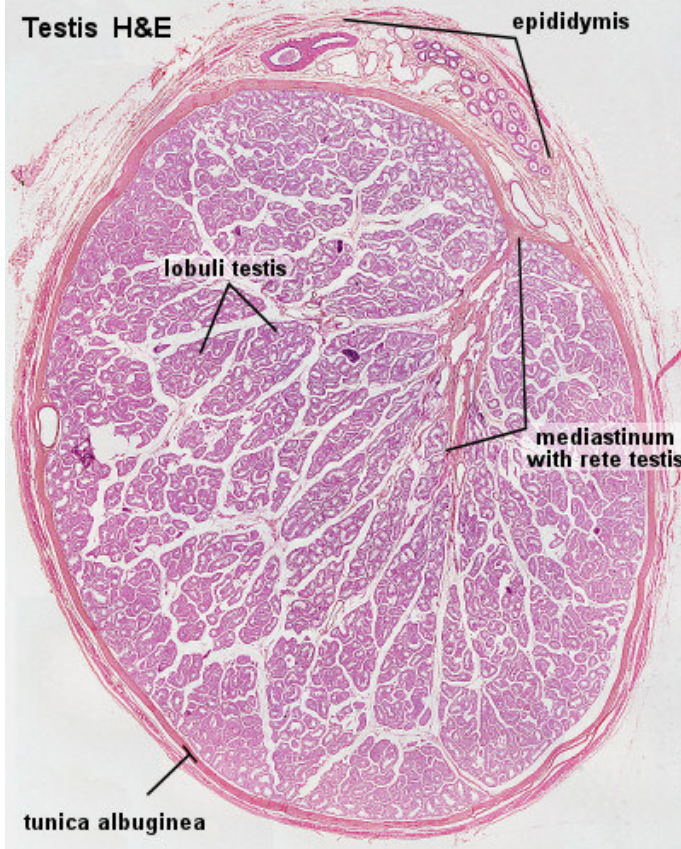
T. vaginalis testis'in visseral yaprağı(epiorşium): Testisin büyük kısmını örten bu yaprak epididymis'in yerleşim gösterdiği arka kenarının mediyal bölümünü örtmez. L. visseralis epididymis ve testisin arka yüzünden l.parietalis olarak fascia(f) spermatika internanın iç yüzüne atlar. Testisin üst ucu ile epididymis arasında uzanan t. vaginalis bölümü ligamentum(lig). epididymidis superior, testisin alt ucu ile epididymis arasına uzanan t. vaginalis bölümü lig. epididymidis inferiordur.

Dıştan t. albuginea adı verilen mavimsi beyaz renkli, sıkı fibröz bağ dokusu yapısında bir zarla sarılmıştır. T. albuginea'nın üst yüzü peritoneum uzantısı olan t. vaginalis testis ile örtülmüştür. Testis içine uzanan septula testis adlı bölmeleri testiste lobuli testisi oluşturur. T. albuginea fibroblast ve testisin ritmik kasılmasından sorumlu olan miyofibroblast içerir. Her bir testiste büyüklükleri bulundukları yere göre farklılık gösteren sayıları 200-300 arasında değişen ve lobuli testis denilen oluşumlar vardır (22, 29). Her bir lobulus testis içinde 1-3 tane tubuli seminiferi kontorti denilen kıvrıntılı tüpler bulunur(30). Testisin ortasındaki lobuli testis daha büyük ve uzun yapıda iken testisin kenarında yerleşmiş olan lobuli testis yapılarının ise; tabanı periferde tepesi ise mediastinum testise yönelmiş durumdadır.

T. albuginanın iç yüzü kan ve lenfatik damar ağından oluşan t. vasküloza ile sarıdır ve testisin içine birçok kollajenöz bölme verir. Lobuli testiste tubuli seminiferi kontorti ve tubuli seminiferi rekti adı verilen tüp yapısında oluşumlar vardır. Her bir testis, sayısı 400-800 arasında değişen sıkışık, sarmal şeklinde tubuli seminiferi kontorti içerir. Tubuli seminiferi kontortinin uzunluğu 70-80 cm, çapı 150-250 µm arasında değişir. Tübüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır. Kıvrıntılı bir seyir gösteren tubuli seminiferi kontorti kör bir ucla başlayıp mediastinum testise doğru düzleşip, birbirleriyle birleşerek sayıları 20-30'a iner(25, 26). Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz t. propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış miyoid hücrelerden oluşur. Miyoid hücreler peristaltik hareketlerle kontraksiyona yol açarak spermatozoaların epididimise doğru pasajını sağlar(26, 31). Her bir testisteki tubuli seminiferi kontorti duvar yapısı, sertoli ve spermatogenik seri hücreleri olmak üzere iki tip hücre içeren germinal doku ile döşenmiştir. Spermatogenik seri hücreleri bazal lamina ile tubul lümeni arasında 4- 8 sıralı tabaka halinde dizilidirler. Bu hücre grubu, bölünmeler sonunda farklılaşan ve en sonunda spermatozoayı oluşturacak olan spermatogonyum, spermatosit ve spermatidleri içerirler. Hücre bölünmesiyle oluşan hücre farklılaşma sürecine spermatogenezis denir. Sertoli hücreleri yüksek silindirik hücrelerdir. Sertoli hücreleri membrana bazalis üzerine oturur ve lümene doğru uzantıları vardır. Spermatogenik hücre hattını destekler. Sertoli hücreleri bol ökromatin içeren geniş bir çekirdeğe sahip olup iki veya daha fazla belirgin çekirdekcik içerir. Belirgin agranüler endoplazmik retikulum, klasik mitokondri, iyi gelişmiş golgi aparatı, lipid damlacıkları, mikroflamentler, dağınık lamelli granüler endoplazmik retikuluma sahiptir. Sertoli hücreleri kan-testis bariyerini oluşturur ve

spermatogenezis için gerekenleri temin eder. Seminifer epiteli bölerek bazal ve adluminal bölümlere ayırır. Gelişmekte olan spermatozoaların desteklenmesi, korunması ve beslenmesini düzenler. Ayrıca bu hücreler hipofiz bezinden FSH salgılanmasını düzenleyen inhibin hormonu ile spermatozoa sıvısının genital kanallarda gidişine yardımcı olan androjen bağlayıcı hormonu salgırlar(25, 31).

Şekil 9: Testis H-E (32)



Tubuli seminiferi kontorti yapıları arasındaki bağ dokusunda damar ve sinir yapılarının arasında küme şeklinde gruplar halinde ya da tek tek bulunan Leydig hücreleri adı verilen endokrin hücreler bulunur. Bu hücreler testiküler androjen adı verilen erkek seks hormonları salgırlar. Bunların en önemlisi testosterondur(19, 25)

2.2.2.2. EPİDİDİMİS

Tubuli seminiferi rektiler, düzleşen ve sayıları azalan tubuli seminiferi kontortilerden oluşur. Tubuli seminiferi rekti yapısındaki borucuklar mediastinum testise uzanarak ve birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis ağını (Haller ağı) oluştururlar. Rete testis

mediastinum testisin üst bölümünde yer alan ve sayıları 12-15 arasında değişen kanallara dönüşür. Bu kanallardan duktuli efferentes testisin başlangıcı olup testisin arka kenarının üst kısmından tunika albugineayı delerek çıkarlar. Testisin arka kenarı boyunca aşağıdan yukarı doğru 4 cm uzunluğunda yarım ay şeklinde helozonik bir kanal kümesi oluştururlar. Bu yapıya epididimis denir. Epididimisi oluşturan kanalın toplam uzunluğu 6 metredir (25, 26). Yuvarlak bazal hücreler ve prizmatik hücrelerden oluşmuş sterostilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşelidir. Bu hücreler düz kas hücreleri ve kan kapillerinden zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bir bazal lamina üzerine oturur(26). Epididimis; spermatozoayı ejakülasyona hazırlar ve olgun hale gelene kadar depolar. Spermatozoanın testisten duktus ejakulatoryusa geçişi için bir kanal sistemi olarak hizmet eder. Ayrıca duvarlarındaki sirküler düz kas liflerinin peristaltik kasılmalarıyla olgun spermatozoanın penise ulaşmasını sağlar(19, 25).

Spermatozoalar epididimisten geçerken hareket etme ve dölleme kabiliyetini kazanırlar. Olgunlaşacak olan spermatozoa tubuli seminiferi kontortiden başlayan borucuklar ile epididimise geçer. Spermatozoa olgunlaşana kadar epididimis içindeki yolculuğu en az 10 gün en fazla 4- 5 hafta alabilir. Bu sürede epididimisin lümen duvarından beslenir. Olgun hale geldiğinde duktus deferense geçer. Buradan da duktus ejakulatoriusa ulaşır. Spermatozoa epididimis ve duktus deferente yaklaşık 1 ay fertil olarak kalabilir. Bu süre içinde ejakülasyon olmazsa dejenere olarak emilir(25, 28, 33).

2.2.2.3. DUKTUS DEFERENS

Duktus epididimis'in genişlemiş olarak devam eden bölümüdür. Tipik olarak dar bir lümeni ve kalın bir kas tabakası vardır. 25- 30 cm uzunluğunda çapı başlangıcında 2 mm, sonlanma yerine yakında 4 mm'dir. Organın lümen çapı ise 0.5 mm'dir. Sterostilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitelle kaplıdır. Mukozası kıvrımlı olup lamina propriası elastik liflerden zengindir. Kalın kas tabakası içte ve dışta longitudinal ortada ise sirkülerdir. Mukoza tabakası ampulla boyunca ejakülatuar duktusun içine kadar devam ederken kas tabakası ampulladan sonra bitmektedir(25,26). Başlangıcından itibaren funikulus spermatikus içindedir(28). Ampulla duktus deferentiste, ejakülasyondan önce bir miktar spermatozoa depolandığı bilinmektedir.

2.2.2.3.1. Funikulus Spermatikus

Anulus inguinalis profundustan testise kadar uzanan 15- 20 cm uzunluğunda, kurşun kalem kalınlığında damar, sinir ve spermatozoayı ileten kanalların bulunduğu bir

kordondur. Sol funikulus spermatikus biraz daha uzun olduğundan sol testis sağ testisten daha aşağıdadır. Funikulus spermatikus kanalis inguinalis içinde oblik olarak seyrederken anulus inguinalis superfisialisten çıktıktan sonra vertikal yönde skrotum'a uzanır. Funikulus spermatikus'u içten dışa doğru fascia spermatika interna, musculus (m). kremaster ile fascia kremasterika ve fascia spermatika externa sarar. Funikulus spermatikus içinde bulunan oluşumlar:

1. A. testikularis
2. Pl. panpiniformis(v. testikularis)
3. Pl. testikularis(sempatik lifler)
4. Duktus defferens
5. A.duktus defferentis ve v. duktus defferentis
6. Pl. duktus defferentis (sempatik ve parasempatik lifler)
7. M. kremaster
8. A. kremasteria ve v. kramaster
9. Nervus(N). ilioinguinalis
10. N. genitofemoralis'in ramus(r).genitalis'i
11. Lenf damarları yer alır(25).

2.2.2.4. DUCTUS EJAKULATORYUS

Ampulla duktus defferentis'in daralmış olan ucu prostata'nın tabanına doğru vesikula seminalis'in kanalı ile birleşerek duktus ejakulatoryus'u oluşturur. Prostatın lobus medius arka sınırı hizasında aşağı ve öne doğru uzanıp, üretra'nın pars prostatikasında kollikulus seminalis'in her iki yanına açılır. Duktus ejakulatoryus yaklaşık 2 cm uzunluğundadır.

Dış tabakasında bulunan kas lifleri duktus ejakulatoryus'u sıkıştırarak sürekli kapalı tutarlar. Ejekülatın boşalması durumunda kasların tonusunun azalması ile duktus ejakulatoryus açılır. Duktus defferens'in çevresindeki kasların kasılmasıyla spermatozoalar büyük bir hızla açılmış bulunan duktus ejakulatoryus'dan geçerek üretra'ya atılırlar(25).

2.2.2.5. GL. VESİKULOSA (VESİKÜLA SEMİNALİS; GL SEMİNALİS)

Ampulla duktus defferensin yan tarafında uzanan bir çift bezdir. Ön yüzü fundus vesika ürineriye, arka yüzü ise rektum ile komşuluk yapar. 4- 5 cm uzunluğunda ve 2- 2.5 cm genişliğindedir. Bezin üst kısmı daha geniş olup alt uca doğru daralarak duktus ekskatoryusu oluşturur. Bezin uzun ekseni yukarıdan aşağıya, dış yandan iç yana ve

arkadan öne doğru uzanır. Bezin yukarıda bulunan tabanı üreterin son kısmı ile aşağıda bulunan tepesi ise prostat ile komşudur. Dıştan boğumlu görünüşte olan kese içte kör divertiküller oluşturur. Duktus ekskretoryus bazalde prostat yakınlarında ampulla duktus deferens ile birleşerek duktus ejakulatoryusu şekillendirir.

Veziküla seminalis dıştan içe doğru t.adventisya, t.muskularis ve t.mukoza olmak üzere üç tabakadan oluşur.

- 1- T. adventisya: Bağ dokusundan yapılı olup üst ucu periton ile örtülü ekskavatio rekto vezikalisin dip kısmına uyar. Rektal tuşe ile prostat ve daha üstte bulunan veziküla seminalisin muayenesi yapılabilir.
- 2- T. muskularis: Düz kas liflerinden yapılıdır.
- 3- T.mukoza: Salgı granüllerinden zengin yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşeli mukoza kıvrımları vardır(26). Epitel ile örtülü olan iç yüzde jelatinimsi salgıyla kaplı küçük çukurluklar görülür. Vesiküla seminalisin salgısı ejakulat hacminin önemli bir kısmını yapar(33).

Bezin alkali salgısı su, fruktoz, prostaglandinler ve vitamin C'den oluşur(25). Bu salgı bezinin iç yüzünü döşeyen müköz membrandan salgılanır. Sempatik uyarı, gl. veziküloza duvarındaki düz kas liflerinde kasılmalar oluşturarak salgının duktus ejakulatoryusa boşalmasına neden olur. Bu salgı duktus deferens aracılığı ile taşınan milyonlarca spermatozoanın hareket edebilmesi için uygun bir ortam sağlar. Salgıdaki karbohidratlar özellikle fruktoz spermatozoalar için enerji kaynağı olup, %70' i gl. vezikülozadan salgılanır(25, 28). Ayrıca vajinanın doğal asit yapısını nötralize etmeye de yarar. Epitel hücrelerinin boyutları salgılanma süreci ve bezin alkalen salgısının aktivitesinin derecesi testesterona bağlıdır(25).

2.2.2.6. GLANDULA PROSTATİKA

Prostat erkek üreme sisteminin en büyük yardımcı bezidir. 3 cm yüksekliğinde, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığında kestane şeklinde bir organdır. Yaklaşık 20 gr ağırlığındadır. Vezika ürinerya arka alt yüzüne sıkıca tutunan prostat, rektumun ön yüzüyle yakın komşuluktadır.

Prostat bezinde dış kapsül, fascia subseroza denilen fascia pelvikanın organlarının üzerini örten tabakasıdır. İç kapsül (kapsüla prostatika) ise ince, fibröz, sağlam bir yapıda olup lopcukların kanalları 15-20 delikle sinus prostatikusa açılır. Dış kapsül ile iç kapsül arasında ven ağı, plexus prostatikus bulunur. Kapsüla fibrozanın rektum ile arasında septum rektoprostatikum, sympsis pubika ile arasında da lig. Puboprostatikum uzanır.

Prostat 30- 50 adet dallanmış tubuloalveoler yapıda bir bezdir. Yaklaşık 30- 40 tane bezin kanalları birleşerek 15-20 tane duktuli prostatisi olarak sinus prostatikusa açılırlar. Bez dokusu kısmen glandüler kısımda düz kas ve bağ dokusu yapısındadır(25). Pars prostatika üretranın mukoza altında yerleşim gösteren düz kaslarda bezin boşaltma kanallarını sıkıştırarak salgının sürekli akmasına engel olurlar. Ejekülasyonda bez dokusunda yaygın bulunan düz kaslar prostat bezinin salgısını sünger gibi sıkarak sinus prostatikusa akıtır.

Prostat içinde üç tip bez vardır: 1. İç mukozal bezler mukus salgırlar. 2. Orta submukozal bezler ve 3. Esas(external) prostatik bezler, prastat bezinin salgısının büyük kısmını oluşturur(28). Prostat salgısı hacim bakımından ejakulatın en büyük bölümünü oluşturur. İçeriğindeki spermin maddesi salgya keskin ve özel bir koku kazandırır. Salgıda başlıca su, asit fosfataz, kolesterol, tamponlayıcı tuzlar ve fosfolipitler bulunur. Prostat kanserleri genellikle esas(eksternal) bezlerden gelişir. Salgı alkali karakterdedir. Bu salgılar spermatozoayı hareketlendirmeye ve vagina ortamının asiditesini nötralize etmeye yardım eder. Salgının bir kısmı idrarla atılır, fakat çoğu ejakülasyon süresince semenle birlikte atılır. Prostat kanserlerinde glanduler hücrelerin ürettikleri enzim bezlerin kanallarına boşaltılamaz ve kan serumunda asit fosfataz seviyesi artar.

Prostat bezi a.pudenda interna, a. vesikalis inferior ve a. rektalis media'nın dallarından beslenir. Venleri prostatın alt ve yan kısımlarında, organın iç ve dış kapsülü arasında plexus prostatikusu oluştururlar. Plexus prostatikus a. v. dorsalis penise katılır. Ayrıca pl. vertebralis ve pl. vezikalis ile anastomozları vardır. Lenfatikleri nodi lenfatiki iliaki interni ve nodi lenfatiki sakralese açılırlar. Prostatın arka kısmından ayrılan bir kısım lenf damarları ise nodi lenfatiki iliaki externiye açılırlar. Sempatikleri pl. hipogastrikus pelvikus inferiorundan, parasempatikleri ise pl. pelvikus lateralisten gelir (25).

2.2.2.7. GLANDULA BULBOÜRETRALİS (COWPER BEZİ)

Çapları 3-5 mm olan bezelye büyüklüğünde sarımtırak bir çift birleşik tubuloalveoler bezdir. Spatium profundum perinei içinde, prostat bezinin hemen altında ve üretra'nın her iki yanında yerleşim gösterirler. Gl. bulboüretalis m. sfinkter üretranın transfers lifleri ile sarılı durumdadır. Mukus salgılayan tek katlı kübik epitele sahip bezde muköz salgısı, siyalik asit ve galaktoz gibi maddeler içerir. Semen içinde salgının miktarı çok azdır. Taze iken kaygan, akıcı, berrak mukusa benzer görünümündedir. Salgı üretrayı kayganlaştırır ve penisten preejekülator olarak salgılanır (25, 26, 33). Boşaltma kanalları (duktus gl. bulboüretalis) bulbus spongiosum içinden geçerek, üretranın pars spongiosasına açılırlar.

A.pudenda interna, a.vesikalis inferior ve a. rektalis media'nın dallarından beslenir. Venleri pl. prostatikus'un oluşumuna katılır. Pl. prostatikus v.ilica internaya açılır. Pl. prostatikus'un pl. vertebralis ve ve pl. vesikalis ile anostomozları vardır. Lenfatik akımı, Nodi lenfatiki iliaci interni ve nodi lenfatiki sakrales'e açılırlar. Sempatikleri pl. hipogastrikus inferiordan, parasempatikleri ise pl. pelvikus lateralisten gelir (25,28).

2.2.3. SEMEN

Epididimis, vezikülo seminalis, prostat ve gl. bulboüretralisin salgıları, spermatozoa ile birlikte semeni oluşturur. Semen sadece % 1'ini spermatozoa oluşturur. Geriye kalanı erkek genital bezlerinden gelen sıvılardır. Bu sıvılar spermatozoayı beslemek için fruktoz, spermatozoayı hareketsiz kılan vajina ve üretra ortamındaki asiditeyi nötralize eden alkalın ortam, spermatozoayı hareketli kılan tamponlayıcı tuzlar ile fosfolipitleri içerir.

Semenin % 90'ı sudur. Ancak pek çok madde de içerir. Bunlardan en göze çarpanı enerji kaynağı olan fruktozdur. Ayrıca vitamin C ve inositol gibi vitaminler ile Ca, Zn, Mg, Cu, sülfür gibi iz elementleride içerir. Vücutta en yüksek prostoglandin konsantrasyonu semendedir. Semen kokusu testislerde üretilen aminlerden kaynaklanır. Ortalama bir ejakülasyon ile 3-4 ml semen üretilir(25).

2.2.4. SPERMAGENEZİS, SPERMİYOGENEZİS

Germinal hücreler; spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve spermatozoolardır (26, 34, 35). Gametogenezis yani spermatozoa üretimi başlıca iki bölümde gerçekleşir: Spermatogenezis ve Spermiyogenezis. Spermiyogenezis sürecini tamamlayan spermatozoidlerin Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübül lümeninde serbest kalması ise spermiyasyon olarak adlandırılır(29).

Erkeklerde gamet üretimi testiste gerçekleşir. Erişkinde testisler yaklaşık 4x3x2.5 cm boyutlarında, 15-25 ml volumünde olup skrotum içinde yerleşmiş bir çift organdır. Skrotum bağ dokusundan oluşan bir septum ile iki bölüme ayrılmıştır. Skrotum aynı zamanda, dartos kasının kasılıp gevşemesiyle testislerin belirli bir ısıda kalmasını da sağlar. Normalde testisler vücut ısısından 2-3 °C daha soğuk ortamda bulunurlar. Testisler embriyonel dönemin 3. haftasında sölom epitelinin proliferasyonu ile karın arka duvarında gonodal kabartı içinde gelişirler. Dördüncü haftada ise yolk kesesinin endodermal yüzey hücrelerinden primitif germ hücreleri meydana gelir ve fetal dolaşıma katılarak amöboid hareketlerle ve bazı kemotaktik faktörlerinde etkisiyle genital kabartıya ulaşırlar. Aynı zamanda sölom epiteli hücrelerinden sertoli hücreleri, mezanşimal hücrelerden de

interstisyel Leydig hücreleri meydana gelir. Leydig hücrelerinin oluşumunda korionik gonadotropin hormonunun etkisi vardır. Fetüsün 12 ve 18. haftalarında serum testosteron düzeyi ilk pik düzeyine erişir(200- 400 ng/dl). Böylece primitif gonada primitif germ hücreleri (gonositler), sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri yerleşmiş olur(2).

Gonositler mitoz ile çoğalarak spermatogonyumları meydana getirirler. Gonositlerden üreyen ilkel spermatogonyumun ileri derecede özelleşmiş spermatozoa haline gelinceye kadar geçirdiği sürece spermatogenezis denir (26,34).

Spermatogonyumların (Sg) doğumdan sonra 3. ayda meydana geldikleri gösterilmiştir. Bunun yanı sıra gonositlerde 4 yaşına kadar testis içinde bulunabilirler. Seminifer tübül bazal membranı üzerinde oturan spermatogonyumlar, küçük diploid germ hücreleridir, puberteye kadar bölünmezler (30, 37). Önce koyu sitoplazmalı spermatogonyum A dark (Ad)'lar oluşur. Bunların bir türü de bazal lamina ile bağlantıları en çok olan, uzamış spermatogonyumlar olarak tarif edilmiştir. Bunlar koyu bazofilik boyanan, oval heterokromatik nukleuslara sahip, küçük hücrelerdir(37, 38). Seminifer epitelin kök ya da rezerv hücreleri olarak değerlendirilirler (37, 38, 39). Düzensiz aralıklarla bölünerek, hem yeni tip A spermatogonyumları, hem de açık tip A hücreleri meydana getirirler (30, 37, 38, 39, 40). Sitoplazmik organeller açık tiplerden pek farklı değildir. Bunlar mitozla çoğalarak bir yandan yeni stem hücreleri yaparken diğer yandan da daha açık spermatogonyum A pale (Ap)'leri oluşturur. Açık veya soluk A tipi spermatogonyumlar B tiplerinden daha azdır. Oval veya yuvarlak şekilli bu hücreler her zaman bazal lamina üzerine otururlar. Hücre şekline uyum gösteren yuvarlak veya oval çekirdeği ince kromatinlidir. Genelde tek bir nukleolus görülür. A tipi spermatogonyumların sitoplazmasında organeller dağınıktır. Mitokondri yuvarlak şekillidir ve çekirdek yakınında bulunur. Belirgin Golgi kompleksi ve dağınık ribozomlar izlenir. Mitokondriyumlar genellikle 3-5 tanesi bir arada, homojen RNA'dan zengin yoğun bir madde ile birleşmiş görülürler. Açık A tipi spermatogonyumlar yedek hücrelerdir. Gerekğinde spermatogenezisi başlatmak için devreye girerler (26,34, 35).

Sg Ap'ler pubertede FSH ve LH'nın etkileriyle Sg B'ye dönüşürler. Spermatogonyumların en çok bulunan tipi B tipi spermatogonyumlardır. Bunlar da bazal lamina üzerine otururlar. Fakat bazal lamina ile bağlantıları daha azdır. Hücrelerin çekirdeği merkezi olarak yerleşmiş ve yuvarlak şekillidir. Çekirdekte bir ya da iki koyu boyanan çekirdekçik bulunur. Sitoplazmada diğer A tiplerine göre daha fazla ribozom bulunur. Oval yerine yuvarlak olan nukleusları dışında açık tip A spermatogonyumlara benzerler (29,31). Mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler (37). Bu

sırada yavaş fakat belirgin bir büyüme göstererek çapları 18 μm 'ye ulaşır. Hücrelerin sitoplazması spermatogonyumlarınkine benzer. İlk ortaya çıkan primer spermatositlerin uzun profaz dönemleri olduğundan artan bir yoğunlaşma gösterirler. Bu hücreler mayoz bölünmenin preleptoten, leptoten, zigoten, pakiten ve diploten safhalarını geçirerek sekonder spermatositlere dönüşürler.

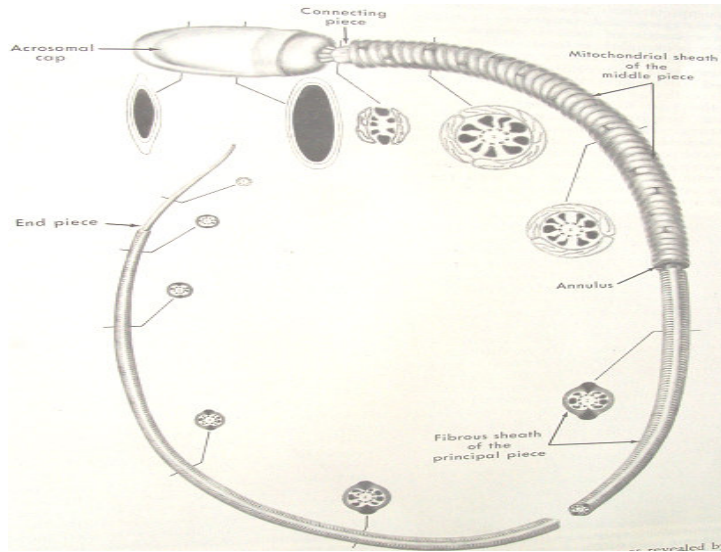
Sekonder spermatositlerde ikinci bir mayoz bölünme geçirerek haploid kromozom setine sahip olan spermatidleri oluştururlar. Erken dönemde spermatidler nispeten küçük, küresel şekilli hücrelerdir. Nükleusları ince kromatinlidir, arada yoğun kromatin yumakları vardır. Nükleus kısa sürede daha da küçülür. Sitoplazmada dağınık düz endoplazmik retikulum, küçük ve perifere dizili, yuvarlak, kristası belirgin olmayan mitokondriyumlar ve iyi gelişmiş Golgi kompleksi görülür. Granüllü endoplazmik retikulum azdır. Küçük ve hücre zarı altında dizilmiş mitokondriyumlar spermatid sitoplazmasının tanınmasını kolaylaştırır (26, 41). Nükleus yakınında tipik, kitle halinde kromatin cisimciği görülür. Bu yapı düzensiz, koyu, fibrilli ve granüllü sahalar içerir, ribonükleoproteinden zengindir. Çekirdek ve sitoplazmasında bir seri değişiklikler gösteren spermatidde, birbirini takip eden fazlar izlenir. Spermatositler de birbirleri ile sitoplazma köprüleri aracılığı ile bağlıdırlar. Bu özellikler spermatidlerde de devam eder. Böylece kardeş hücrelerle birlikte davranmak için fiziksel bir süreklilik sağlanır (26,41).

Spermatid olgunlaşması sırasındaki değişiklikler türlere göre farklılıklar gösterse de genel özellikleri ile hemen hemen aynıdır. Spermatidler olgun spermatozoa oluşana kadar bir takım morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirirler. Spermatidlerin spermatozoaya başkalaşma ve bu sırada geçirdikleri morfolojik değişikliklere spermiyogenez denir. Bu sırada meydana gelen olaylar şunlardır(2, 29):

- Nükleus kondanse olur ve DNA yapısındaki histon proteinleri yerine daha stabil olan protamin proteinleri geçer. Fertilizasyondan sonra tekrar histonlar yerleşir.
- Golgi kompleksi farklılaşarak akrozom başlığını oluşturur. Akrozom içinde oosit etrafındaki tabakaları geçmeye yarayan akrozomal enzimleri salgılayan granüller bulunur.
- Sentriyol nükleusun tabanında lokalize olarak kuyruğu oluşturacak aksiyal filamentleri meydana getirir.
- Sitoplazmada azalma olur ve kuyruğa doğru kayarak rezidü cisim şeklinde dışarı atılır. Sitoplazma fazlalığı sertoli hücrelerince absorbe edilir ya da epididimlerde atılır.

- Kuyruğun baş ile birleştiği orta parçasında mitokondri yerleşir ve burğu şeklinde bu segmenti sarar.
- Sertoli hücreleri içinde olgunlaşan spermatozoa aktif olarak lümen içine atılır. Bu olaya spermiyasyon adı verilir.

Şekil 10: Spermatozoa EM görüntüsü (36)



2.2.5. Spermatozoa

Spermatiddeki değişiklikler sonucu oluşan türe has genetik özellikleri taşıyan hücre spermatozoadır. Spermatozoa 60 μm boyunda olup baş, boyun, orta parça ve kuyruk kısımlarından oluşur. Oval ve yassı olan baş kısmı 4,5 x 3 μm boyutundadır. Başın büyük kısmını nükleus kaplar. Başın 2/3 ön kısmı akrozom denilen bir kılıf ile örtülmüştür. Akrozom oluşumu evrelerinde golgi kompleksinin ve kromatid cisimciğinin katkısı önemlidir. Hücredeki tüm kromatin, nükleus şekillenmesi sırasında homojen, koyu boyanan bir yapıya dönüşür ve hücrenin yaşamı boyunca etkin olamaz (26, 35, 39). Akrozom anterior ve ekvatorial olmak üzere iki segmentten meydana gelmiştir. Hemen arkasında postakrozomal kılıf vardır ve nükleusun geri kalan kısmını örter. Fertilizasyonda asıl akrozomun anterior segmenti önemlidir. Ekvatorial segmenti ise zonaya ilk yapışan kısımdır. En dışta plazma membranı bulunur. Spermatozoa ovuma yaklaştığında plazma membranı ile dış akrozom kılıfı birleşir ve dışarı açılarak içindeki enzimleri ortama salar(Akrozom reaksiyonu). Bu enzimler ovumun etrafını saran hücre tabakalarını ve zarları eritmeye yarar. Bunlar kumulus ooforusu eriten hyaluronidaz, korono radyatayı eriten korona penetrating enzim(CPE) ve zona pellüsidayı eriten ise akrozin enzimidir.

Spermatozoa başının ovum sitoplazması içine girmesini takiben zonadaki açıklığın tekrar onarılması için gerekli nörominidaz enzimi de akrozomdan salgılanır(2).

Spermatozoa sitoplazmasındaki hücre organellerinden sentriol ve mitokondriler dışında diğerleri kullanılmaz. Memelilerde spermatidlerin spermatozoa haline gelmesi belirli basamakları izler. Golgi fazında, önce spermatidin nükleusu etrafında golgi kompleks bölgesinde veziküllü yapılar çoğalır (proakrozomal veziküller). Bunlar birleşince büyük boşluklu yapılar oluşur (akrozom vezikülü). Bu bölgede nükleus yoğunluğunda artış görülür. Nükleusun bir kutbunda belirginleşen veziküller içinde akrozomal granül görülür ve bunlar giderek koyulaşıp büyür. Bu olgunlaşmaya, nükleus yakınında bulunan kromatid cisimcik muhtemelen katkıda bulunur. Sentriol çifti nükleusun karşı kutbuna hareket eder. Sitoplazmadaki mitokondriler hücre çeperine doğru dizilirler (34, 35, 42). Başlık fazında, akrozomal vezikül genişleyerek büyür, çekirdekle temas ettiği yerden başlayarak granül içeriği, çekirdeğin ön kısmını bir başlık halinde sarar. Kromatid cisimcik karşı uca kayarak çiftlerine yaklaşır. Buradan flagellum gelişir. Nükleus uzunluğu artar. Akrozomal granülden akrozom gelişir ve nükleusun 2/3 ön yüzü akrozom ile kaplanır. Burası çokça glikoprotein ve glikolipid içerir. Ayrıca burada galaktoz, mannoz, fruktoz karbonhidratları ile hyaluronidaz, asit fosfataz, nukleoidaz enzimleri de yoğunlaşır. Akrozoma karşı kutupta, kuyruğu oluşturacak mikrotübüller çevresi silindirik bir kılıfla örtülüdür. Uzunlamasına dizili 9 lifle çevrili olan flagellum, spermatozoanın boyun ve kuyruk bölgesini oluşturur. Mitokondriler boyun bölgesinden anulusa doğru göç ederler. Liflerin çevresinde halka şeklinde bir mitokondrial kılıf oluşturlar. Mitokondrilerle çevrili olan bu bölge orta parçayı temsil eder. Olgunlaşma fazı, spermiogenezin son evresidir. Spermatid türe has şeklini alırken spermatid çekirdeğinden spermatozoanın başı, sentrioller ile mitokondrilerden de kuyruk bölümü şekillenir.

Spermatozoa kuyruğu 4 parçadan oluşur: Spermatozoa bağlantı parçası (Connecting piece), Orta bölüm (Middle piece), Esas parça (Principal piece) ve Son parça(Terminal piece).

1. Spermatozoa bağlantı parçası (Connecting piece): spermatozoa başı ile kuyruğu arasındaki kısa parçayı oluşturur. Bölünmüş kolonlar ve yoğun fibröz yapıdan oluşmaktadır. Kapitulum ve spermatozoa başının kaudalindeki bazal tabaka spermatozoa başı ile kuyruğu arasında yer alır. Kapitulum distalinde çizgili yapı (striated collar) ile devam eder ve daha sonra orta parçada dış yoğun lifler 'outer dense fiber' (ODF) ile sürer. Aynı yapı aksonemi de sarar. Spermatozoa başı ile kuyruğu arasında devamlılığı bağlantı parçası denen yapı sağlar. Kapitulumdan geriye doğru uzanan 9 adet parçalı kolon

flagelluma yoğun lif yapıları ile bağlanmaktadır(2). Böylece bağlantı parçası da dış lifler sayesinde devamlılık göstermektedir.

2. Orta bölüm (Middle piece): Aksonem boyunca yer alan 9 adet ODF'nin her biri, mikrotubuler doublet ile ilişkilidir. Bu bölümdeki mitokondriyal yapı helikal düzenlenmiştir ve enerji için gerekli yapıdır. İç mitokondriyal membran enerji üretiminden sorumludur ve flagella motiliteden sorumludur. Bu yapının proksimalden distale doğru çapı gittikçe azalır. Distalde orta parça ile esas parçayı birleştiren anulus ile sonlanır.

3. Esas parça (Principal piece):Aksonem ve fibröz kılıftan (fibröz sheath) oluşur. Anulus ile terminal yapı arasında kalan kısımdır. Fibröz kılıf, aksonem ve ODF'yi sarar. Periferde longitudinal iki kolon (santraldeki mikrotübül çifti planında yani 3 ve 9 nolu ODF'nin zıt yönünde) ve semi sirküler yapılardan oluşur. Fibröz kılıf yapısı disülfid bağları nedeniyle oldukça stabildir. Buna bağlı spermatozoa motilitesine yardımcı olur. Aynı şekilde aksonemal kompleksin spermatozoa plazma membranıyla bağlantısı spermatozoa hareketlerinin etkinliğini artırır.

4. Son parça(Terminal piece):5 µm uzunluğundadır. ODF ve fibröz kılıf yoktur, sadece 9+2 aksonemal yapı mevcuttur. Aksonemal yapı distale doğru: Dynein kolların kaybı, santral mikrotübüllerin kaybı, mikrotübüler doubletlerin ayrılması ve mikrotübül subunitlerin kaybolmasıyla şekillenir.

Bu yapılarda çinko kromatin stabilitesinde rol oynayarak ODF yapısında yer alır. ODF yüksek sistin yapısına bağlı disülfid bağlarıyla stabilize edilir ve sistinin sülfidrit gruplarına bağlanmasını sağlar. Yine spermatozoa membranının stabilizasyonunda görev alır(29).

Tüm spermatozoa polipeptit ve lipitten oluşmuş bir plazma membranı ile çevrelenmiştir. Spermatidin diğer organelleri artık cisimcikler şeklinde Sertoli hücreleri tarafından yok edilir. Olgunlaşma fazında spermatozoanın son şeklinin kazanılması sağlanır. Testis içinde spermatozoaların metabolik ihtiyaçları hala Sertoli hücreleri tarafından sağlanır. Testis dışında ise epididimisten ve sekonder seks organlarından salgılanan maddelerle sağlanır (35, 37, 43).

2.3. SPERMATOOA MORFOLOJİSİ ve FERTİLİZASYONDAKİ ROLÜ

Semen analizinin en önemli ve özenle incelenmesi gereken parametrelerinden birisi de spermatozoaların morfolojik olarak değerlendirilmesidir. Normal spermatozoaların “anormal” morfoloji tanımlaması yapıldıktan sonra spermatozoaların bu tanımlamaya göre sınıflandırılması gerekir.

Koitustan sonra endoservikal kanalın üst bölümünden elde edilen spermatozoaların homojen bir yapıda olduğu gözlenmiştir. Aynı bölgede alınan, postkoital servikal mukus da homojen spermatozoalar içerir ve düz bir çizgide hemen hemen aynı hızda hareket ederler. İşlevsel oldukları ve homojen bir popülasyon oluşturdıkları düşünülerek bu spermatozoaların morfolojik özelliklerinin kriter olarak alınması ve normal ve anormal ayırımının da bu spermatozoaların özelliklerine göre tanımlanması gerektiği kabul edilmiştir.

Spermatozoalar baş, orta parça ve kuyruktan meydana gelmiş hareketli hücrelerdir. Bu farklı anatomik bölgelerin sahip olması gereken özellikler belirlenerek morfoloji değerlendirmesinin bu kritere göre yapılması gerekir. Spermatozoa başı sınırları düzgün, oval bir yapıda olmalı ve baş, çekirdek ile akrozomal kepten meydana gelmelidir. Akrozomal kep baş hacminin % 40–70’ini oluşturarak sınırları belirgin olmalıdır. Postkoital testte varlığı saptanan bazı spermatozoalar bu kriterlerden hafif bir sapma göstermesine karşın yine de “normal” kabul edilirler. Örneğin baş çevresinde sınırın hafifçe irregüler olduğu ya da postakrozomal bölgede hafif bir incelmeye gözlemlendiği spermatozoalar da normal olarak değerlendirilebilir. Ancak bununla birlikte kabul edilip birçok merkezde kullanılan “kesin kriterlere” göre önceden “sınırdan” kabul edilen spermatozoalar artık “anormal” olarak değerlendirilmektedir. Orta parça silindirik biçimli ve spermatozoa başına tam ortadan bağlanmış olmalıdır. Orta parçada sitoplazmik droplet bulunabilir ve bu spermatozoanın olgunlaşmamış olduğunu (immatür) belirlemekle birlikte spermatozoa başının yarısı kadar büyüklükteki bir sitoplazmik droplet bulunması halinde spermatozoa “anormal” olarak değerlendirilmelidir. Spermatozoa kuyruğu uniform ve giderek incelen bir yapı göstermeli ve orta parçadan daha ince olmalıdır. Kuyrukta kıvrım veya sitoplazmik droplet bulunmamalıdır.

Spermatozoaların morfolojik özellikleri sayısal değerlerle de ifade edilir. Ancak burada, kullanılan boya yöntemlerinin spermatozoaların ölçülebilen değerlerinde hafif bir değişikliğe neden olabileceğini unutmamak gerekir. Çünkü yayma preparatlar boyanmadan önce tespit edilir ve fiksatifler hücrelerin bir miktar büzülmesine neden olabilir. Örneğin

Papanicolaou yöntemiyle boyandığında spermatozoa başı 3–5 µm uzunluğunda ve 2–3 µm genişliğindeyse normal kabul edilir. Diff-Ouik boyama yönteminde ise spermatozoa başının yukarıdaki değerleri 5–6 µm ile 2.5 – 3.5 µm olarak saptanmıştır. Orta parça her ikisinde de 1 µm kalınlığında olup uzunluğu da bu değer 1.5 katı kadar olmalıdır. Kuyruk bölümü ise giderek incelen yapısı ile 45 µm uzunluğa sahiptir.

Morfoloji değerlendirmesi spermatozoaların faz-kontrast mikroskobu ile direkt incelenmesi sırasında alışkın bir göz tarafından kabaca yapılabilir. Ancak spermatozoaların hareketli hücreler olması dolayısıyla yeterince izlenememeleri ve oligospermide yeterli sayıda spermatozoa gözlenemeyeceği için bu gözlem yetersiz kalacaktır. Ayrıca bu incelemede spermatozoaların kaba görünüşleri ile tahmin yapılabilir. Baş kısmında çekirdek akrozomal ayrımı, akrozomal kepin özellikleri, orta parçanın lokalizasyonu ve spermatozoa başının çevresindeki farklılıklar yeterince irdelenemez. Bu nedenle semenin likefiye olduktan sonra temiz bir lam üzerine çok ince şekilde yayılması ve kuruduktan sonra tespit edilerek boyanması ve boyalı preparatların değerlendirilmesi gerekir. Spermatozoaların boyalı preparatlarda morfolojik özelliklerinin saptanması, bizlere sağlıklı bir morfoloji değerlendirilmesiyle birlikte immatür germ hücrelerinin ve seminal plazmada bulunan diğer hücrelerin (epitel, lenfositler vb.) de ayrımını sağlar.

Spermatozoa morfolojisi değerlendirilirken semen mutlaka iki ayrı lam üzerine ve çok ince bir şekilde yaklaşık 10 µl yayılmalıdır. Semen yayılması hem arşiv oluşturmak ve gereğinde karşılaştırma yapabilmek ve hem de birinin kırılması halinde diğerinin kullanılmasına olanak sağladığı için avantajlıdır. Semen yayılmadan önce lamın alkolle silinerek temizlenmesi, kuruması ve yaymanın olabildiğince ince olması boyama sonrasında zeminin temiz olmasını, dolayısıyla ayırımın daha kolay yapılmasını sağlayacaktır.

Spermatozoa morfolojisi için kullanılan birçok boyama yöntemi vardır. Bunlar arasında Papanicolaou, Giemsa, Shorr ve modifiye Brayn-Leishman sayılabilir. Giemsa, Papanicolaou yöntemine göre daha kolaydır ve Bryan-Leishman da semende bulunan diğer hücrelerin ayrımını daha iyi yapmakla birlikte Papanicolaou yöntemi spermatozoa morfolojisi konusunda en sağlıklı sonuçları vermesi nedeni ile tercih edilir. Ancak Papanicolaou boyama yönteminin uzun sürmesi nedeni ile geliştirilen hazır spermatozoa boyama kitleri daha çok tercih edilir. Bunlar arasında en çok kullanılanları Spermac (Modified PAP Stain, Stain Enterprises, So. Africa) ve Diff-Quik'tir (Dade Diagnostics, Miami, FL, USA). Bunların da dışında morfoloji değerlendirmesi için yol gösterici olması nedeniyle boyanmış preparat içeren setler de vardır.

Papanicolaou yöntemiyle hücrenin asidofilik çekirdekdeki kromatin ayrıntılı bir biçimde incelenebilir. İnsan spermatozoalarının morfolojik değerlendirmesinin yanı sıra immatür germ hücrelerinin de ayrımını sağlar. Brayn Leishman çoğunlukla hematolojide kullanılan bir boyama yöntemi olup beyaz kan hücrelerinin ayrımında tercih edilir. İnsan spermatozoalarının morfolojik değerlendirmesinin yanında semendeki diğer hücrelerin de ayrımına yardımcı olur. Shorr tekniği önceleri Fransa'da kullanım alanı bulmuşken bu gün klâsik IVF'deki sonuçlarla ilişkisinin yeterli olması nedeniyle bir çok laboratuvar da tercih edilir.

Spermatozoa morfolojisi konusunda her ne kadar kriter oluşturulmuş ise de bu değerlendirmede karşılaşılan en önemli problemlerden birisi de insan spermatozoa morfolojisinin çok fazla şekilde çeşitlilik yani pleomorfizm göstermesidir. In vivo ya da In vitro spermatozoalarının normal kabul edilme ve bu özelliklerine sınır getirme çalışmaları bir çok araştırmacı tarafından yapılmıştır.

Spermatozoa morfolojisi değerlendirilirken koyulan kriterler gibi semendeki hangi hücrelerin spermatozoa olarak kabul edileceğini de belirlemek gerekir. Örneğin immatür germ hücrelerinin olgunlaşma süreçlerinde Sd 1 evresi de dahil olmak üzere gözlenen spermatozoa öncülleri bu sayımlarda spermatozoa olarak kabul edilip değerlendirilmelidir. Tek tek bulunan spermatozoa başları sayım sırasında dikkate alınırken başsız kuyruklar (pinhead formlar da dahil) spermatozoa olarak sayılmalıdır. Çünkü pin-head formunda kuyruğun önündeki bazı plaklar çoğunlukla çekirdek materyali içermezler. Ancak sonuç belirtirken varsa pin-head oranı ayrıca belirtilmelidir.

İnsan spermatozoaları çok sayıda anomaliyi ya da defekti bir arada bulundurabilir. İşlevsel özellikleri dikkate alınarak spermatozoa başı ve orta parçadaki anomali birlikte görülüyorsa baş anomali; spermatozoa hem orta parça ve hem de kuyruksa anomaliye sahip ise orta parça anomali olarak yorumlanabilir. Spermatozoa kuyruğunun kıvrıntılı olması onun hipotonik bir stresle karşılaştığını göstermesi nedeniyle anomali olarak kabul edilmeyebilir.

Spermatozoa morfolojisi irdelenirken;

- Boyalı preparatlarda en az 100 spermatozoa değerlendirilmelidir. Sağlıklı bir sonuç almak için daha geniş bir alanı tarayarak örneğin 200 spermatozoa incelemek gerekebilir.

- Spermatozoa morfolojisi değerlendirmesinde eğer spermatozoa boyutları konusunda kuşku duyulursa ölçekli oküler kullanılmalıdır.

- Her bir preparatta en az dört alan taramalı ve değerlendirme mutlaka immersiyon yağı kullanılarak X100'lük objektif ile yapılmalıdır. 3 kere değerlendirilmelidir.

Spermatozoanın morfolojik özellikleri belirlenirken kullanılan sınıflamalar birçok araştırmacının katıldığı araştırmalar sonucu geliştirilmiştir. Bu sınıflamaların bir bölümünde spermatozoalar tek bir anomalisiyle tanımlanmış, böylece tek girişli derecelendirme sistemi (single entry scoring method) kullanılırken bir diğer bölümde çok girişli derecelendirme sistemine göre sınıflama yapılmıştır.

2.3.1. WHO 1980 Sınıflaması

Who Laboratory Manual ilk kez 1980’de yayınlanmış ve burada spermatozoa morfolojisi ayrımında hangi sistemin kullanıldığı belirtilmekle birlikte 1964’de MacLeod tarafından “normal” ya da “fertil” bireylerde karşılaşılabilecek spermatozoa anomalilerinin yüzde oranına göre değerlendirme yapılmıştır.

2.3.2. WHO 1987 Sınıflaması

Bir önceki sistemde çeşitli spermatozoa anomalilerinin görülme sıklığına göre değerlendirme yapılırken bu sistemde önceden kullanılan kriterler modifiye edilmiştir. Ancak yine de hangi sistemin (tek veya çoklu anomaliler) baz alındığı belirtilmemekle birlikte spermatozoa anomalileri baş, orta parça ve kuyruk anomalileri olarak üçe ayrılarak değerlendirilmiştir. Buna göre:

Baş: Normal, büyük oval, küçük oval, incelmış, piriform şekilli, çift başlı, amorf, yuvarlak veya pin şekilli olabilir.

Orta Parça: Normal ya da anormal olabileceği gibi sitoplazmik droplet içerebilir.

Kuyruk: Normal veya anormal olabilir.

2.3.3. David’in Çok Girişli Sınıflaması (David’s Multiple Entry Scoring Classification)

Bu sistem ilk kez Fransa’da geliştirilmiştir. Buna göre, spermatozoanın her bölgesinde görülebilecek anomaliler ayrı ayrı değerlendirildiği için 100 spermatozoa sayıldığında değerlendirilmeyen anomali kalmaz. İncelenen tek bir spermatozoda en fazla dört anomali saptanmıştır. Spermatozoalarda gözlenen anomaliler 13 spesifik grupta ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Baş: İncelmış (uzunluğu $<6.0\ \mu\text{m}$, tek bir alanda incelmış ve silindirik biçimli sonlanmış olabilir), küçük, büyük, çift baş anomalileri veya lizis evresindeki görünümle karşılaşılabılır.

Orta parça: Sitoplazmik droplet içerebileceği gibi kıvrılmış kuyruk (başın uzun eksen ve kuyruk arasında 90 derecelik bir eğilim olması) söz konusu olabilir.

Kuyruk: Olmayabilir, kısa, kıvrılmış veya çift olabilir.

2.3.4. Basitleştirilmiş Çok Girişli Sistem (Simplified Multiple Entry Scoring Classification)

Bu sınıflama Calgary’de geliştirilmiş ve rutin olarak Papanicolaou yöntemiyle boyanan preparatlarda değerlendirme yapılmıştır. WHO tarafından olgunlaştırılan şemalar kullanılmakla birlikte laboratuvarlarda kullanımı kolaylaştırmak amacıyla spermatozoa anomalileri en fazla sekiz kategoride incelenmiştir.

Bu sistemde spermatozoalar önce normal ve anormal olarak ayrılır. Daha sonra da aşağıda sıralanan her bir anomali tek tek irdelenerek anormal spermatozoalar sınıflandırılır. Bunlar: İncelen baş, anormal baş, immatür spermatozoalar (sitoplazmik droplet içerenler), orta parça defekti, kuyruk defektleri, kıvrık kuyruk ve kuyruksuz spermatozoa başları olabilir. Sitoplazmik droplet Papanicolaou yöntemiyle yeşile boyanırsa ve hacim olarak da başın yarısı büyüklüğünde ise spermatozoa anormal olarak değerlendirilir.

2.3.5. David’in Çok Girişli Sınıflamasının Modifikasyonu (Modified David’s Multiple Entry Scoring Classification)

Orijinal David sisteminin modifikasyonudur. Spermatozoalar germinal hücreler ya da diğer hücreler arasında değerlendirilir. Bu sistemde 15 anomali baz alınmış ve spermatozoalarda bu anomalilerin bulunup bulunmadığı irdelenmiştir.

Baş: İncelenmiş, küçük, büyük, çok başlı (genellikle çift), anormal tabanlı olabileceği gibi akrozom anomalileri içerebilir veya akrozom bulunmayabilir.

Orta Parça: Sitoplazmik droplet içermesi, incelenmiş orta parça ve kıvrık kuyruk anomalileri yönünden değerlendirilmelidir.

Kuyruk: Olmayabilir. Kısa, irregüler genişlikte, kıvrık veya çok sayıda olabilir.

2.3.6. Tygerberg Kesin Kriter Sınıflaması (Tygerberg Strict Criteria Classification System)

1986’da Kruger’in tanımladığı sistemde insan spermatozoalarının morfolojik özelliği rutin morfometrik analizi içermekle birlikte, spermatozoa başının kesin olarak belirlenen normal ölçülerin altına inmesi halini gözleyerek değerlendirilmesini önerir. Buna göre, spermatozoa başı sınırları düzgün ve oval ise, başın % 40–70’ini akrozom kaplıyorsa

normal kabul edilmelidir. Morfometrik olarak spermatozoa başı 5–6 µm uzunluğunda, 2.5–3.5 µm genişliğinde olmalı ve kuyruk uzunluğu ortalama 45 µm olmalıdır. Ayrıca boyun, orta parça ve kuyruksa da anomaliler olmamalı ve boyun bölgesinde spermatozoa başının yarısından daha büyük sitoplazmik droplet bulunmamalıdır. Diğer sistemlerden farklı olarak Kruger “sınırsa” kabul edilen spermatozoaları “anormal” olarak sınıflandırır.

Baş: Büyük, küçük, incelmış, çift veya amorf olabilir. Ayrıca boyun veya orta parçada da anomaliler olabilir veya olmayabilir ve kuyruk defekti de eşlik edebilir.

Diğerleri: Boyun defekti (baş ile kuyruk arasında 30 dereceden fazla bir eğim bulunması), orta parça defektleri, kuyruk anomalileri (çift veya kıvrık oluşu), gevşek baş, immatür formlar (sitoplazmik droplet) olarak gruplandırılmıştır. Bütün bu kriterlerin saptandığı spermatozoalar ayrı ayrı not edilir ve en az 100 spermatozoa incelenerek sonuç çıkarılmalıdır.

Kruger’in kesin kriterleri (Kruger’s Strict Criteria) Papanicolaou veya Diff Quik ile boyanmış preparatlarda incelenebilir ve normal formlar % 14 veya daha üzerinde olması beklenir.

2.3.7. WHO 1992 Sınıflaması

Spermatozoa morfolojisinin değerlendirilmesi için geliştirilen sistemlerin tümünde belirgin ve objektif tanımlamalar olmalıdır. Bu görüşle yola çıkıldığında Tygerberg ve David sınıflamaları ideal sistemler olarak kabul edilir. Çünkü bu incelemelerde irdelenen her bir özellik için alt gruplar oluşturularak teratospermi indeksi ya da çoklu anomaliler değerlendirilebilir.

Baş, şekil ve büyüklüğündeki defektler: Baş, büyük, küçük, incelmış veya priform şekilli olması, amorf görünümlü ya da vakuollü olması (baş alanın % 20’sinden fazlasının boyanmamış vakuoler bölgeler içermesi), akrozomun küçük olması (baş hacminin % 40’ından daha küçük bir alanı kaplaması), akrozomun olmayışı, çift başlı olması veya bu karakteristiklerin kombinasyonu gözlenebilir.

Boyun ve Orta Parça Defektleri: Kuyruğun olmayışı (serbest veya gevşek baş), kıvrık kuyruk veya kuyruğun spermatozoa başına uygun pozisyonda sokulmaması, genişlemiş veya irregüler orta parça, çok ince orta parça (mitokondriyal kılıfın bulunmadığı anlamına gelir) veya bunların kombinasyonu saptanabilir

Kuyruk Defektleri: Kısa, çok sayıda, toka biçiminde kıvrılmış, çift kuyruk, kırık (baş ile arasında 90 dereceden fazla açı olması) olabileceği gibi, genişliğinin irregüler olması, terminal droplet, kıvrık kuyruk veya bunların kombinasyonu ile de karşılaşılabilir.

İmmatür Formlar: Spermatozoa başının normal büyüklüğünün 1/3'ü kadar veya daha büyük sitoplazmik droplet bulunması halinde spermatozoalar immatür olarak kabul edilir. Çift baş, çift kuyruklu spermatozoaların spermiyasyon sırasında birbirinden yeterince ayrılamayan spermatozoalar olduğu kabul edilir. Bu durumda spermatozoalar ayrı ayrı değerlendirilir ve spermatozoaların ayrılamadığı ya da birleştiği nokta anormal olarak kabul edilir(44).

2.4. SPERMATOOA MORFOLOJİSİNİN KLİNİK ÖNEMİ

Günümüzde infertil çiftlerin çocuk sahibi olabilmesi için kullanılan tekniklere her gün yenileri eklenmekte ve başarıyla uygulanmaktadır. Klasik in vitro fertilizasyon yöntemlerinde başarıyı etkileyen faktörler araştırıldığında, spermatozoanın morfolojik özelliklerinin fertilizasyon üzerinde direkt etkili olduğu saptanmıştır. Örneğin teratospermi olgularında klâsik IVF'nin başarısızlığı beklenmeyen bir sonuç değildir. Strick kriterlerine göre normal morfoloji için belirlenen eşik değer % 14 olarak saptanmıştır. Strick kriterleri göz önüne alınarak normal spermatozoa morfolojisi sonuçlarının prognostik değerini test eden bir çalışmada fertilizasyon oranı % 82,5 ve normal form yüzdesi % 14 ve üzeri olan grupta hamilelik oranı % 25,8 bulunmuştur. Normal formların yüzdesi % 14 altında olduğunda ise fertilizasyon % 37,0 olarak bulunurken hamilelik sağlanamamıştır (11, 12).

Bu bulgular Kruger'in kesin kriterlerinin kullanıldığı geniş kapsamlı çalışmaların sonuçlarıdır. Spermatozoa morfolojisinin kesin kriterlerle değerlendirilmesi fertilizasyon oranının önceden tahmin edilerek önlem alınmasına ve hatta çiftin direkt olarak ICSI programına yönlendirilmesine neden olabilir. Benzer biçimde, spermatozoa morfolojisinin kesin kriterlerle değerlendirilmesi spermatozoa fonksiyon testleriyle de önceden tahmin edilen sonuçları vermektedir (44).

2.5 ANORMAL SPERMATOOA TANIMLAMASI

Kesin kriterler ile spermatozoa morfolojisi değerlendirilmesinde yukarıda boyutları verilerek tanımlanan spermatozoalar dışında kalan tüm spermatozoalar anormal olarak kabul edilir. Anormal spermatozoa formları aşağıdaki şekillerde olabilir:

2.5.1. Baş Şekli Anomalileri:

Borderline “Sınırdaki” Baş Anomalleri: Bunlar hafif anomaliler olup, ilgili spermatozoa belirli bir anormal form sınıfına sokmaz.

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

Sitoplazmik Droplet: İmmatürite işaretidir.

Yuvarlak: “Globozoospermia”. Genellikle akrozom yokluğu nedeni ile spermatozoa başı yuvarlak şekil alır. İmmatürite işaretidir.

Diadem Defekti: Spermatozoa başı üzerinde yer alan çöküntü alanlarıdır. Nükleus içine doğru olan invajinasyonlardır.

Küçük: Spermatozoa başı, tanımlanan boyutlardan daha ufaktır.

Büyük: Spermatozoa başı, tanımlanan boyutlardan daha büyüktür.

Amorf: Spermatozoa başının ovoid olmaması durumudur.

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

Elonged: Spermatozoa başı tapered formda olduğu gibi sivri değildir, ancak tanımlanan boyutlardan daha uzundur. Postakrozom kısmında incelme söz konusudur.

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

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

Vakuol: Spermatozoa başında boya almayan boşluklar vardır.

2.5.2. Akrozom Anomalileri

Primer Akrozom Anomalileri: Spermatozoa gelişmesi ve diferansiyasyonu sırasında meydana gelen anomalilerdir. Anormal formasyon, anormal dağılım ve spermatozoa 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: Spermatozoa membranının eksternal etkenler, yaşlanma veya harabiyetine bağlı olarak akrozom içeriğinin kaybıdır.

Membran bozulması: Akrozom konturlarının düzenli olmaması durumudur.

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

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

Akrozomsuz: Spermatozoa başı yuvarlak şekilli ve koyu renkli boyanmış görünür.

Ayrılmış: Akrozomun spermatozoa başından hafifçe uzaklaştığı izlenir.

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

Nükleus Vakuolleri: Çekirdek içinde boşluk alanları vardır.

2.5.4. Mid-piece Anomalileri: Mitokondrilerin yer aldığı bölüm olduğu için çok önem arzederler. Spemin enerji desteğinden yoksun kalması söz konusu olabilir ve bu durumlarda spermatozoa immotil olabilir. Mid-piece anomalileri baş veya kuyruk anomalileri ile birlikte olabilir.

Sitoplazmik droplet: İmmattürite 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 (kıvrılmış): Baş ile kuyruk arasında mid-piece, zayıflığı veya yokluğu söz konusudur. Baş ile mid-piece, sitoplazmik bir parça ile birbirine tutunur. Bu spermatozoaların progresif motilite göstermeleri sözkonusu değildir.

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

Büyük: Mid-piece kalınlığı 1µm'dan daha fazladır.

Küçük: Mid-piece kalınlığı 1 µm'dan daha azdır.

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

Nonaksiyel: Spermatozoa başı ile mid-piece aynı aks üzerinde değildir. Progresif motiliteyi güçleştirir.

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

Kuyuksuz: 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 anomaldır.

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

2.5.6. Karışık Anomaliler: Baş ve kuyruk anomalilerinin aynı spermatozoa üzerinde bulunması durumudur.

İmmatür form: Primer ve sekonder spermatositler veya spermatidler olabilir. Çok nükleuslu olabilirler. Kuyruksuz, yuvarlak formda veya immatür kuyruklu olabilirler.

Aglunitasyon: Spermatozoların kümелendiği kalabalık alanlardır. İmmünolojik infertilite nedeni ile kümelenme olabilir. Ancak lam üzerine semenin yayılması esnasında yapılabilecek hatalarda aynı kümelenmeye neden olabilir. Değerlendiren kişi, bu tür bir görüntüyü immatürite işareti olan imkomplet seperasyondan mutlaka ayırabilmelidir(44).

Sınıflandırılmayan: Yukarda tanımlanan anomalilerden herhangi birine giremeyecek derecede bozuk şekli olan spermatozolardır.

Semen sitolojisi:

Polimorfonükleer lökositler: Yuvarlak hücrelerdir. Semen değerlendirilmesinde 2 milyon/mL olması durumunda mutlak üroloji konsültasyonu önerilir.

Bakteriler: Bazı preparatlarda koliform veya diğer formlarda olan boyanmış bakteri grupları görülebilir. Bu durumlarda mutlak üroloji konsültasyonu önerilir(44).

2.6. SPERMATOOA ANALİZİ

Semen analizi yani Spermiyogram; spermatozoa sayısını, şeklini, hareketini değerlendirmeye yönelik bir test olup ve erkek infertilitesi değerlendirilmesinde yapılması gereken ilk testtir.

3 günlük cinsel perhizden sonra yapılır. İşlemin doğru sonuç vermesi için spermatozoa örneği en geç 1 saat içinde laboratuara ulaştırılmalı, tercihen spermatozoa örneği laboratuara yakın bir mekanda verilmelidir. Bu amaçla infertilite merkezlerinde spermatozoa örneği verebileceğiniz bir alan ayrılmıştır(2,36).

Spermatozoa değerlendirme kriterleri, birkaç farklı sınırı kullanır. Kruger kriterleri özellikle spermatozoa şekil bozukluklarını göz önüne alan bir değerlendirme yöntemidir. Özel bir boyama sonrası spermatozoa morfoloji özellikleri incelenerek spermatozoa örneğinin fertilite kapasitesi belirlenir. Spermatozoa analizi sonucuna göre ideal olarak karar verebilmek için, ikişer hafta ara ile yapılmış en az 3 farklı spermatozoa örneği

incelenmelidir. Spermatozoa analizinde bir fertilité sorunu saptanırsa erkeğin fiziksel ve hormonal ileri muayenesine geçilir. Spermatozoa üretim döngüsü 2-3 ayda bir tekrarlanır. Yani üretilen bir spermatozoa 2-3 ay sonra semene salgılanacaktır. Aynı şekilde kişinin karşılaştığı zararlı etkenler veya tedavi için kullanılan faydalı ilaçlar da spermatozoa üretimini 3 ay içinde etkileyebilir. Semen analizi sonuçlarını değerlendiren bu süreç akılda tutulmalıdır.

Semenin fiziksel incelemesinde semen miktarı, likefaksiyon, renk, volum, vizkosite, pH önemlidir. Normal bir spermatozoa oda ısısında 15 dakika içinde likefiye olmalıdır. Likefaksiyondan prostat bezi salgısı sorumludur. Semen rengi normalde gri-opak görünümündedir. Sarı yeşilse enfeksiyon lehine, kahverengi kırmızı ise eritrosit lehine yorumlanır. Semen volümü normalde 2-5ml olmalıdır. Normal vizkositede ejakulat pipetin ucundan sarkmadan küçük damlalar halinde dökülmelidir. 1- 2 cm'lik bir uzama varsa +1, 2-4 cm'lik bir uzama varsa + 2, 4 cm üzeri bir uzama varsa +3 viskositedir. pH'sı ise 7.2-8.0 arasında olmalıdır.

Mikroskopik muayenede bir damla semen numunesi incelenerek spermatozoa konsantrasyonu, motilitesi, aglutinasyon, spermatozoa dışı hücreler (immatür germ hücreleri, lökositler, eritrosit, bakteri) araştırılır. Makler kamerasıyla spermatozoa sayımı yapılır. Spermatozoa motilitesi dört derece üzerinden değerlendirilir. Supravital boyalarla viabilite değerlendirmesi yapılır. Morfolojik analiz yapılır.

Kruger kriterlerine göre bir spermatozoa normal olarak değerlendirilebilmesi için spermatozoa baş, boyun ve kuyruk bölümlerinin normal olması gerekmektedir. Baş oval olmalı ve boyu 4-5 µm, genişliği ise 2.5-3.5 µm olmalıdır. Akrozomal bölge, baş bölgesinin %40-70'ini kaplamalıdır. Orta kısım, ince ve uzun olmalı ve genişliği 1 µm'den az, boyu baş uzunluğunun 1.5 katı olmalıdır. Kuyruk ise orta parçadan daha ince, düz ve kıvrılmamış olmalı, kırık içermeyen ve sitoplazmik artıklı olmamalı, yaklaşık uzunluğu 45 µm olmalıdır. Kruger kriterlerine göre bu sınıflamanın dışındaki tüm değerler anormal kabul edilmektedir (45,46,47).

2.6.1.Normal spermatozoa analizi değerleri:

Volume: 1.5- 5.0 ml

Ph: 7.2 'den büyük

Viskosite: 2'den az

Spermatozoa konsantrasyonu:20 milyon/ml 'den fazla

Total spermatozoa sayısı :40 milyon'dan fazla

Motilite yüzdesi	: (a+b) % 50'den fazla olmalı. (a: ileri hızlı) , (b: ileri yavaş)
Morfoloji	: % 30 normal 'dan fazla normal (WHO kriterlerinde) %14 'den fazla normal (KRUGER STRICT kriterlerinde)
Lökosit	: 1 milyon/ml' den az olmalı
Aspermi	: Ejakulatın semenin hiç gelmemesidir.
Azospermi	: Ejakulat vardır fakat içerisinde hiç spermatozoa yoktur.
Oligozoospermi	: 20 milyon/mL 'den az spermatozoa olmasına denir.
Şiddetli oligozoospermi	: 5 milyon/ml 'den az spermatozoa olmasıdır.
Astenozoospermi	: Spermatozoaların motilitesi zayıftır(2).

2.7. BOYALAR

2.7.1. HEMATOKSİLEN-EOZİN

Hematoksilen ve Eozin boyası en yaygın kullanılan histolojik boyadır. Bu popüleritenin nedeni; farklı yerlerden ve farklı yollarla hazırlanan çok fazla farklı dokudaki yapıları temiz net bir şekilde gösterebilme kabiliyeti ve kolay bir boya olmasıdır. Hematoksilen hücre çekirdeklerini mavi-siyah renge boyar ve intranükleer detayları iyi gösterir. Eozin ise; sitoplazmayı ve birçok bağ dokusu fibrillerini pembe, turuncu, kırmızının çeşitli renk tonlarında ve yoğunluklarında boyar. Bununla birlikte Hematoksilen, Hematoksilen-Eozin kombinasyonundan daha fazla kullanılır(48).

2.7.2. EOZİN

Eozin rutin laboratuarlarda bir dokunun genel histolojik yapısını belirlemek için alüm hematoksilen boyalarla kombine edilebilen en uygun boyadır. Zayıf asidik bir boyadır ve dokunun katyonik kısmıyla birleşir. Özelliğini kırmızı ve pembenin değişen tonlarında sitoplazmik yapıları boyayarak, farklı hücre tiplerinin sitoplazmalarını, bağ dokusu fibrillerini ve matriksin farklı tiplerini ayırmak için özel farklılaşabilme yeteneğinden alır. Sitoplazmik bir boya olarak genellikle saf sudaki ya da alkoldeki %0.5 ile %1'lik solusyonları kullanılmaktadır. EozinY, Etil Eozin, EozinB gibi (48).

2.7.3. TOLUIDİN BLUE

Toluidin Blue, bazik anilin boyaların tiazinler grubundan olup molekül ağırlığı 305.840wt'dir. Önemli bir çekirdek boyasıdır ve metakromazi özelliğini çeşitli derecelerde gösterir(49). Toluidin Blue boyasında asidik maddelerin metakromatik boyanması

amaçtır(50). Metakromazi boyanın pH, ısı ve konsantrasyona bağlı olarak doku elemanlarını boya solusyonundan farklı bir renge boyamasıdır. Mavi ya da violet kırmızı bir renge değişim gösterebilir ve metakromatik doku elemanlarında kırmızı sarı renge değişim gösterebilir(51). Bazı asidik karbonhidratlar metakromatik yani pembe-kırmızı veya eflatun boyanırken, nükleuslar ve stoplazma ortokromatik (mavi- renge) boyanır(52). Spermatozoa baş morfolojisini, özellikle de nükleer kondansasyonu göstermesi bakımından önemlidir(53).

2.7.4. GİEMSA

Giemsa boyası ilk kez 1904 yılında Giemsa tarafından uygulanmıştır(50). Giemsa boyası, Romanowski boyalarının bir üyesidir. Metanolde çözündürülüp metilen blue ve eozinin sulu solusyonlarının eklenmesiyle şekillenerek koyu presipitatların oluşumu olarak tanımlanır. Romanowski grubu çeşitleri, önceden çökeltilmiş metilen blue boyasının oksidasyonun derecesine göre farklılaşırlar.

Bu boya ile tek aşamalı tesbit edilmiş yaymalar için ve dokuların ince tabakalarında-omentumun yayma preparatlarında çekirdekler mavi boyanırken stoplazma pembe boyanır. Çalışma boyası konsantrasyonundaki ve boyama zamanındaki küçük değişikliklerle, yıllardır bekleyen fikse edilmiş doku kesitlerinin boyaması yapılabilir. Romanowski boyalarının son derece usandırıcı uzun süren hazırlanması vardır ve ticari stok solusyonların satın alınması pratik kolaylık sağlar(51). Giemsa boyasında amaç lökosit tiplerinin farklılaşmasını, inklüzyon cisimciklerini, riketsiya ve bakterileri göstermektir(50). Ayrıca somatik ve mitotik metafaz kromozomlarının gösterilmesi de amaçtır(54).

2.7.5. WRIGHT BOYASI

Romanowsky boyasının bir modifikasyonu olan Wright Boyasını 1902 yılında James Homer Wright adındaki araştırmacı bulmuştur(55). Wright boyası eosin ve çinkoklorid içeren polikromlanmış metilen blue içerir(56). Bu boya laboratuarda şimdilerde nadiren yapılmaktadır. Boyanın toz halinde üretilip ticari hazırlanmış kombine solusyonları formu kolaylaştırılmış boyalardır(54, 55). Işık mikroskopunda görülebilen hücreler arasındaki farklılıkları belirlemede kullanılan histolojik bir tekniktir. Periferik kan smetleri ve kemik iliği aspiratlarını incelemede kullanılır. Wright boyası sitogenetik çalışmalarda sendrom ve hastalıkların tanısı ve görselleştirmesinde kromozom boyası olarak kullanılır(55). Lilly'nin Wright boyasının çekirdek ve parazit boyamasındaki seçiciliği dikkate değerdir(54). Kan hücreleri kendi arasında kolaylıkla ayırt edilebilir. Farklı beyaz kan hücrelerinin sayımında

özellikle enfeksiyon hastalıklarında yaygın olarak kullanılır. Tamponlu Wright boyası, Wright- Giemsa boyası ve Tamponlu Wright- Giemsa boyası olarak bilinen boyalar birbirleriyle ilişkili boyalardır. Eosin Y, Azure B ve Metilen Blue içerirler. May Grünwald boyası daha belirgin renkler sağlar ve daha uzun zaman uygulanabilir (55).

2.7.6. WEIGERT'İN DEMİRLİ HEMATOKSİLEN BOYASI

1904 yılında Weigert tarafından bulunan bu boya; hematoksilen, ferik klorid ve hidroklorik asit içeren bir nükleer boya solusyonudur(57,58).Weigert boyası, Hematoksilenin tamamen hemateine okside olmasından ve çözünebilir kompleks iyon ya da moleküllerin oluşmasından sonra dahi demir iyonlarını fazlaca içerir. Serbest Fe boya demir kompleksinin bağlanması için dokularla kompleks kurar. Nükleer kromatin içinde oldukça güçlü bağlar oluşur(56). Van Giesson boyası ile kombinasyonu da yararlı olup özellikle kesitlerde bağ dokusu elemanlarını göstermede yararlıdır (57,58). Weigert hematoksilenin başlıca kullanımı asit boya solusyonları tekniklerinde nükleer boya olarak müteakip kesitlere uygulanabilmesidir(48). Bu method sitolojistler ve protozoistler tarafından kromatin, kromozom, mitoz içiği, sentrozom, mitokondri ve diğer sitolojik detayları incelemek için yaygın olarak kullanılabilir. Kalp kasında Trypanosoma Cruzi identifikasyonu ve çalışmalarında, Entamoeba Histolitica, Plazmodia ve Sarcosporidiayı göstermede faydalıdır(49).

2.7.7. ORANGE G

Orange G, Asit Orange 10 ya da C.I.16230 bir çok boya formülasyonu içinde histolojide kullanılan sentetik anyonik mono azo boyasıdır (49,56). Bu boya genellikle disodyum tuzu olarak bilinir ve turuncu kristaller yada toz görünümüne sahiptir. Bu boya sitoplazmik boya olarak kullanılır. Genellikle diğer anyonik boyalarla kombine kullanılır. Su içinde çok çözünür, fakat alkolde çok az çözünür. Numune anhidroz boyanın ağırlığının en azından %80'ini içermelidir. Orange G'nin ana kullanımı OG6'nın içinde Papanicolau boyasında keratin boyası olarak ve ayrıca polen boyası için Alexander testinin majör komponentidir. O diğer sarı boyalarla sıklıkla kombine edilir ve trikrom methodlar içinde eritrosit boyası olarak kullanılır(56). Genel dokular için özellikle kontr boya olarak kullanılır. Hücre duvarı, çekirdek, sitoplazma ve glukojen granülleri için kullanılan genel boyadır. Diğer boyalarla kullanıldığında dokuların matüritesi ile yapısal çeşitliliği hakkında bilgi verir(54).

2.7.8. ANİLİN BLUE

Anilin blue water blue, chine blue, asit blue gibi isimlerle anılan kollajen lifleri boyası ve plazma boyası olarak kullanılan asidik bir boyadır(49, 56). Su içinde iyi çözünür, fakat alkol içinde çözünmez. Anilin blue kollajen boyası olarak Masson trikrom, Mallorinin konnektif boyası ve Gomorinin trikrom boyasında kullanılır. O differansiyasyon boyasıdır. Kollajenöz ve retiküler lifler, kıkırdak, kemik, amiloid, nükleuslar rahatlıkla görülebilir(50). Spermatozoa nükleus DNA'sında Anilin blue ile histonlar boyanabilmektedir. Böylece spermatozoa DNA maturasyonu ya da kondansasyonu hakkında fikir verebilir(59).

2.7.9.SHORR BOYAMA METODU

Shorr boyası başlıca smearler için kullanılır(49). Bu yöntem (Shorr, 1941), Papanicolaou tarafından tanımlanan boyama yöntemine oranla daha basittir ve daha çabuk yapılır. Shorr boyası çeşitli hücre tiplerinde sitoplazma ayırımını güzel belirttiğinden hormonal durumların saptanması için uygundur(60). Eozinofili ve bazofili tam olarak ayırt edilebilir(61). Bu teknik servikal sitolojide süperfisyal ve bazal hücrelerdeki diferansiyasyonu iyi bir şekilde ortaya koyar. Fakat nükleer morfolojide ve malignite tanımlamasında yetersizdir. Bununla birlikte önce hematoksilen ile boyama yapılarak bu yetersizlik giderilebilir(48, 60).

2.7.10. PAPANİCOLAU İLE BOYAMA

Papanicolou tekniği sitoplazmayı eozin ile, mukusu light greenle, keratini ise orange G ile boyayan rutin kullanılan bir metoddur. Sitoplazmada temiz şeffaf bir görüntü verir ve nükleer morfolojide güvenilir bir methoddur. Nükleer kromatin alum-hematein ile mavi boyanır(56). Hormonal değerlendirmede eğer daha güvenilir karyopiknotik indeks değerlendirme için kullanılır ise sitoplazmik boyanmanın değişkenliği dezavantaj değildir(48). Vajinal, servikal ve uterin kanser tanısında vajinal smearde kullanılır. Bu teknik Harris hematoksilen'i, Orange G ve EA 36 polikrom boyasını içerir(54).

2.7.11. BERG METODU

Berg, seri çalışmaları(1955- 1958) bazı enzimleri kullanarak kemiricilerin barsağında bulunan inorganik polifosfatları identifiye ederek 3 çeşit siklik trimetafosfatı elde etmiştir. Özellikle bu boya servikal smearlerde kullanılır(49).

2.7.12. LIGHT GREEN

Light Green alkolde %1'lik solusyon olarak hazırlanan özellikle hücre duvarı ve sitoplazmayı göstermede kullanılan Fast Greene benzer ve onun yerine kullanılan bir boyadır(54). Fast green'in fenolik hidroksil grubunun eksilmesiyle oluşur(56). Kollajen lif boyası ve plazma boyası olarak kullanılan asidik boyadır(49). Papanicolau boyasında, Roresin modifiye masson trikrom boyasında, nörosekretuar ürünler için aldehit fuksin boyasında, kromozomların gösterildiği lökobazik fuksin boyasında kontr boyası olarak kullanılır(54).

2.7.13. AKRIDINE ORANGE

Akridin Orange (AO) hücre siklus belirlenmesi için kullanılan nükleik asit selektiviteli metakromatik bir boyadır. AO elektrostatik çekim ya da araya girme DNA ve RNA'da sırasına göre karşılıklı etkileşimdedir. DNA AO ile 525nm'de yeşil ışığa verirken RNA ise elektrostatik olarak AO sınırında 630 nm'de kırmızı, turuncu ışığa yapar. Durgun ve aktif ayrımını yapar. Prolifere hücrelerin multipl G1 kompartmanının diferansiyel tayinini sağlar. AO apoptoz ölçümü için faydalı bir metod olarak kullanılabilir ve hücre içi pH gradiyenti belirlenmesi için ve proton pompa aktivite ölçümünde kullanılabilir. Bu boyası prosedürü flow sitometri tarafından hücre analizi için kullanılan optimal boyadır(65).

2.7.14. JANUS GREEN

Histolojide kullanılan temel boyadır ve supravital mitokondri boyasıdır. Formülü $C_{30}H_{31}N_6Cl$; dietilsafraninazodimetilanilin kloriddir. Janus yeşili kontrastlı noktacıklar veya çubukçuklar halinde her hücredeki sadece mitokondrileri boyar(50). Oksijen varlığının yeterince olduğu durumlarda Janus green B ile renk değişimi olur. Oksijen varlığında mavi renge okside olurken oksijen yokluğunda pembe renge indirgenir(62). Yani preparat ilerleyen dakikalarda oksijenize olarak janus greenle boyanan yerler soluklaşır ve görünmez hale gelir(54). Boyama yapıldığında diğer organeller bu boyaya spesifik değildir, bu boyası ile gösterilemez(49,54).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne Nisan 2007-Temmuz 2007 tarihleri arasında başvuran hastalardan rastgele (randomize) yöntemle 25 teratozoospermili, 20 oligozoospermili ve 22 normozoospermili olmak üzere toplam 67 hasta seçildi.

Bu hastaların 3 günlük cinsel perhiz sonrası steril bir kaba alınan semenleri ortalama 20 dakikalık likefaksiyon süresini takiben semen analizi (spermiyogram) için değerlendirmeye alındı. Bu değerlendirme WHO kriterleri esas alınarak yapıldı. Volüm, renk, vizkosite değerlendirmesi yapıldıktan sonra semenden alınan bir damla örnek Makler kamerasına damlatılarak üzeri grid camı ile kapatıldı. Işık Mikroskobunda 20'lik objektif büyütmede spermatozoa sayısı ve morfolojisi için değerlendirme yapıldı. Mililitredeki spermatozoa sayısı için 2 satır 1 sütun veya 2 sütun 1 satır sayılıp ortalamasını bulmak için üçe bölündü. Toplam volumdeki spermatozoa sayısı için bulunan değer toplam volum ile çarpıldı.

Daha sonra motilite değerlendirmesi için 100 hücre sayıldı.4 karede lineer tarzda hareket gösteren spermatozoalar +4, 1 kare dışına çıkan ancak 1-2 karede hareketli olan spermatozoalar +3, sadece 1 kare içinde hareket eden kuyruk sallayan spermatozoalar +2 ve hiç hareket etmeyen yerinde sabit olan spermatozoalar +1 olarak kabul edildi.

Viabilite değerlendirmesi için lam üzerine 1 damla semen 1 damla tripan mavisi damlatılıp lamel ile kapatıldı 1-2 dakika sonra 40'lık büyütmede boyayı alan spermatozoalar nonviabil, boyayı almayan spermatozoalar viabil olmak üzere 100 tane hücre değerlendirildi ve yüzdeleri alındı.

Son olarak morfoloji değerlendirmesi için 100 adet spermatozoanın morfolojisi sağlam ve bozuk olanları belirlenip yüzdesi alındı. Spermiyogram sonucu tablo 4'te görüldüğü gibi WHO kriterlerine göre sınıflandırıldı.

Spermiyogram yapıldıktan sonra hastanın semen numunesinden 1-1.5 cc alınıp tüp içinde 1:1 volum oranında HTF bazlı spermatozoa yıkama medyumumu ile dilüe edildi ve vorteksle karıştırıldı. Önce 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üstteki süpernatant kısmı alınıp atıldı. Dipte kalan pelet kısmı 0.5 ml medyumla karıştırıldı ve sonra 1000 rpm'de on dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Pellet 0.2 ml medyumla karıştırıp lam üzerinde yaymaları yapıldı. Oda sıcaklığında kurutulup metil alkolde 2 saat tespit edildi.

Çalışmamızın birinci bölümünde her bir hasta için ayrı ayrı olmak üzere; Hematoksilen-Eozin (48,52), Toluidin Blue (50), Giemsa (50), Wright (50, 42, 48) Weigert'in Demirli Hematoksilen boyası (48,50), Orange G Boyası(50), Eozin-Anilin blue boyası (50), Shorr metodu (52), Papanicolau boyası (48, 63), Berg Metodu (49), Light Green boyası (64), Akridine Orange boyası (65) ve Janus Green boyası (50) yapıldı.

Tablo 4:WHO Spermatozoa Parametreleri (63)

<i>Spermatozoaların sayısı/ vitalitesi/ morfolojilerindeki değişiklikler</i>			
	Sayı (milyon/ml)	Morfoloji Normal%si	Motilite Normal%si
Normozoospermi	>20	>30	>50
Astenozoospermi	>20	>30	<50
Oligozoospermi	<20	<30	<50
Teratozoospermi	>20	<30	<50
Nekrozoospermi	<i>Ölü spermatozoalar</i>		
Azospermi	<i>Spermatozoa görülmez</i>		
Aspermi	<i>Ejekülat yoktur.</i>		

Boyanmış preperatlar Olympus-CH Işık Mikroskopunda 100'lük objektif büyütmesinde immersiyon yağı kullanılarak incelenip boyaların spermatozoanın baş, orta parça ve kuyruk kısmının boyanma özellikleri değerlendirildi. Bulguların Olympus B-H2 foto ataşmanlı mikroskop yardımıyla mikrofotografı alındı.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, normozoospermili 10 hastanın Hematoksilen-Eozin, Toluidin Blue, Shorr ve Papanicolau ile boyanmış preperatları değerlendirildi. Her bir preperatta Kruger strick kriterleri esas alındı. Buna göre; Baş uzunluk; 4-6 µm, baş genişlik; 2,5-3,5 µm, orta parça; baş uzunluğunun 1,5 katı ve kuyruk; 40-55 µm ölçülerine uyan spermatozoalar normal morfolojili kabul edildi. 200 adet normal morfolojili spermatozoa hücresinde; baş uzunluğu, baş genişliği, orta parça uzunluğu ve kuyruk uzunluğu olmak üzere 4 parametrede ölçüm yapıldı. Ölçümler Nikon SE ışık mikroskopunda Olympus Eyepiece mikrometre yardımıyla mikron düzeyinde yapıldı. Bu ölçümler sonrası istatistiksel analiz yapılarak hangi boyanın spermatozoa morfolojisini daha iyi gösterdiği ve hangi boyanın Kruger strick kriterlerine daha uygun olduğu belirlenmeye çalışıldı.

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS for Windows 16.0 programında yapıldı. Bilgisayar ortamına aktarılan veriler ortalama±standart sapma şeklinde özetlendi. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Anlamlı çıkan parametreler Post Hoc Tukey HSD ile değerlendirildi. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Bu çalışmamızda hastaların semen numuneleri iki kez yıkanarak arka plan görüntüsünün daha temiz görülmesi sağlandı ve bu numunelerden hazırladığımız yaymalara şu histolojik boyalar yapıldı:

Hematoksilen-Eozin, Toluidin Blue, Giemsa, Wright, Weigert'in Demirli Hematoksilen boyası, Orange G Boyası, Eozin-Anilin Blue boyası, Shorr metodu, Papanicolau boyası, Berg Metodu, Light Green boyası, Akridine Orange boyası ve Janus Green boyası.

Öncelikle bu boyalarla Işık Mikroskobunda 100'lük objektif büyütmesinde immersiyon yağı kullanarak spermatozoa morfolojisini nasıl değerlendirdiğimize, yani boyaların spermatozoanın baş, orta parça ve kuyruk kısmını nasıl boyadığı değerlendirildi.

4.1. Hematoksilen-Eozin

Hematoksilende 1,5 dakika, Eozinde 3,5 dakika boyayarak ideal görüntüyü sağlamaya çalıştık. Spermatozoa morfolojisi özellikle spermatozoa baş orta parça ve kuyruk kısmı net ve temiz olarak görüldü. Spermatozoa başını morumsu renge boyadı. Başta çekirdek içi detaylar iyi seçildi. Baştaki akrozom çekirdek oranı açık ve koyu mor şeklinde son derece iyi görülüyordu. Yani kondansasyon oldukça iyi görüldü. Kondansasyon olmayanlarda ise baş boyayı tamamen alarak koyu mor renginde görülüyordu. Spermatozoa orta parçası ve kuyruk net belirgin bir şekilde pembe-kırmızımsı görülüyordu. Orta parça ve kuyruk anomalileri çok iyi değerlendirilebiliyordu. H-E boyasının spermatozoa genel morfolojik değerlendirmesi için ideal bir boya olduğu gözlemlendi (Şekil 11).

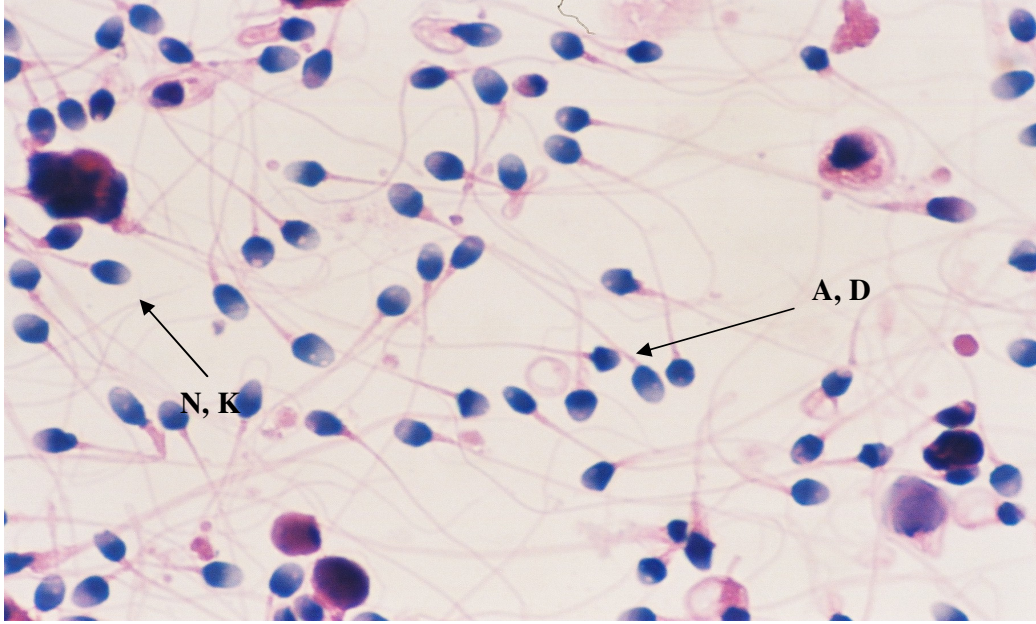
4.2. Toluidin Blue

Spermatozoalar %0,1'lik Toluidin blue ile 1,5 dakika boyanarak ideal görüntü sağlandı. Baştaki kondansasyon beyazımsı ve mavi renginde iyi seçiliyordu. Spermatozoa orta parçası ve kuyruğu mavi boyandı. Orta parça çok iyi seçilemiyordu. Boyama süresini arttırınca baştaki kondansasyonun değerlendirilemediği ve kuyrukların hiç seçilemediği görüldü. Spermatozoa morfolojisi değerlendirilebiliyordu (Şekil 12).

4.3. Giemsa

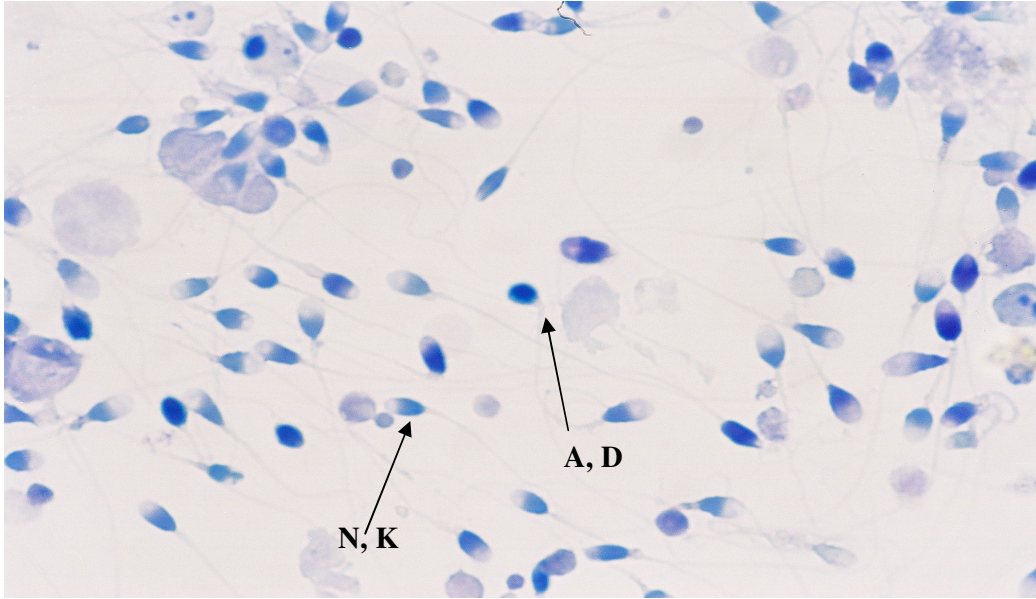
Spermatozoalar Giemsa boyasında 18 dakika boyandıktan sonra iyi görülebildi. Spermatozoa baş morfolojisi iyi, kondansasyon görüntüsü iyi görülüyordu. Spermatozoa lacivert morumsu renge boyanmış idi. Fakat orta parça ve kuyruk boyayı iyi almamış, net seçilemiyordu (Şekil 13).

Şekil 11: H-E boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



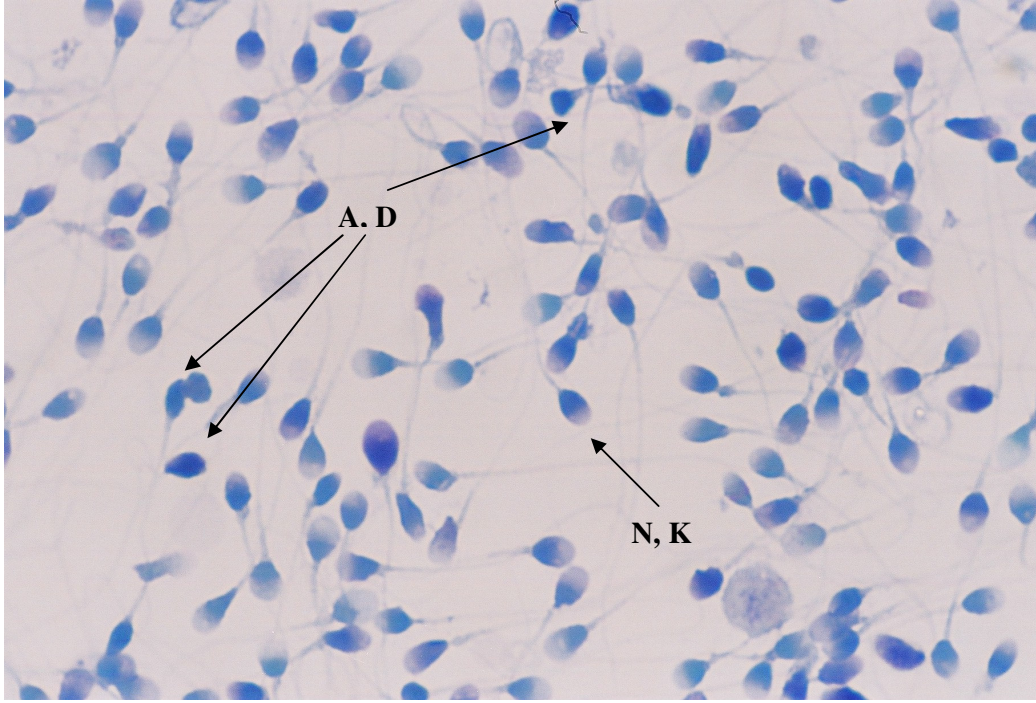
N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa K: Kondanse D: Dekondanse

Şekil 12:T. Blue boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



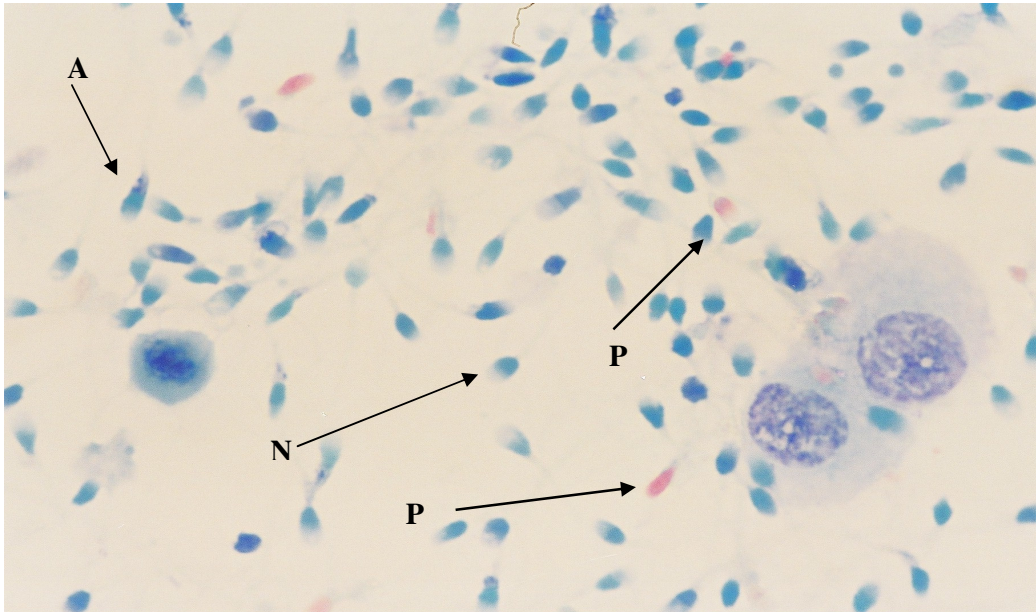
N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa K: Kondanse D: Dekondanse

Şekil 13: Giemsa boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa K: Kondanse D: Dekondanse

Şekil 14: Wright boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa P: Başları pembe boyanmış spermatozoalar

4.4. Wright Boyası

Lilly'nin Wright boyası ile spermatozoalar 5 dakika boyandıktan sonra değerlendirildi. Spermatozoalar mavi tonlarında boyandı. Spermatozoa baş morfolojisi ve kondansasyonu iyi seçilebiliyordu. Orta parça ve kuyruk soluk görülüyordu. Beklemediğimiz bir bulgu olarak morfolojisi bozuk başa sahip spermatozoalardan bazılarının başları pembe boyanmış idi(Şekil 14).

4.5. Weigert'in Demirli Hematoksilen boyası

Spermatozoa başları siyah-lacivert boyanmış idi ve morfolojisi düzgün güzel seçilebiliyordu. Başta kondansasyon değerlendirilemedi. Orta parça ve kuyruklar zor seçiliyordu. Bunun üzerine Weigert'in Demirli Hematoksilen boyasına eozin ilavesi yaptık. Üçbuçuk dakika eozinde tuttuk. Spermatozoa başında kondansasyon iyi görülebiliyordu ve baş açık koyu mor renge boyanmıştı. Orta parça ve kuyruklar pembe boyanmıştı. Orta parça diğer boyalara göre daha fazla boya almıştı ve kuyruklar rahatlıkla değerlendirildi (Şekil 15, Şekil 16).

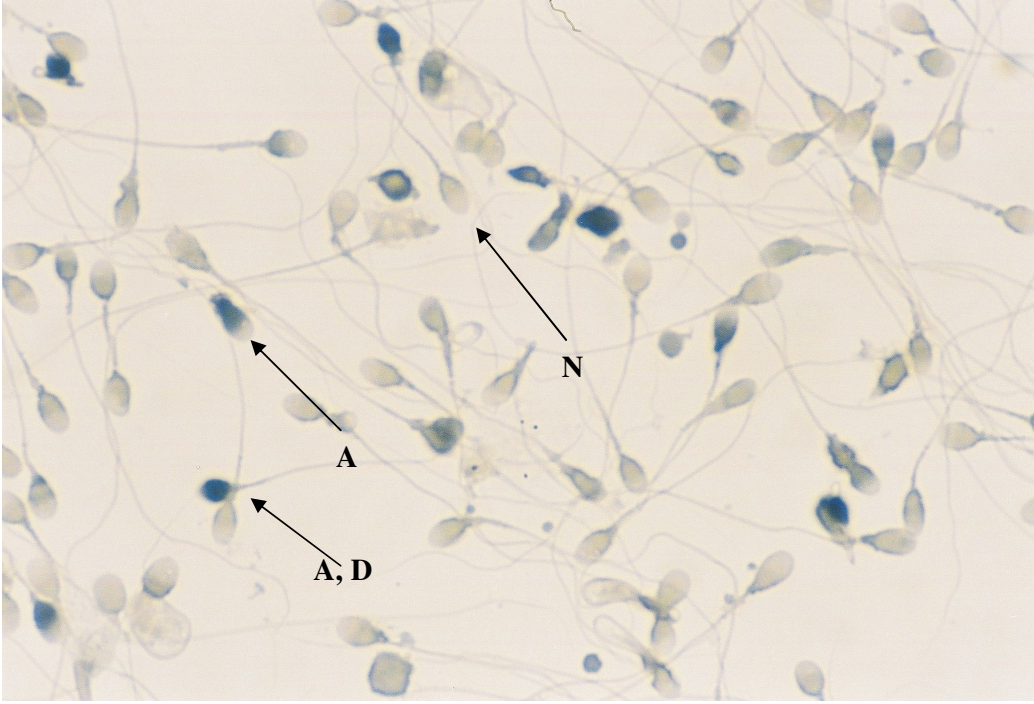
4.6. Orange G Boyası

Spermatozoalar bu boya ile 40 dakika boyanarak ideal görüntü sağlanmaya çalışıldı. Spermatozoa morfolojisi net ve düzgün değerlendirildi. Tamamen turuncuya boyanan spermatozoade başta kondansasyon görülebiliyordu. Orta parça belirgin boyandı. Kuyruklar net seçilebiliyordu(Şekil 17).

4.7. Eozin-Anilin blue boyası

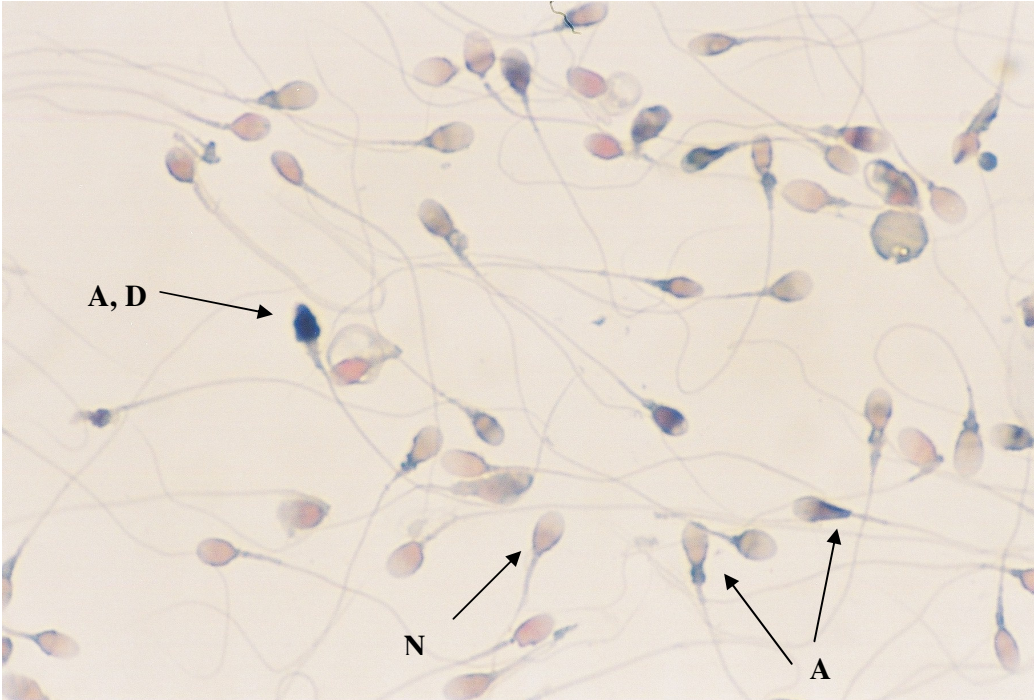
Eozinde 3,5 dakika Anilin Blue'da 35 dakika boyandı. Spermatozoa başı açık- koyu mavi boyandı. Baş morfolojisi ve başta kondansasyon son derece iyi görülüyordu. Akrozom baş ölçümleri için görüntü son derece güzeldi. Orta parça ve kuyruklar iyi görülüyor, fakat soluk mavi gözlendi(Şekil 18).

Şekil 15: Weigert'in Demirli Hematoksilen boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



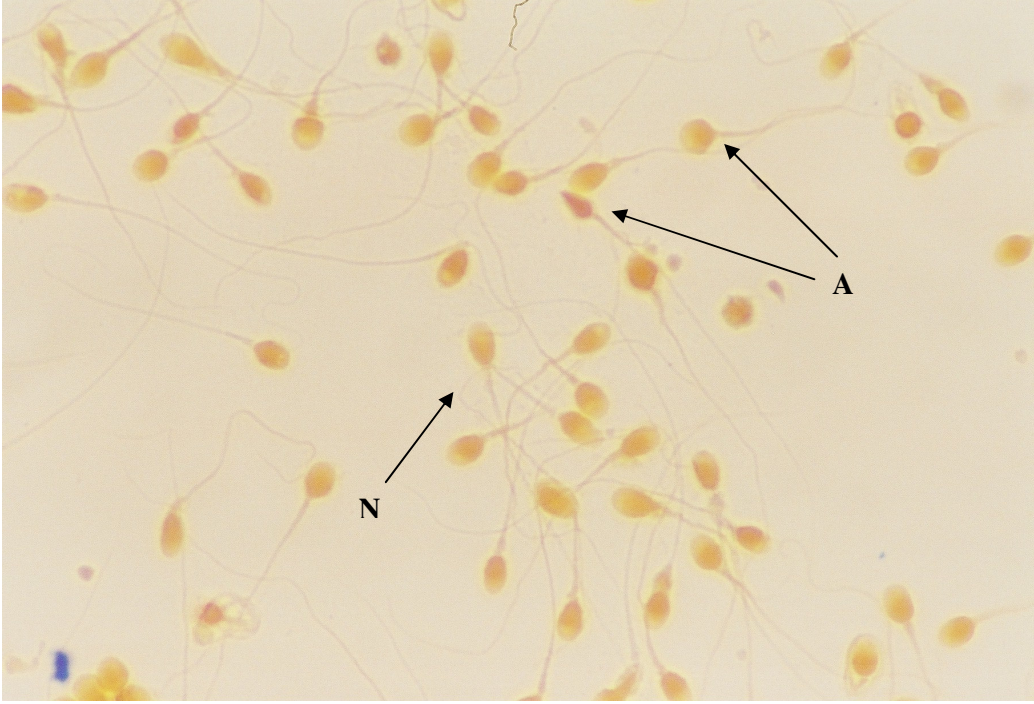
N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa D: Dekondanse spermatozoa

Şekil 16: Weigert'in Demirli H- E boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



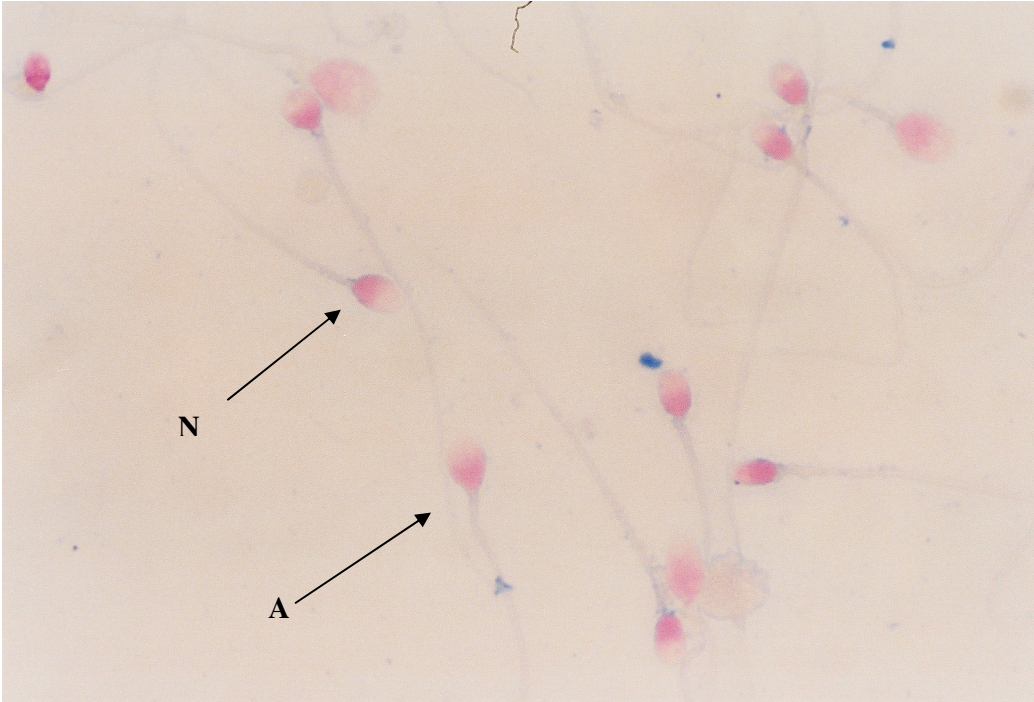
N: Normal Spermatozoa A: Anormal spermatozoa D: Dekondanse

Şekil 17: Orange G boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa

Şekil 18: Eozin-Anilin Blue boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa

4.8. Shorr metodu

Bu metod ile 5 dakika spermatozoaları boyayınca ideal görüntüye ulaştık. Hücre zarı boyandığı için spermatozoa morfolojisi, hücre sınırları son derece belirgin görülebiliyordu. Hücre zarı çekirdek ve sitoplazmaya göre çok daha koyu renge boyanmış idi. Başlar tamamen homojen olarak koyu sarı rengine boyanmıştı. Fakat kondansasyon değerlendirmesi yapılamıyordu. Spermatozoa orta parçası ve kuyruklar çok güzel ve net olarak değerlendirilebiliyordu. Dolayısı ile spermatozoadaki bütün morfolojik bozukluklar rahatça değerlendirildi. Hazırlanan taze boya ile bir hafta sonra boyama yapıldığında spermatozoa orta parça ve kuyruğu yeşil rengine, spermatozoa başları ise grimsi renge boyandığı görüldü (Şekil 19, 20).

4.9. Papanicalou boyası

Bu metod ile Hematoksilen’de 1,5 dakika, Orange G’de 2 dakika, EA 50 solusyonunda 2,5 dakika tuturak incelediğimiz spermatozoalarda morfoloji güzel değerlendirilebiliyordu. Spermatozoa başları kahverengi sarımsı renge boyanmış kondansasyon görülebiliyordu. Orta parça ve kuyruklar koyu kahverengine boyanmış net değerlendirildi(Şekil 21).

4. 10. Berg Metodu

Spermatozoa başları soluk pembe-lila rengine boyandı. Morfoloji iyi fakat kondansasyon değerlendirilemiyor. Orta parça belirgin anomaliler rahatça seçilebiliyor. Kuyruklar açık pembe boyanmış soluk görülüyor ve net değerlendirilemiyordu(Şekil 22).

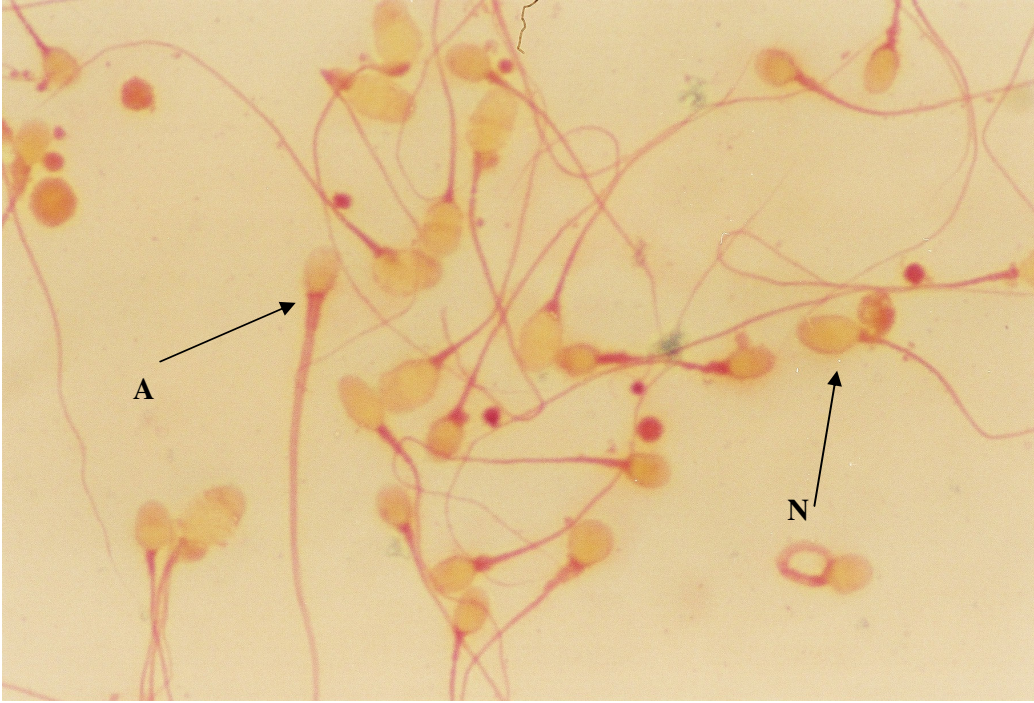
4.11. Light Green boyası

Spermatozoalar 2 dakika Light Green boyası ile boyandıktan sonra spermatozoa morfolojileri iyi değerlendirildi. Başlar yeşil- mavimsi boyandı ve kondansasyon iyi görülebildi. Spermatozoa orta parçası ve kuyruklar yeşile boyandı. Orta parça belirgindi. Kuyruklar soluk boyanmış fakat seçilebiliyordu(Şekil 23).

4.12. Akridine Orange boyası

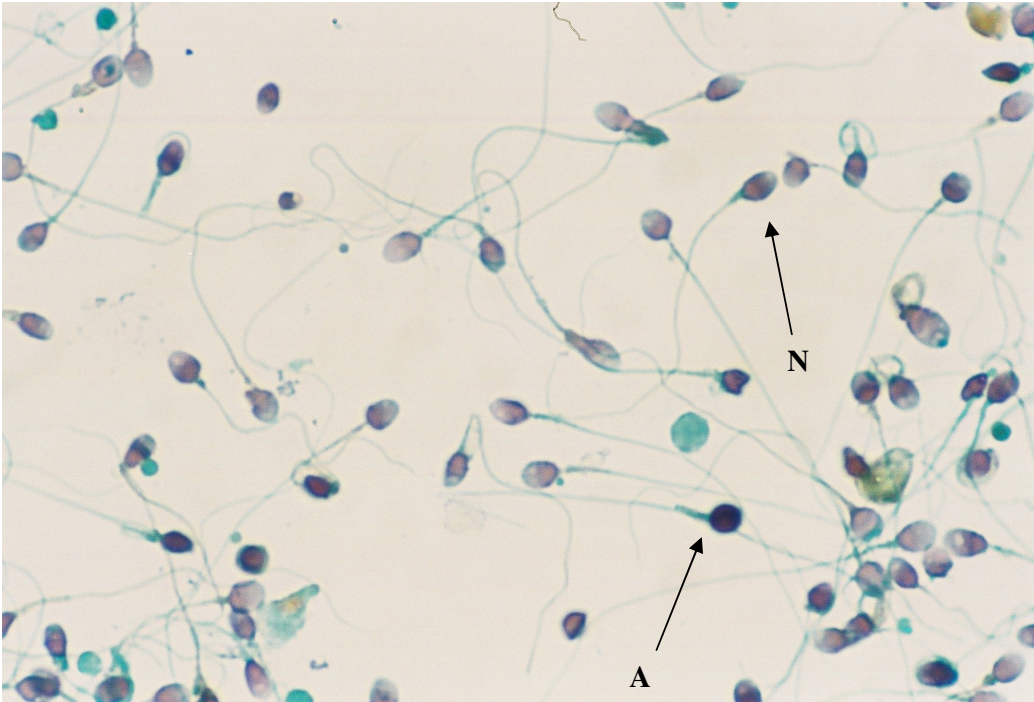
Floresan boyası olan Akridine Orange boyası ile preperatlar 1,5 dakika boyandı. Spermatozoalar çok soluk turuncu boyandı. Başta spermatozoa morfolojisi iyi görülebildi. Fakat başta kondansasyon değerlendirilemedi. Orta parça ve kuyruklar soluk, net seçilemiyordu. Spermatozoalar gölge görünümünde idi. Bunun üzerine AO ile boyama sonrası 3,5 dakika Hematoksilen ile boyandı. Hematoksilenin sadece nükleus etrafındaki membran sahayı boyadığı ve spermatozoaya Y harfi görüntüsü verdiği gözlemlendi. (Şekil 24, 25).

Şekil 19: Shorr boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



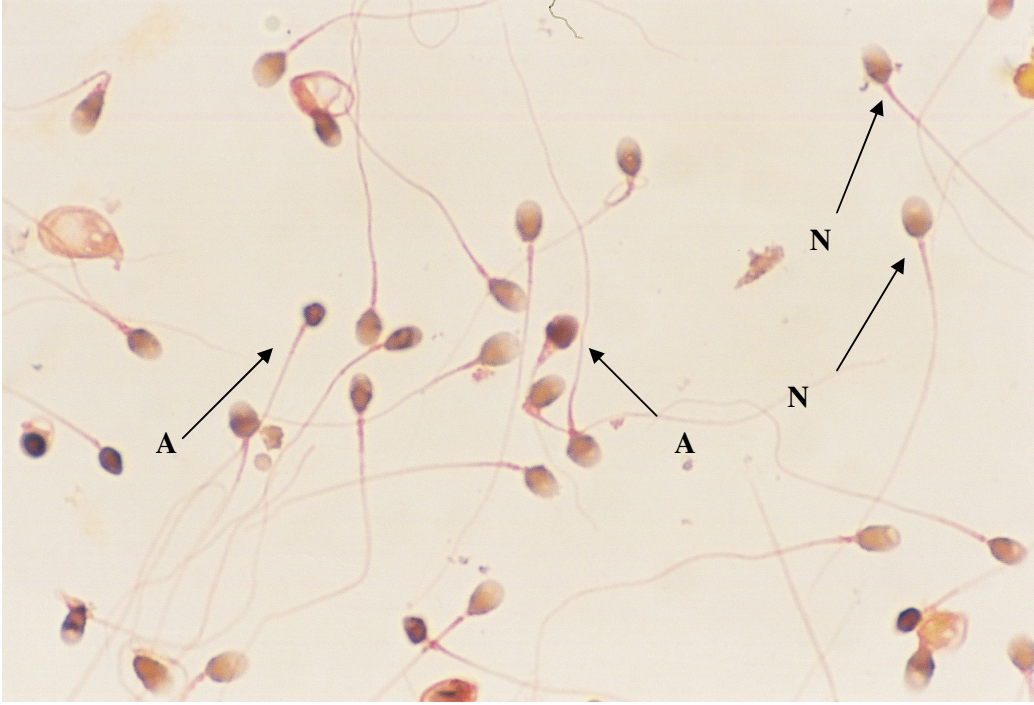
N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa

Şekil 20: 1 Haftalık Shorr boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



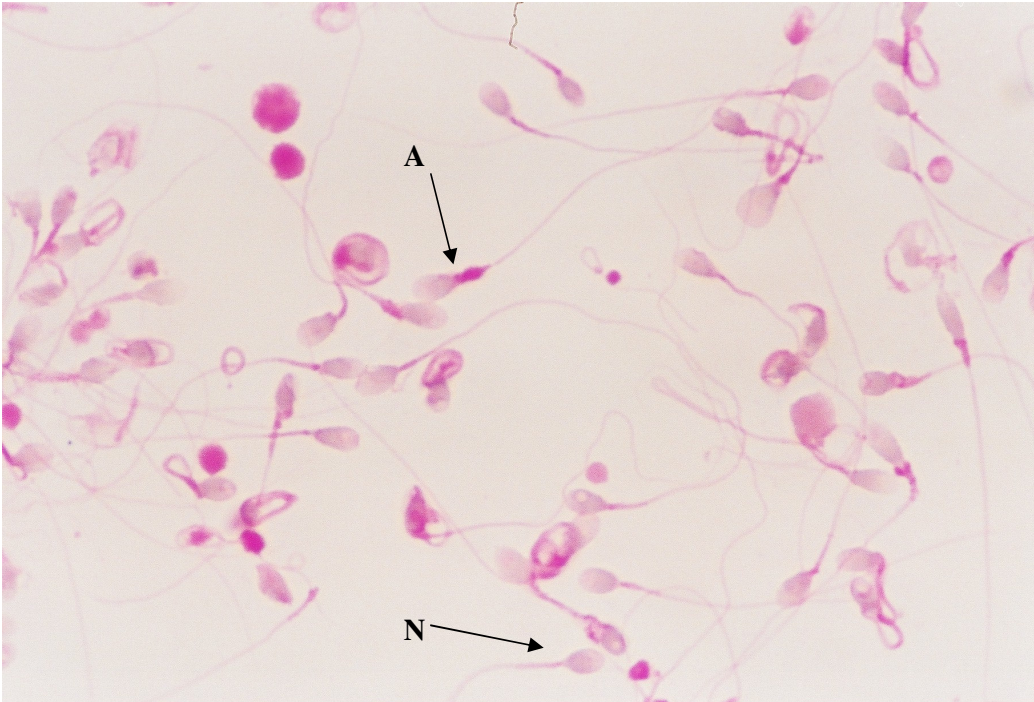
N: Normal Spermatozoa A: Anormal spermatozoa

Şekil 21: Papanicolau boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



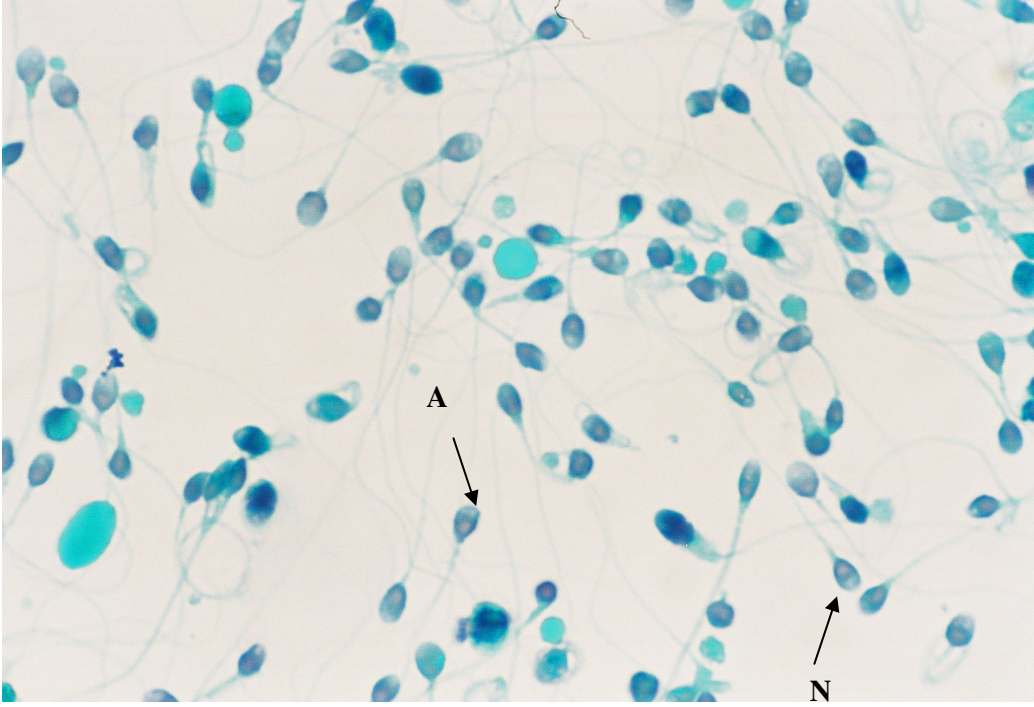
N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa

Şekil 22: Berk boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



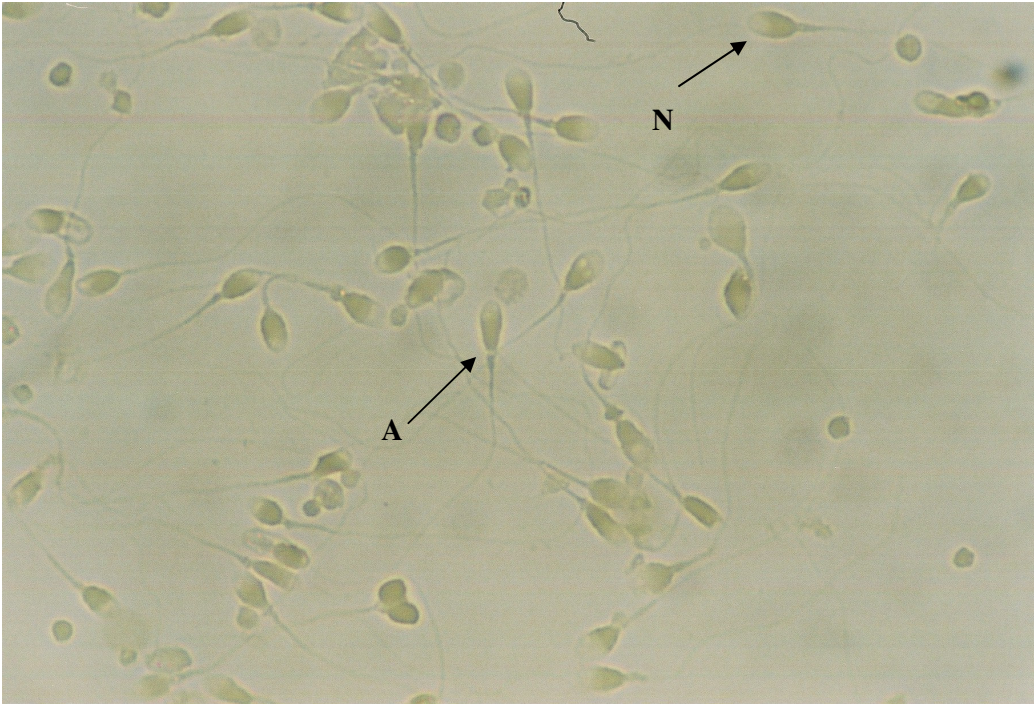
N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa

Şekil 23: Light Green boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



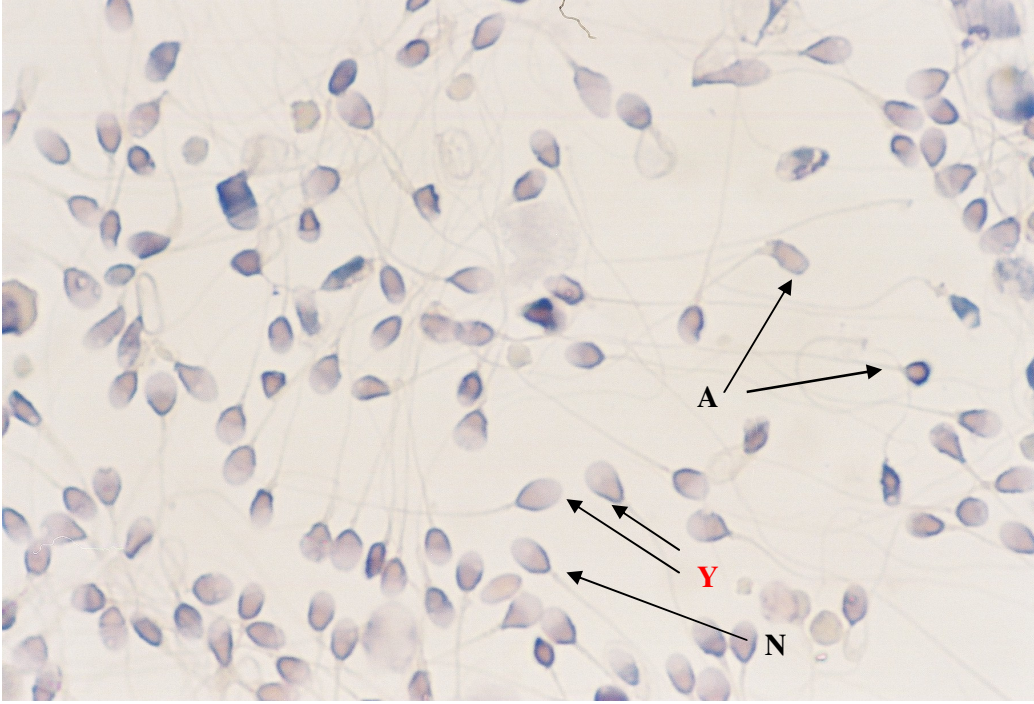
N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa

Şekil 24: Akridine Orange boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



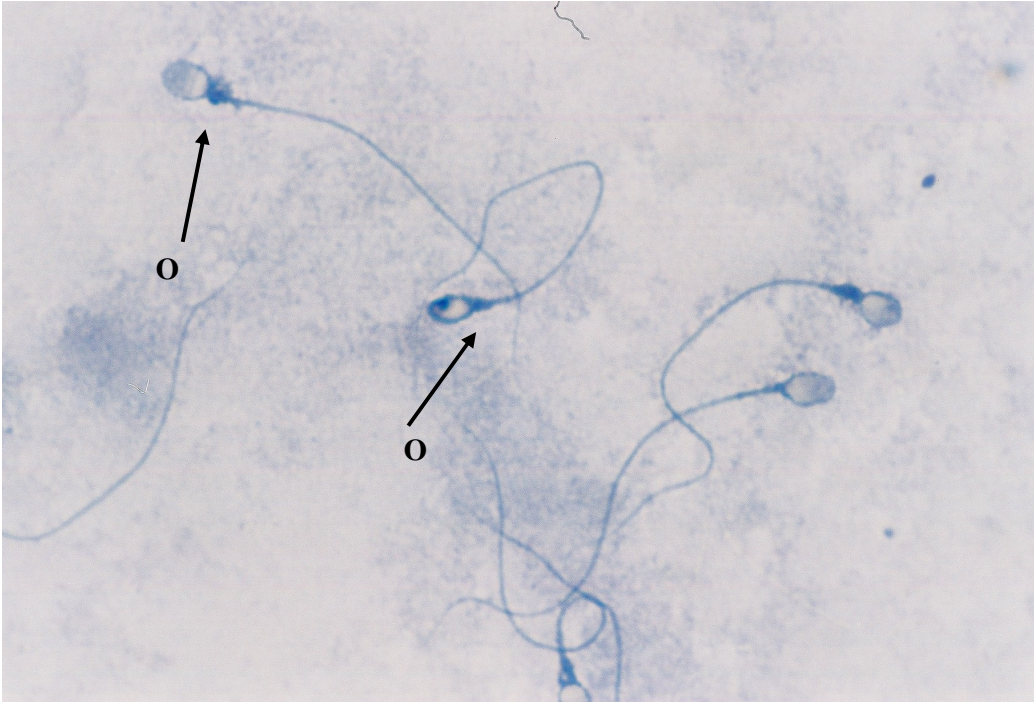
N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa

Şekil 25: Akridine Orange-Hematoksilen boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



N: Normal spermatozoa A: Anormal spermatozoa Y: Y şeklindeki görüntü

Şekil 26: Janus Green boyası ile boyanmış spermatozoalar (FBM x 330)



O: Spermatozoa orta parçası

4.13. Janus Green boyası

Supravital boya olan Janus Green boyası ile semenin raw haline boyama yapıldığında arka plan kirli görünümde spermatozoa başı beyazımsı-mavimsi açık soluk renkte idi. Orta parça belirgin koyu mavi renkte boyandı ve kuyruklar koyu mavi renge boyandı(Şekil 26)

Ayrıca normozoospermili 10 hastanın Hematoksilen–Eozin, Toluidin Blue, Shorr ve Papanicolau ile boyanmış preperatları Kruger strick kriterleri esas alınarak değerlendirildi. Her bir preperatta 200 adet normal morfolojili spermatozoa hücresinde; baş uzunluğu, baş genişliği, orta parça uzunluğu ve kuyruk uzunluğu olmak üzere 4 parametrede ölçüm yapıldı. Bu ölçümler sonrası SPSS for Windows 16.0 programında yapılan istatistiksel analizde gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Anlamlılık seviyesi $P < 0,05$ olarak belirlendi. Buna göre bütün hastalar ($n = 10$) içinde yapılan 4 histolojik boya arasında Shorr boyası ve Papanicolau boyası ölçümleri birbirine benzer çıkarken spermatozoa başındaki ölçümlerde en küçük değerler T. Blue boyası ile boyanmış preperatlarda görüldü(Tablo 5). T. Blue ile boyanmış spermatozoalarda özellikle baş uzunluğunda anlamlı farklılık görüldü(Tablo 6).($P < 0,028$) Daha sonra anlamlı çıkan bu parametre Post Hoc Tukey HSD ile değerlendirildi.

Tablo 5: Spermatozoa Baş Uzunluğu ve Genişliğinin H-E, T. Blue, Shorr ve Papanicolau ile boyanmış yaymalarda ölçüm değerleri

Grup	Uzunluk	Genişlik
	Standart±SS	Standart±SS
H-E	4.75±0.15	2.6±0.16
T. Blue	4.59±0.25	2.56±0.04
Shorr	4.86±0.15	2.6 3±0.08
Paponicolau	4.89±0.31	2.69±0.25
P	0.028*	0.314

Tablo 6:Spermatozoa baş uzunluğu ve genişliğinin gruplar arasında, gruplar içinde ve tamamındaki ölçüm ortalamaları

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Uzunluk	Between Groups	.544	3	.181	3.390	.028
	Within Groups	1.926	36	.053		
	Total	2.470	39			
Genişlik	Between Groups	.095	3	.032	1.228	.314
	Within Groups	.933	36	.026		
	Total	1.029	39			

Son olarak bütün preperatlardaki ölçümü yapılan spermatozoalar bu dört boya grubuna göre yine tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile ayrı ayrı değerlendirildi (n= 2000). Buna göre boyalar arasında baş uzunluk, baş genişlik, orta parça ve kuyruk olmak üzere bütün ölçümlerde anlamlı farklılıklar çıktı. Ölçümlerde en küçük değerler T. Blue boyasına ait idi. Shorr boyası ile Papanicolau boyası ölçümleri birbirine yakın olmakla birlikte en büyük değerler Papanicolau boyasına ait idi (Tablo 7).

Tablo 7: Ölçüm yapılan spermatozoların dört boya grubuna göre değerlendirilmesi(n= 2000)

Grup	Baş uzunluk	Baş genişlik	orta parça	Kuyruk
1.0	4.75±0.40	2.67±1.42	7.12±0.55	43.31±2.13
2.0	4.59±0.44	2.56±0.14	6.82±0.58	42.68±2.45
3.0	4.86±0.39	2.63±0.72	7.22±0.55	43.54±2.21
4.0	4.89±0.43	2.68±1.98	7.30±0.54	43.40±2.09
Total	4.77±0.43	2.64±1.27	7.12±0.58	43.23±2.25

Grup 1:H-E, Grup 2: T.Blue, Grup 3:Shorr, Grup 4: Papanicolau

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfertil erkeklerin tanısında spermatozoa morfoloji değerlendirmesi hala önemini koruyan bir parametredir. IVF tekniklerinin bütün dünyada artan oranlarda kullanılması nedeniyle spermatozoa morfolojisinin fertilizasyondaki rolü üzerindeki çalışmalar da yoğunlaşmıştır. Zaman içinde, klasik IVF uygulamalarında spermatozoa morfolojisinin fertilizasyon oranını önceden belirlemede kullanılabilecek en önemli kriter olduğu belirtilerek, spermatozoa morfolojisinin gerçekleşmesini sağlayabilecek alt eşik değeri bile saptanmıştır.

Spermatozoa morfolojisinin infertilitede bu denli önem taşıması spermatozoa morfoloji değerlendirmesini de doğru bir şekilde yapma gereğini doğurmaktadır(44). Morfoloji değerlendirmesinde bir çok kriter kullanılmasına rağmen en fazla kullanılanlar: "World Health Organization"(WHO) kriterleri ve Kruger'in kesin kriterleridir. Son yıllarda Kruger kriterlerinin infertil hastanın tanı ve tedavisini değerlendirirken daha anlamlı bilgiler verdiği kabul edilmektedir (3, 5, 44, 66, 67)

Spermatozoalar baş, orta parça ve kuyruktan meydana gelmiş hareketli hücrelerdir. Bu farklı anatomik bölgelerin sahip olması gereken özellikler belirlenerek morfoloji değerlendirmesinin bu kritere göre yapılması gerekir. Bir spermatozoanın normal kabul edilebilmesi için baş boyun orta parça ve kuyruğunun normal olması gerekir. Spermatozoa başı sınırları düzgün, oval bir yapıda olmalı ve baş, çekirdek ile akrozomal kepten meydana gelmelidir. Akrozomal kep baş hacminin % 40–70'ini oluşturarak sınırları belirgin olmalıdır. Orta parça silindirik biçimli ve spermatozoa başına tam ortadan bağlanmış olmalıdır. Orta parçada sitoplazmik droplet bulunabilir ve bu spermatozoanın olgunlaşmamış olduğunu (immatür) belirlemekle birlikte spermatozoa başının yarısı kadar büyüklükteki bir sitoplazmik droplet bulunması halinde spermatozoa "anormal" olarak değerlendirilmelidir. Spermatozoa kuyruğu uniform ve giderek incelen bir yapı göstermeli ve orta parçadan daha ince olmalıdır. Kuyrukta kıvrım veya sitoplazmik droplet bulunmamalıdır(44, 66, 67).

Spermatozoa morfoloji değerlendirmesi taze semende Elektron mikroskop ile, taze semende fast kontrast mikroskop ile ve spermatozoaları çeşitli yöntemlerle boyayarak ışık mikroskopunda yapılabilir. Ombelet ve arkadaşlarının 1997'de spermatozoa morfoloji değerlendirmesi için dünyanın çeşitli yerlerinden 170 fertilite merkezinde yaptıkları bir çalışmada spermatozoa hazırlama, boya prosedürleri ve klasifikasyon sistemlerini araştırmışlar(Tablo 8).

Tablo 8: Spermatozoa hazırlama yöntemleri kullanım oranları(66).

Taze semen % 21,2
Kurutulmuş preperat %17,6
Fiske edilmiş preperat % 52,9
Her ikisi % 2,4
İşlem yapılmayan % 5,9

Doğru bir morfolojik değerlendirme için spermatozoain boyanması gereklidir. Spermatozoa morfolojisi için kullanılan birçok boyama yöntemi vardır. Bunlar arasında Papanicolaou, Giemsa, Shorr ve modifiye Brayn-Leishman sayılabilir. Bunun için en fazla kullanılan boyama yöntemleri ‘Papanicolaou’ yöntemi ve ‘Diff-quick’ yöntemidir (Tablo 9).

Tablo 9: Spermatozoa boyama yöntemleri kullanım sıklığı(66).

Papanicolau	% 33,5
Diff-quick	% 22,9
SpermMac	% 7,6
Test Simplets	% 6,5
Shorr	% 4,7
Diğer	% 17
Boyama yapılmamış	% 7,62

Giemsa, Papanicolaou yöntemine göre daha kolaydır ve Bryan-Leishman da semende bulunan diğer hücrelerin ayırımını daha iyi yapmak birlikte bunlar arasında en çok kullanılanları SpermMac (Modified PAP Stain, Stain Enterprises, So. Africa) ve Diff-Quik’tir (Dade Diagnostics, Miami FL, USA). Bunların da dışında morfoloji değerlendirmesi için yol gösterici olması nedeniyle boyanmış preperat içeren setler de vardır.

Brayn Leishman çoğunlukla hematolojide kullanılan bir boyama yöntemi olup beyaz kan hücrelerinin ayırımında tercih edilir. İnsan spermatozoalarının morfolojik değerlendirmesinin yanında semendeki diğer hücrelerin de ayırımına yardımcı olur.

Garcia ve arkadaşları 2006'da yaptıkları bir çalışmada Hemaklor, Harris Hematoksileni ve hızlı panoptik boyama tekniklerini kullanarak bilgisayar yardımlı spermatozoa morфометrik analizi(CASMA) ile spermatozoa baş morfolojisi için örnekleme metodları, boyama ve numune hazırlamanın standartizasyonunu yapmayı amaçlamışlar. Hematoksilen ve Hemaklorun spermatozoa baş değerlendirmesinde en iyi olduğu sonucuna varmışlardır(68).

Soler ve arkadaşları 2005'te yaptıkları bir çalışmada kompüterize ISAS (Integrated Semen Analysis System) analiz sistemiyle epididimal spermatozoa morфометrisinin değerlendirmesi için 3 farklı boya metodunu karşılaştırmışlar. Hemacolor, Diff-Quik ve Harris Hematoksileni ile boyanmış preperatlarda 200 spermatozoa hücresi değerlendirildi. Boyanmış spermatozoalar otomatik analiz sistemiyle değerlendirildiğinde Diff-Quik boyası ile en yüksek yüzdede anlamlılık bulunmakla birlikte, kullanılan spermatozoa boyama tekniklerinin hepsinin de faydalı olduğu belirtilmiştir (69).

Allery ve ekibi 2001'de spermatozoain sitolojik tayini için Chrismas Tree, Hematoksilen- Eosin ve Alkalın Fuksin olmak üzere 3 farklı boya metodunu karşılaştırmışlar. Alkolen fuksinin vajinal numunede spermatozoa tayininde efektif olmadığı, Hematoksilenin ve Chrismas Tree'nin morfoloji için iyi bir boya olduğu sonucuna varmışlardır(70).

Bizim çalışmamızda, spermatozoa morfolojisi incelemesinde özellikle spermatozoa baş, orta parça ve kuyruk kısmının çok iyi görülmesi, başta çekirdek içi detayların özellikle kondansasyonun son derece iyi görülmesi; orta parça ve kuyruk anomalilerin iyi değerlendirilebilmesi yukardaki literatür bilgileriyle uyumlu olup H- E boyasının spermatozoanın genel morfolojik değerlendirmesi için ideal bir boya olduğunu göstermektedir. Aynı görüntüleri Weigert'in Demirli H-E boyası için de söyleyebiliriz.

Toluidin Blue boyası disülfid bağlarının yokluğu ya da rüptürünün tesbit edilmesiyle spermatozoa kromatin değerlendirmesinde kullanılan nükleer boyadır.

Sardor ve arkadaşları Haziran 2008'de yaptıkları bir çalışmada T. Blue kullanarak kriyopreservasyon süresince spermatozoa DNA değişimlerini incelemişler. T. Blue, insan spermatozoasında TUNEL ve SCSA ile yüksek korelasyon göstermiştir. Bu çalışma önermiştir ki, kromatin kondansasyonu tesbiti erkek fertilesinin değerlendirmesinde değerli bir parametredir ve klasik semen parametrelerinden tamamen bağımsızdır(71).

Reda ve arkadaşları Ocak 2008'de yaptıkları bir çalışmada insan spermatozoasında spermatozoa kromatin kalitesi ile DNA ve apoptoz arasındaki ilişkiyi incelemişler. Toluidin blue ile boyanmış preperatlarda DNA fragmentasyon indeksi, yüksek DNA

boyanabilirliği, DNA sitometrisi ile, erken ve geç apoptozis değerlendirilmiş. Spermatozoa motilitesi ve ayrıca DNA fragmentasyon indeksi, geç apoptoz ve subhaploid spermatozoalarla ilişkili bulunmuş. Toluidin blue ile boyanmış spermatozoalarla geç apoptotik spermatozoalar arasında önemli korelasyon görüldü. İmmatür fraksiyonlu spermatozoalar koyu boyanırken, matür spermatozoalarda başta DNA akrozom oranı 2/3 oranında gözleniyordu. Nükleer immatürite ve subhaploidin düşük insidansında DNA fragmentasyon yüzdesi de düşük bulundu. Böylece yardımcı üreme prosedürlerinde spermatozoa kromatin durumu ve simültane apoptozis değerlendirmesi spermatozoa süreci için önemlidir, sonucuna varıldı(72).

Beletti ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada spermatozoa morfolojisi ile spermatozoa kromatin kondansasyonu arasındaki ilişkiyi T. Blue ve Feulgen reaksiyonu ile incelemişler. T. blue boyasının spermatozoada kromatin değişimlerini değerlendirmede anlamlı derecede etkili bir boya olduğunu görmüşlerdir(73).

Schütte 1986 yılında yaptığı bir çalışmada Toluidin Blue ile insan spermatozoasını boyamış. Boyama sonrası spermatozoa morfolojisinin oldukça iyi değerlendirilebildiği ve böylece bu boyanın rutinde rahatlıkla kullanılabileceğini rapor etmiştir(74).

Krzanowska ve arkadaşları 1982 yılında Toluidin Blue boyası ile ovumun penetrasyonu ve epididimal maturasyon sırasında spermatozoada kromatin stabilizasyonundaki değişiklikleri göstermek için bir çalışma yapmışlar. Testiküler spermatozoa başları koyu mavi boyanırken daha distale doğru inildikçe başlar azalan derecede boyanmış. Sonuçta Toluidin Blue ile boyanmanın yetersizliğini, disülfid bağları ile stabilize olan spermatozoa karakteristiğine bağlamışlardır(75).

Bizim çalışmamız literatür bilgisiyle uyumlu olup, spermatozoa morfolojisi ve özellikle de baştaki kondansasyon oldukça iyi değerlendirildi. Basit bir boyama yöntemi olup spermatozoa kondansasyonu ile morfolojisinin eş zamanlı değerlendirilmesini sağlayan T. Blue boyası bu alanda rutinde kullanım için en iyi ideal bir testtir, sonucu teyid edildi.

Spermatogenezis sırasında spermatozoa nükleer kondansasyonu oluşurken DNA yapısındaki lizince zengin somatik histonlar yerini arjinince zengin protaminlere bırakır. Özellikle bir boya olan asidik anilin blue boyası spermatozoa DNA'sında lizine bağlanarak immatür spermatozoa nükleusunu maviye boyar. Böylece her bir spermatozoada ayrı ayrı nükleer matürite değerlendirmesi yapılabilir (Hou, chen). Spermatozoa nükleer maturitesindeki değişiklikler spermatozoa kalitesinin indeksi olarak görülebilir. Kromatin kondansasyonundaki bozukluklar Anilin Blue ile boyanmış spermatozoalarda görülebilir.

Böylece bu teknik spermatozoa hazırlama metodları ile elde edilen spermatozoaların kalitesini değerlendirmede kullanılabilir(76).

Avcı 2006'da yaptığı bir çalışmada farklı fiksasyon protokolleri ile Anilin Blue, Akridin Orange ve Chromamycine A3 (CMA 3) boya larını semen numunesine uyguladı. Sonuçta boyanma kalitesi açısından boyalar arasında fark görülmedi(53).

Hammadeh ve arkadaşları 2001'de yaptıkları bir vaka kontrol çalışmasında erkek fertilit e değ erlendirmesinde spermatozoa kromatin kondansasyon değ erlerinin belirlenmesini amaçladılar. Bunun için 90 hastadan ve 75 sağlıklı donörden toplam 165 semen örneğ i olarak anilin blue ile boyayarak kromatin kondansasyonu ile özellikle spermatozoa morfolojisi, spermatozoa sayımı ve progresif motilite gibi klasik semen parametreleri incelediler. Sonuçta spermatozoa kromatin kondansasyonu ile morfoloji, sayı ve motilite arasında korelasyon olmadığını buldular ve yardımcı üremede semenin rutin laboratuvar incelemelerine kromatin kondansasyonunun kuvvetle dahil edilmesini, tavsiye etmişlerdir(77).

Frederic Morel ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada; semen analizi için başvuran hastalardan randomize usül ü seçtikleri 47 hastada insan spermatozoasında sık görülen morfolojik bozuklukların bireyler arası çeşitliliğ ini incelemişler. Onların nükleer matürite ile bağlantısını göstermek amacıyla, semenden hazırlanan preperatları Anilin Blue ile boyamışlar. İnceledikleri preperatlarda bireyler arasında spermatozoa morfoloji bozuklukları farklılığ ı açıkça gözlenmiş ve bunların sıklığ ı ile nükleer matürite derecesi arasında anlamlı ilişki bulmuşlardır(78).

Foote, 1998'de yaptığı bir çalışmada suni inseminasyon merkezinde 200 boğ anın semeninde Eozin-Anilin blue ile boyama yaparak spermatozoa baş larının yüzeyinde kraterlerin sıklığ ını incelemiş. Boyanmamış spermatozoalara göre Eozin- Anilin Blue ile boyanmış spermatozoaların morfolojisinde detayların çok daha iyi değ erlendirildiğ ini bildirilmiştir (79).

Delgado ve arkadaşları 1998 yılında heparin ile destabilize olan spermatozoa membranı ile membran integrity indeksi olan asidik anilin blue boyasının arasındaki korelasyonu incelemişler. Sonuçta spermatozoa membranında heparin etkisiyle oluşan nükleus de kondansasyonu ve spermatozoa membran destabilizasyonun doğrulanması göstermiştir ki, asidik anilin blue boyası membran integrity indeksi olarak kullanılabilir(80).

Borg ve ekibi 1997'de yaptıkları bir çalışmada dondurulmuş çözdürülmüş spermatozoanın morfolojisini, spermatozoa plazma membran bütünlüğ ünü ve çözdürmenin motiliteye etkisini araştırmışlar. 75 °C ve 37 °C çözü nme ısısında spermatozoa kalite,

spermatozoa motilite, spermatozoa viabilite, spermatozoa plazma membran bütünlüğü ve spermatozoa morfolojisini karşılaştırmışlar. Çözünme sonrası Eosin-Anilin Blue ile boyayıp değerlendirmişler. Düşük ısıda çözülmüş spermatozoalarda hasarın daha az olduğunu ve morfolojinin daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir(81).

Hammadah ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada ICSI programında fertilizasyon, yarıklanma ve gebelik oranlarında strick kriterlerine göre insan spermatozoa morfolojisi ve kromatin kondansasyonunun etkisini araştırmışlar. ICSI programına alınan 60 hastanın semen numunelerine kromatin kondansasyonunu değerlendirmek için Anilin Blue boyası yapılmış. 85 hastanın semen numunesine ise, morfoloji değerlendirmesi için Papanicolau boyası yapılmış. Çalışmanın sonucuna göre ne Anilin Blue ile boyanmış preperatlardaki kromatin kondansasyonu ne de Papanicolau boyası ile boyanmış preperatlardaki spermatozoa morfolojisi ICSI programındaki fertilizasyon potansiyelini, yarıklanma ve hamilelik oranlarını değerlendirmektedir(82).

1995 yılında Hou, Chen ve arkadaşları Anilin Blue boyasını kullanarak spinal kord injurili erkeklerde spermatozoa nükleer matüritesini incelemişler. Anilin Blue boyası ile boyanmış preperatları incelediklerinde zayıf semen kalitesinin, spermatozoanın nükleer kalitesindeki yetersizliğe bağlı olduğu sonucuna varmışlardır(83).

Sanchez ve arkadaşları 1994'te sağlıklı donörlerden 14 semen örneğinde yaptıkları çalışmada spermatozoa hazırlama metodları ile elde edilen insan spermatozoalarında nükleer matürite değerlendirmesi için yıkanmış hazırlanmış yaymaları Anilin Blue ile boyamışlar. Çalışmanın sonucunda bu basit boyama tekniğinin pratikliği, yardımcı üremede kullanılabilen spermatozoa hazırlama metodlarına doğru yönelebilmelerinden kaynaklanmaktadır, görüşünü savunmuşlardır(76).

Bizim çalışmamızda baş morfolojisinin ve başta kondansasyonun son derece iyi görülmesi ve orta parçanın, kuyruğun iyi seçilebiliyor olması çalışmamızın, literatür bilgisiyle uyumlu olduğunu göstermiştir. Anilin Blue akrozom baş oranı ölçümleri için ideal görüntü verdiği kanaatindeyiz. Sonuç olarak, Anilin Blue boyası, kondansasyon anomalisi ile birlikte morfolojisini de değerlendirebilen bir boyadır düşüncesindeyiz(53).

Giemsa boyası, spermatozoa akrozomu, baş, kuyruk membran bütünlüğü ve morfolojiyi eş zamanlı değerlendirmede kullanılabilen boyadır(84).

Ok ve arkadaşları 2008'de yaptıkları bir çalışmada astenozoospermi olgularında spermatozoa morfolojisini değerlendirmede Spermac ve Diff-quick boya yöntemlerini karşılaştırmışlar. Her iki boya yönteminin de birbirine üstün olmadığını ve güvenilir

olduğunu görmüşler ve maliyeti düşük olanın seçilmesinin doğru olacağı sonucuna varmışlardır(85).

Kutvölgyi ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada spermatozoada morfolojiyi daha kusursuz ayırt edebilmek için bir metod geliştirerek, Tripian blue-Giemsa boyası ile Chicago Sky Blue 6B (CSB) boyası ile akrozom boyanması ve vitabiliteyi değerlendirmişler. Canlı ya da ölü spermatozoa baş farklılıkları ile kuyruk farklılıklarında benzer görüntüler görmüşler. Yani Tripian blue-Giemsa ile CBS arasında uygunluk olduğunu görmüşlerdir (84).

Karpuz ve arkadaşlarının 2007'de yaptıkları bir çalışmada ICSI tedavi sonuçlarını, spermatozoa morfoloji ve motilite sınıflandırmaları ile karşılaştırılarak değerlendirmişler. Bu çerçevede Kruger kesin kriterlerinin veya motilitenin, bu sonuçları tahminde yardımcı olup olamayacağını araştırmışlar. Kliniğe başvuran infertil çiftlerden, 242'si seçilerek ICSI tedavisi uygulanmış. Spermatozoa motilite ve morfolojisi IVF sonuçlarının değerlendirilmesinde en iyi parametreler olarak kabul edildiği halde bu çalışmada ki bulgular ICSI sonuçlarının IVF için değerli olan bu parametrelerden bağımsız olduğunu göstermiştir(86).

Tartaglione ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada dondurulmuş çözünmüş spermatozoada invitro fertilitenin tahmini olarak spermatolojik prognostik değerleri incelemişler. Normal spermatozoa fonksiyonları için önemli değerler olan spermatozoa plazma membranı ve akrozom bütünlüğünü incelemek için Tripian Blue ve Giemsa boyası ile boyanmış spermatozoa yaymalarını incelediklerinde bu boyaların IVF için kullanılan semen numunesinde, potansiyel fertilitenin prognozu için kullanılabileceği sonucuna varmışlar(87).

Ülgen ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada dondurulmuş-çözündürülmüş spermatozoada morfolojik bozuklukların saptanmasında Eosin- Nigrosin ve Giemsa boyama yöntemini kullanarak bir değerlendirme yapmışlar. Sonuçta boyalar arasında fark olmadığı ve bu boyama yöntemlerinin güvenle kullanılabileceği sonucuna varmışlar(88).

Amer M ve arkadaşları 2001'de Giemsa boyasını kullanarak ejakülatta spermatogenik hücreleri incemişler. TESE negatif olguların %22'sinde, TESE pozitif olguların %83,7'sinde round spermatozoalara rastlamışlar ve Giemsa boyasının düşük maliyet ve güvenilirlikle birlikte iyi bir kullanım olduğunu görmüşlerdir (89).

Trypan Blue- Giemsa ile boyanmış semen smearlerinin rutin değerlendirmesi sırasında spermatozoa hücreleri boyanmış kuyruk ile boyanmamış baş birlikte bulunabilir. Bunlar

immotil ve cansız spermatozoalar olabilir. Muhtemelen izotonik Trypan Blue ile taze hazırlanmış preperatlarda spermatozoa motilitesi izoozmotik ortamda belirlenebilir. Nagy ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada ışık mikroskobu ile spermatozoa kuyruk membran bütünlüğünü değerlendirmişler. Bunun için Trypan Blue ve Giemsa ile boyanmış preperatlarda boyanmış spermatozoa kuyruğunun yüzdesi ile spermatozoa kuyruk kalıntısının yüzdesini karşılaştırmışlar. Çalışmanın sonucu göstermiştir ki Tripan blue ve Giemsa ile boyanmış preperatlarda baştaki bütünlüğü bozulmamış membrana sahip spermatozoa hücreleri boyanır, fakat muhtemelen membran hasarlı kuyruklu hücreler motil değildir. Böylece bu boyanmış hücreler rutinde vital boyalar ile yapılan canlı- ölü çalışmalarından daha fazla ölü kategorileri de içerebilmektedir(90).

Jacob ve arkadaşları 1996'da yaptıkları bir çalışmada IVF siklusunda fertilizasyon oranlarında spermatozoa parametreleri ve kadın yaşının etkisini araştırmak için 106 hastanın spermatozoa morfolojisini Eosin- Nigrosin ve Giemsa boyası ile değerlendirdiler. Buna göre spermatozoa fertilizasyon kapasitesi temel spermatozoa parametreleri kullanımı ile tahmin edilebilir. Ayrıca partnerleri oldukça yaşlı ve düşük fertilizasyon kapasitesini yansıtan suboptimal spermatozoa parametreleri olanlarda mikromanüplasyon prosedürleri faydalı olabilir, sonucuna varmışlardır(92).

Eggert ve arkadaşları 1996'da yaptıkları bir çalışmada in-vivo şartlardaki gebelikte erkek fertilitesi ve strick kriterleri kullanarak spermatozoa morfolojisini Diff-Quick boyası ile değerlendirmişler. Özellikle fertilité ile spermatozoa sayısı, progressif motilite ve standart spermatozoa morfolojisi arasında anlamlı ilişki bulunmuş. Spermatozoa morfolojisi fertilité tayinindeki multipl faktörlerden yalnızca biridir. Sonuçta önerilmiş ki spermatozoa morfoloji değerlendirmesinde kullanılan strick kriterleri, temel infertilité değerlendirmesinde değerli bilgiler sağlar(93).

Madan K ve arkadaşları 1994'de yaptıkları bir çalışmada Nigrosin-Eosin boyası ve Giemsa (NEG) boyasını kullanarak canlı spermatozoalarda akrozomal değişiklikleri ayırt etmeyi amaçlamışlar. Aynı bir gruba floresan viabilite boyası (karboksifloresein diasetat ve propidium iodid) yaparak diferansiyel interferans kontrast mikroskop ile akrozomal değişiklikleri incelemişler. Bu ikisi arasında anlamlı bir fark olmadığını görmüşler. NEG boyasına göre spermatozoaları 4 gruba ayırmışlar: Canlı akrozomu bütün, canlı akrozomu hasarlı, ölü akrozomu bütün ve ölü- akrozomu hasarlı. Bu metodun kolayca yapılabilir olması, yalnızca temel malzemelere ihtiyaç duyulması ve görünümünün son derece güvenilir olmasından dolayı tercih edilebilir sonucuna varmışlardır(94).

Kovacs ve ekibinin 1992'deki bir çalışmasında spermatozoa akrozom boyanması ve canlılığını incelemişler. Tripan blue ve Congo Red boyasına akrozomun daha iyi görüntülenebilmesi için Giemsa boyasını eklemişler. Spermatozoaları 10 sınıfa ayırmışlar: Canlı ve ölü hücrelerde intakt akrozom(mor renkte), akrozom kaybı(koyu lavanta rengi), hasarlı akrozom(açık lavanta), akrozom yokluğu(canlı hücrede beyaz veya açık pembe, ölü hücrede ise beyaz veya açık gri) ve postakrozomal ring(kırmızı). Post akrozomal bölge canlı spermatozoa başında beyaz ya da açık pembe, ölü spermatozoada siyah, koyu violet ya da gri renkte idi. Sonuçta çalışmaya Giemsa boyasının eklenmesiyle değerlendirmenin daha iyi yapılabildiğini görmüşlerdir (95).

Marshburn ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları bir çalışmada; spermatozoalarda çok ince, nadir görülen anormal formlar için Wright- Giemsa boyası ile akrozomal reaksiyonu gösteren spermatozoal testleri kullanarak normal semen karakterli erkeklerde fertilité oranlarını incelemişler. İnseminasyon yapıp gebelikle sonuçlanan grup ile gebelikle sonuçlanmayan grup arasında Wright- Giemsa boyası kullanılarak boyanmış spermatozoalarda çok ince, nadir görülen anormal formlarda anlamlı bir farklılık görmemişlerdir (96).

Didion ve arkadaşları 1989'da yaptıkları bir çalışmada spermatozoada doğru akrozomal reaksiyonu ve viabilitéyi basit çift boyama prosedürüyle Giemsa ve Tripan Blue boyası kullanarak incelemişler. Akrozomun varlığını ya da yokluğunu Giemsa boyasıyla, spermatozoanın canlı ve ölü olanlarını ise vital boya olan tripan blue boyası kullanarak belirlemişler. Canlı spermatozoalar boyanmazken ölü spermatozoalar postakrozomal bölge içinde maviye boyanmış. Akrozomu sağlam spermatozoalar açık mor- koyu pembe boyanırken akrozomu olmayanlar boyanmamıştır. Sonuçta bu çift boyama tekniği klinik çalışmalarda ve fertilizasyonda akrozom durumu ve spermatozoa viabilite değerlendirmesinde faydalı bir teknik değerlendirmesi yapılmıştır (97).

Giemsa ve Wright Boyaları için yaptığımız değerlendirme literatürle uyumlu idi. Spermatozoa baş morfolojisi ve kondansasyonu iyi seçilebiliyordu. Orta parça ve kuyruk görülebiliyor, fakat çok net değerlendirilemiyordu. Ayrıca bütün preperatlarda beklemediğimiz bir bulgu olarak Wright boyasıyla mavi boyanmış spermatozoalar arasında, baş morfolojisi bozuk spermatozoalarda çoğunluğu öncü formlar olmak üzere baş ve kuyruğu tamamen pembe boyanmış bazı spermatozoalar görüldü. Bunun sebebini açıklayacak mekanizma için daha ileri bir çalışma yapılması önerisinde bulunuldu.

Literatür incelemesinde Orange G Boyası ve spermatozoalarla ilgili yayın eksikliğini görünce bu boya yapılmaya karar verildi. Yaptığımız değerlendirme sonucuna göre

spermatozoa morfolojisi net ve düzgün değerlendirildi. Tamamen turuncuya boyanan spermatozoada başta kondansasyon görülebiliyordu. Orta parça belirgin boyandı. Kuyruklar net seçilebiliyordu. Boyama işleminin uzun zaman alması düşünüldüğünde diğer boyalara üstünlüğü olmadığına karar verildi.

Shorr tekniği önceleri Fransa'da kullanım alanı bulmuşken bu gün klâsik IVF'deki sonuçlarla ilişkisinin yeterli olması nedeniyle bir çok laboratuvar da tercih edilir(44).

Henkel ve arkadaşları 2005'te yaptıkları bir çalışmada yaşlı erkekte azalan spermatozoa motilitesini değerlendirirken Shorr boyası ile normal ve anormal boyanmış kuyruğa sahip spermatozoaların yüzdesini değerlendirmişler. Artan yaşla birlikte anormal boyanan kuyruk oranı ile motilite ve spermatozoa hızı arasında negatif korelasyon olduğu sonucuna varmışlardır(98).

Ralf Henkel ve arkadaşları 1999'da yaptıkları bir çalışmada insan spermatozoa kuyruğunun çinko ile ilişkisi ve motiliteyle bağlantısını incelemek için 90 androloji hastasından aldıkları semen numunelerini Shorr boyası ile boyadıktan sonra spermatozoa morfolojisi ölçümünü yapmışlar. Buna ek olarak seminal plazmada çinko konsantrasyonunu, otomatik emilim spektrometresi kullanarak spermatozoa baş ve kuyruğunda belirlemişler. Flagelladaki çinko konsantrasyonu ile spermatozoa motilite ve hızı arasında negatif bir korelasyon görmüşler. Sonuçta bu çalışma; spermatozoa kuyruğundaki dış fibröz kılıfın fonksiyonel yeterliliği için dolayısıyla motilite oluşumu için, epididimal spermatozoa maturasyonu sırasında çinko eliminasyonunun önemini göstermiştir(99).

Spiros Milingos ve arkadaşları 1996'da yaptıkları bir çalışmada intrauterin inseminasyon için seçilmiş çiftlerde spermatozoa fonksiyon testlerini ve semen karakteristik değerlerini incelemek için infertil 89 çiftte hipoozmotik swelling testi, Shorr boyası ve Anilin blue boyasını yapmışlar. Ayrıca seminal plazmada glukozidaz aktivitesini değerlendirmişler. Progresif motiliteli spermatozoa konsantrasyonu ve oranı başarıllı IUI olgularında anlamlı derecede düşük çıkmış. Shorr boyasının sonuçları motiliteyi, morfolojiyi göstermede daha çok anlamlı olduğu bulunmuştur (100).

Shorr Boyasıyla bizim yaptığımız çalışmada; hücre zarı çok güzel boyandığı için spermatozoa morfolojisi, hücre sınırları son derece belirgin görülebiliyordu. Hücre zarı, çekirdek ve sitoplazmaya göre çok daha koyu renge boyanmış idi. Başlar tamamen homojen olarak koyu sarı rengine boyanmıştı. Fakat kondansasyon değerlendirmesi yapılamıyordu. Spermatozoa orta parçası ve kuyruklar çok güzel ve net olarak değerlendirilebiliyordu. Bu anlamda Shorr Boyası ile yaptığımız çalışma literatür bilgisiyle

uyumludur ve spermatozoa morfolojik değerlendirmesi için oldukça iyi, kondansasyon değerlendirmesi için ise uygun bir boya olmadığı şeklinde değerlendirildi.

Papanicolaou yöntemi spermatozoa morfolojisi konusunda en sağlıklı sonuçları vermesi nedeni ile tercih edilir. Ancak Papanicolaou boyama yönteminin uzun sürmesi nedeni ile geliştirilen hazır spermatozoa boyama kitleri daha çok tercih edilir. Papanicolaou yöntemiyle hücrenin asidofilik çekirdekteki kromatin ayrıntılı bir biçimde incelenebilir. İnsan spermatozoalarının morfolojik değerlendirmesinin yanı sıra immatür germ hücrelerinin de ayırımını sağlar(44).

Menkveld ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada insan spermatozoa morfolojisi ile akrozomal fonksiyon arasındaki bağlantıyı incelemişler. Morfoloji Papanicolaou boyası sonrası Kruger strict kriterlerine göre sayılarak analiz edilmiş. Akrozom reaksiyonu normal, küçük ve büyük ölçülü canlı ve l spermatozoalar ayrılarak tripl boya ile değerlendirilmiş. Akrozomal reaksiyon ile morfoloji arasında büyük ve küçük ölçülü akrozomlarda korelasyon görülmüş. Sonuçlar göstermiş ki küçük akrozomlu spermatozoalar fizyolojik olmayan akrozom kaybı ve hücre ölümüne daha duyarlıdırlar. Ayrıca akrozom ölçüleri spermatozoa fonksiyon kapasitesini dolayısıyla erkek fertilitte potansiyelini yansıtır(101).

Coetzee K ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada 2 farklı komptr destekli semen analiz sistemini kullanarak normal spermatozoa morfolojini Diff-Quik ve Papanicolaou boyası kullanarak değerlendirmiş. Sonuçta her ikisinde de yüksek anlamlılık olduğu halde Diff-Quik boyasının daha yüksek derecede anlamlı çıkması gösterdi ki, komptr destekli spermatozoa morfoloji değerlendirilmesinde Diff-Quik boyası daha tercih edilen boya olmalıdır(102)

Daniel ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada strick spermatozoa morfolojisinin değerlendirilmesinde sürekli kalite kontrol programını incelemek için bir çalışma yapmışlar. Papanicolaou boyasıyla boyanmış spermatozoa preperatları hazırlanıp her üç ayda bir laboratuara gönderildi. Normal spermatozoa yüzdeleri ölçümle değerlendirildi. Referans laboratuvar ile normal spermatozoa yüzdesi karşılaştırıldı. Olguların % 94'nde referans laboratuardan % 10 farklılık kayıt edildi. Sonuçlar göstermiştir ki, laboratuvar teknikleri için sürekli kalite kontrolu faydalı olabilir ve androloji laboratuvarında ayrıntılı kalite kontrol ölçümleri zorunlu olmalıdır(103).

Matalliotakis ve arkadaşları 1996'da yaptıkları bir çalışmada 114 fertil ve 107 infertil erkekte insan spermatozoanın morfolojik anormalliklerini Papanicolaou Boyası ile

değerlendirmişler. Çalışma gösterdi ki, normal başlı spermatozoalarla karşılaştırıldığında anormal başlı spermatozoularda boyun ve kuyruk anomalileri daha sık görülmektedir(104).

Dimitrios ve ekibi 1988'de yaşları 20 ile 40 arası değişen 114 fertil erkeğin semeninde var olabilen spermatozoa morfolojik anomalilerini Papanicolau boyası ile değerlendirmişler. Boyundaki morfolojik anomaliler normal başlı spermatozoada anormal başlı spermatozoaya göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (105).

Bizim Papanicolau Boyası ile yaptığımız çalışmamız da spermatozoularda morfolojik değerlendirme açısından uygundu.Spermatozoa başları iyi boyanmış ve kondansasyon iyi görülebiliyordu.Orta parça ve kuyruklar net seçilebiliyordu.Bu anlamda literatür bilgisi ile uyumlu idi.

Xiaoli ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada prostat karsinomu ve onunla ilişkili atrofide yapılan radikal prostatektomide intraprostatik spermatozoanın zonal dağılım ve atrofiyle ilişkisini incelemek için Berg metodunu kullanmışlar. Bu metodla boyadıkları intraprostatik spermatozouların prostatta periferal zonda daha yoğun olduğunu görmüşler. Ayrıca intraprostatik spermatozoalı prostat daha geniş atrofik alanlara sahip ve prostat hiperplazisinin sıklığında artışla beraber seyrederek. Sonuçta prostat inflamasyonu ve atrofisinin patogeneğinde intraprostatik spermatozouların rolü vardır ve daha çok araştırmalar yapılmalıdır, sonucuna varmışlardır (106).

Berg metoduyla boyadığımız spermatozoularda morfoloji iyi fakat kondansasyon yeterince değerlendirilemiyordu. Orta parça belirgin, anomaliler rahatça seçilebiliyordu. Kuyruklar soluk boyanmış, net değerlendirilemiyordu. Çalışmamız morfoloji değerlendirmesi açısından literatür bilgisiyle uyumlu idi.

Orange G Boyası ile boyadığımız preperatlarda, spermatozoa morfolojisi net ve düzgün değerlendirildi. Tamamen turuncuya boyanan spermatozoada başta kondansasyon görülebiliyordu. Orta parça belirgin boyandı. Kuyruklar net seçilebiliyordu.

Çalışmamızda Light Green boyası ile boyadığımız spermatozoularda morfoloji iyi değerlendirildi. Başta kondansasyon iyi görülebildi. Spermatozoa orta parçası belirgindi. Kuyruklar soluk boyanmış fakat seçilebiliyordu.

Donald ve arkadaşının 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada Comet, Tunel, SCSA ve Akridin Orange Testleri ile spermatozoa DNA fragmentasyon tayini yaparak erkek infertilitesi ile arasındaki ilişkiyi incelemişler. Akridin Orange'nin metakromatik özelliğini kullanarak spermatozoa hücrelerini ışık mikroskopunda incelemişler. Denature DNA'ya sahip spermatozoular kırmızı, sağlam DNA'ya sahip spermatozoular yeşil boyanmış. Çalışmanın sonucunda intakt DNA'lı immatür spermatozoularla fertilizasyon oranlarında

azalma ile ilişkili bulunmuş. Ayrıca ICSI’de yüksek DNA fragmentasyonu ile, diğer ART metodların ya da doğal metodların da üzerinde azalmış gebelik prognozunun üstesinden gelinebilir, sonucuna varmışlardır. (107).

Roux Y ve arkadaşları 1989 yılında yaptıkları bir çalışmada ısı tedavisi sonrası insan spermatozoa yaymasında Akridin Orange kullanarak kromatin kondansasyonunu değerlendirmişler. Fikse edilmiş spermatozoaların smearlerine ısı tedavisi verilip Akridin Orange ile boyanmış. Bazı spermatozoa numunelerinin de yaymaları ayrıca asidik Anilin Blue ile boyandı. Floresan mikroskop altında kırmızı başlı spermatozoaların yüzdesi sayılarak semenin üç grubu belirlendi: 1. Isı tedavisi öncesi ve sonrası normal görünümde kromatine sahip spermatozoalı semen, 2. Isı tedavisi öncesi normal ve ısı tedavisi sonrası anormal görünümde kromatine sahip spermatozoalı semen, 3. Isı tedavisi öncesi ve sonrası anormal görünümde kromatine sahip spermatozoalı semen. Kırmızı başlı ve mavi boyanmış başlı spermatozoaların yüzdesi arasındaki pozitif korelasyon göstermiş ki DNA ile ilişkili bazik protein komponentinin biyokimyasal kompozisyonundaki modifikasyonlar DNA’daki denetrasyon sürecinden sorumludur (108).

Floresan boyası olan Akridine Orange boyası ile boyanmış preparatlar ışık mikroskobu ile boyandığında spermatozoalar çok soluk turuncu boyandı. Başta spermatozoa morfolojisi iyi görülebildi. Fakat başta kondansasyon değerlendirilemedi. Orta parça ve kuyruklar soluk, net seçilemiyordu. Spermatozoalar gölge görünümünde idi. Buna göre floresan görüntü için kullanılan AO boyası Işık Mikroskobu değerlendirmesi için avantajlı değildir, sonucuna varıldı. Bunun üzerine AO ile boyama sonrası 3,5 dakika Hematoksilen ile boyandı. Hematoksilenin sadece nükleus etrafındaki membran sahayı boyadığı ve spermatozoaya Y harfi görüntüsü verdiği gözlemlendi. AO ve Hematoksilen ile boyanmış preparatlardaki bu görüntünün, klinik değeri olup olmayacağına dair araştırmaya geçecek ileri bir çalışma olacağı düşüncesindeyiz.

C. Van Duijn 1961’de canlı spermatozoada vital boyamanın fotodinamik etkisini göstermek için mitokondrileri gösteren Janus Green boyasıyla bir çalışma yaptı. Normal olarak hareket eden spermatozoaların toplam sayısı ve onların ortalama hız ve hız dağılımlarında mitokondriler için spesifik vital bir boya olan Janus Green’in etkileri foto-elektrik donanımı kullanarak çalışıldı. Çalışmanın sonucuna göre, ışığın yokluğunda Janus Green 200 ppm ve üzeri konsantrasyondaki canlı spermatozoalarda değerlendirilebilir bir etkiye sahip değildir. Janus Green ışık altında güçlü fotosensitördür ve bu şartlarda normal hareketli spermatozoaların çoğunun oldukça iyi yüzdüğünü görülmüştür (109).

Michael ve arkadaşları 1987’de yaptıkları bir çalışmada faz kontrast mikroskop ile insan spermatozoa ve immatür germ hücrelerini boyayarak incelemişler. Janus Green B ve Tymol mavisi ile spermatozoaların başlarının ön bölümü, nükleer membran, orta parça ve kuyruk açık yeşil boyanırken, nükleus koyu mor boyanmış. Janus Green bu metodla faz kontrast mikroskop ile spermatozoa morfolojisini değerlendirmek için mükemmel boyanma sağlamış. Ayrıca Papanicolau boyası ile karşılaştırıldığında bu boyanın anlamlı derecede daha az anormal spermatozoa oluşumu sağladığı görülmüştür (110).

Bizim çalışmamızda, spermatozoa başı beyazımsı-mavimsi açık soluk renkte görülürken orta parça belirgin koyu mavi renkte boyandı. Kuyruklar koyu mavi renge boyandı. Sonuçta çalışmamız literatür bilgisiyle uyumlu olup Janus Green’in, mitokondrice zengin bir bölge olan spermatozoa orta parçasını net bir şekilde ortaya çıkarması bir kez daha görüntülenmiş oldu.

Spermatozoaların morfolojik özellikleri nümerik değerlerle de ifade edilir. Ancak burada, kullanılan boya yöntemlerinin spermatozoaların ölçülebilen değerlerine hafif bir değişikliğe neden olabileceğini unutmamak gerekir. Çünkü yayma preparatlar boyanmadan önce tespit edilir ve fiksatifler hücrelerin bir miktar büzülmesine neden olabilir. Ayrıca boyaların hazırlanması sırasında kullandığımız kimyasal çözücüye göre morfolojik ölçümler değişebilmektedir. Örneğin Papanicolaou yöntemiyle boyandığında spermatozoa başı 3–5 μm uzunluğunda ve 2–3 μm genişliğinde ise normal kabul edilir. Diff-Quik (Giemsa-Wright) boyama yönteminde ise spermatozoa başının yukarıdaki değerleri 5–6 μm ile 2.5 – 3.5 μm olarak saptanmıştır. Orta parça her ikisinde de 1 μm kalınlığında olup uzunluğu da bu değer 1.5 katı kadar olmalıdır. Kuyruk bölümü ise giderek incelen yapısı ile 45 μm uzunluğa sahiptir(44).

Çalışmamızın ikinci bölümünde, normozoospermatozoalı 10 hastanın Hematoksilen–Eozin, Toluidin Blue, Shorr ve Papanicolau ile boyanmış preperatlarını Kruger strick kriterlerini esas alarak morfometrik analizini yaptık. Spermatozoanın baş uzunluğu, baş genişliği, orta parça uzunluğu ve kuyruk uzunluğu olmak üzere 4 parametrede ölçüm yaptık. Bu ölçümlere göre sonuçları literatür bilgileriyle kıyasladığımızda farklı sonuçlar elde ettik.

Gago ve arkadaşları 1998’de yaptıkları bir çalışmada spermatozoa başlarının morfometrik değerlendirmesi için farklı boya metodlarıyla bilgisayar destekli imaj analiz sistemini kullanmışlar. Hematoksilen, Diff-quick(Giemsa-Wright) ve Hemaklor boyasıyla spermatozoa baş parametrelerinin morfometrik olarak ölçümünde hepsi için farklı değerler

bulunmuş. Buna göre spermatozoa baş boyutlarının, fiksasyon prosedürü ve boyama ile belirgin bir şekilde etkilendiği sonucuna varmışlar. Hematoksilen ve Giemsa- Wright boyasını morfolometrik olarak kıyasladığımızda anlamlı farklılık bulunmamıştır. Bu anlamda çalışmamız literatür bilgisiyle uyumluluk göstermemiştir(111).

Davis ve arkadaşları 1993'de yaptıkları bir çalışmada numune hazırlama, boyanma ve örnekleme metodlarının standartizasyonu için, otomatik cihazla spermatozoa baş morfolometrik analizini değerlendirmişler. Bunun için infertil semen değerlendirmesi için başvuran bireylerin numuneleri yıkama sonrası Papanicolau ve Hematoksilen ile boyanarak morfolometrik ölçümleri ve dijitalizasyon hatalarının karşılaştırılması yapılmış . İki boyada da ölçümler anlamlı bulunmuş. Bizim çalışmamız literatür bilgisiyle uyumlu olup Papanicolau boyası ve Hematoksilen boyası ile morfolometrik değerlendirmenin son derece uygun olduğu sonucuna varılmıştır(112).

Root Kustritz ve arkadaşları 1998'de yaptıkları bir çalışmada spermatozoada bulunan morfolojik anomalilerin tiplerini ve persentillerini ışık mikroskopunda Giemsa-Wright (Diff-Quick) Boyası, eozin Y/ nigrosin boyası ve eozin B/ nigrosin boyası ile araştırmışlar. Ayrıca boyanmamış numuneleri faz kontrast mikroskop ile değerlendirmişler. Çalışmanın sonucunda Diff-Quick Boyası ile boyanmış numunelerde normal spermatozoa morfolojisinin persentil ortalamasını önemli derecede daha yüksek bulmuşlar ve boyanma ile hazırlama tekniklerinin spermatozoa morfolojisinin değerlendirmesini değiştirebileceği sonucuna varmışlar(91).

Kruger ve ekibi 1987 yılında yaptıkları bir çalışmada insan spermatozoa morfolojisi için hızlı, güvenilir boyama tekniklerini incelemişler. Bunun için Diff-Quik (Giemsa-Wright) boyası ile Papanicolau boyasını karşılaştırmışlar. Morfolojik sonuçlara göre iki boya tekniği arasında anlamlı bir farklılık olmadığını görmüşler. Bizim çalışmamızda ise en yüksek spermatozoa morfolojik ölçüm değerleri Papanicolau boyasına ait idi. Bu anlamda çalışmamız literatür bilgisi ile uyumlu değildir(113).

Menkveld ve arkadaşları 1997'de yaptıkları bir çalışmada manuel ve kompütürize metodlar ile insan spermatozoa morfolojisinin değerlendirme sonuçlarına, farklı boyama ve yıkama prosedürlerinin etkisini incelemişler. Bu amaçla 20 semen numunesinde Papanicolau ve Diff-Quik boyama metodunu kullanmışlar. Sonuçta tüm veriler göz önünde tutulursa manuel değerlendirmeler bilgisayarla değerlendirmeye göre daha iyi sonuçlar vermiş. Ayrıca spermatozoa morfolojisi değerlendirmesi bir kez yıkanmış Diff-Quik'le boyalı smearlerde Papanicolau ile boyanmış preperatlara göre daha iyi netice vermiştir. Bizim çalışmamızda Papanicolau boyası ile yaptığımız morfolojik

değerlendirme Giemsa ve Wright Boyasına göre çok daha iyi idi. Bu anlamda literatür bilgisi ile uyumluluk göstermemiştir(114).

Meschede D. ve arkadaşları 1993 yılında 158 hastanın semeni üzerinde yaptıkları bir çalışmada insan spermatozoa morfolojik analizinin sonuçlarında üç farklı hazırlama tekniğinin etkisini incelemişler: Papanicolau boyası, Shorr boyası ve taze hazırlama protokolü(WET). Normal spermatozoa morfolojisini değerlendirmede Papanicolau boyası ve Shorr boyası yüksek derecede anlamlı çıkarken WET’te düşük değerde bulundu. Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu bulunmuştur(115).

Çalışmamızda, Shorr boyası ve Papanicolau boyası ölçüm sonuçları birbirine benzer çıkarken, spermatozoa başındaki morfometrik ölçümlerde en küçük değerler T. Blue boyası ile boyanmış preperatlarda görüldü. T. blue ile boyanmış spermatozoalarda özellikle baş uzunluğunda diğer boyalara göre anlamlı farklılık görüldü ($P < 0,028$).

Ayrıca boyalar arasında baş uzunluk, baş genişlik, orta parça ve kuyruk olmak üzere bütün ölçümlerde anlamlı farklılıklar görüldü. Ölçümlerde en küçük değerler T. Blue boyasına ait idi. Shorr boyası ile Papanicolau boyası ölçümleri birbirine yakın olmakla birlikte en büyük değerler Papanicolau boyasına ait idi .

Sonuç olarak spermatozoa morfoloji değerlendirmesi için yaptığımız çalışma ile ilgili olarak literatürde bir çok çalışma olmakla birlikte özellikle sadece spermatozoa morfoloji değerlendirmesi için karşılaştırmalı birden fazla boya ile yapılan çalışma sınırlı sayıdadır. Günümüzde erkek infertilitesine yardımcı üreme teknikleri ile getirilen bebek sahibi olabilme gerçeği düşünüldüğünde, kaliteli spermatozoa seçimi için spermatozoa morfolojisinin incelenmesine yönelik çalışmalar hala önemini korumaktadır.

6. ÖZET

SÜ Meram Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesine infertilite ön tanısı ile gelen hastaların spermiyogramları yapıldıktan sonra hastanın semen numunesinden 1-1.5 cc alınıp numuneye iki kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Pellet 0.2 ml medyumla karıştırılıp lam üzerinde yaymaları yapıldı. Oda sıcaklığında kurutulup absolu metil alkolde tespit edildi. Her bir hasta için; Hematoksilen-Eozin, Toluidin Blue, Giemsa, Wright, Weigert'in Demirli Hematoksilen boyası, Orange G Boyası, Anilin blue boyası, Shorr metodu, Papanicalou boyası, Light Green boyası, Akridine Orange boyası ve Janus Green boyası ile boyama işlemi uygulandı.

Boyanmış preperatlar IM'de 100'lük objektifte incelenip, boyaların spermatozoanın baş, orta parça ve kuyruk kısmını nasıl boyadığı değerlendirildi. Bulguların mikrofotografları alındı.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, normozoospermili 10 hastanın H-E, T.Blue, Shorr ve Papanicolau ile boyanmış preperatları değerlendirildi. Her bir preperatta Kruger strick kriterleri esas alındı. 200 adet normal morfolojili spermatozoa hücresinde; baş uzunluğu, baş genişliği, orta parça uzunluğu ve kuyruk uzunluğu olmak üzere 4 parametrede mikrometre yardımıyla ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler sonrası tek yönlü varians analizi (ANOVA) ve Post hoc Tukey HSD testi ile istatistiksel analiz yapılarak hangi boyanın spermatozoa morfolojisini daha iyi gösterdiği ve Kruger strick kriterlerine daha uygun olduğu belirlenmeye çalışıldı.

H-E ile boyamada spermatozoa morfolojisi özellikle spermatozoa baş orta parça ve kuyruk kısmı net görüldü. Kondansasyon oldukça iyi görüldü. H-E boyasının spermatozoanın genel morfolojik değerlendirmesi için ideal bir boya olduğu görüşüne ulaştık. T. Blue ile boyamada spermatozoa başındaki kondansasyon iyi seçiliyordu. Spermatozoa orta parçası ve kuyruğu boyandı. Orta parça iyi seçilemiyordu ve spermatozoa morfolojisi değerlendirilebiliyordu. Giemsa ile boyama sonrası spermatozoa baş morfolojisi ve kondansasyon iyi görülüyordu. Fakat orta parça ve kuyruk net seçilemiyordu. Wright boyası ile spermatozoa baş morfolojisi ve kondansasyonu iyi seçilebiliyordu. Orta parça ve kuyruk soluk boyanmış idi. Weigert'in Demirli Hematoksilen Eozin boyası ile spermatozoa başında kondansasyon iyi görülebiliyordu. Baş, orta parça çok net değerlendiriliyor ve kuyruklar net seçilebiliyordu. T. blue ile boyanmış spermatozoalarda özellikle baş uzunluğunda anlamlı farklılık görüldü. Aynı şekilde değerlendirmeler diğer boyalarlada yapıldı.

Çalışmanın ikinci bölümünde bu dört boya grubuna göre ölçümü yapılan spermatozoaların değerlendirilmesinde bütün ölçümlerde anlamlı farklılıklar çıktı. En küçük değerler T. Blue boyasına ait idi. Shorr boyası ile Papanicolau boyası ölçümleri birbirine yakın olmakla birlikte en büyük değerler Papanicolau boyasına ait idi. Bu çalışmadaki istatiki anlamlılık seçilen boya ile değişebilmektedir, sonucuna varıldı.

7. ABSTRACT

After routine spermiogram was done, to the patients in SU. Meram Med. Fac. IVF Unit, 1-1,5 cc seminal plasma samples were taken and two separate swim up procedure was prepared. The pelled was homogenated with 0,2 ml medium and smear samples were prepared. Smears were dried in room temperature and fixed with absolute alcohol. For each patient staining was performed with Haematoxylin-Eosin, Toluidin Blue, Giemsa, Wright, Weigert's Iron Haematoxylin, Orange G, Aniline blue, Shorr, Papanicalou, Light Green , Acridine Orange and Janus Green stains.

Stained slides were evaluated under x100 objective magnification with light microscopy. Stain and spermatozoa head, midpiece and tail reaction was under inspection and photomicrographs were taken for this aim.

The second part of our study was based on 10 patients who had normospermatozoa, their seminal samples were stained with H-E, T. Blue, Shorr and Papanicolau. In this part we made strict Kruger analysis on the samples. For each sample human spermatozoa was evaluated with micrometer, for head lenght- width, middle piece and tail lenght. The results were evaluated with statistical analysis (ANOVA, Post Hoc Tukey HSD) to reveal which stain was proper for Kruger's Strict Criteria with H-E spermatozoa head, midpiece and tail morphology was clearly identified. Condensation was also clearly identified. H-E stain was considered to be suitable for general parameters of spermatozoa T.Blue revealed condensation more spesifically. Midpiece stained poorly general morphology was quite good for inspection. With Wright stain head morphology and condensation was satisfactory, midpiece and tail stained poorly. With Weigert's Iron H-E head and condensation stained good, also midpiece and tail was suitable. Other previously mentioned stains were evaluated in the same manner.

The second part of our study revealed significant difference on spermatozoa head lenght when stained with T. Blue.

We revealed that different stains can give different statistical results.

8. KAYNAKLAR

1. Spira A. Epidemiology of Human Reproduction. Hum Reprod. 1986; 1: 111-115.
2. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji, 3.baskı. Güneş Kitabevi 2007; 967-990.
3. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic Injection of a single spermatozoa into an oocyte. Lancet 1992. ; 340: 17-18.
4. Van Steirteghem AC, Nagy PZ, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic spermatozoa injection. Hum Reprod 8 1993; 1061-1066.
5. RS, Althouse GC. Determining sample size for the morphological assessment of spermatozoa. Theriogenology 2004;61: 691-703.
6. Brugh VM, Matschke HM, Lipshultz LI. Male factor infertility: Evaluation and management. Endocrinol Med Clin North Am 2004; 88: 367-385.
7. Bernard Jegou, Charles Pineau, Jorna Toppari. Spermatogenesis in vitro in mammals. In Assisted Reproductive Technology. Jonge CD, Barratt CLR, eds. CambridgeUniversity Press: Cambridge. 2002;3-25.
8. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal spermatozoa morphology a structured review. Hum Reprod 1998; Update 4: 73-82.
9. Ombelet W, Pollet H, Bosman E, Vereecken A. Results of a questionnaire on spermatozoa morphology assessment. Hum Reprod 1997; 12: 1015-1020.
10. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJvW, Kruger Tf, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990;5: 586-92.
11. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard GJ, Vander Merve JP, Vanzyl JA, et al. Spermatozoa morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118-23.
12. Kruger TF, Acosta AA, Simons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal spermatozoa morphology in invitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 112- 7.
13. Kretser DM, Baker HWG. Human Infertility: The male factor. In Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. Lippincott-Raven: New York, 1996; 2031-61.
14. Özdiler E, Aydos K, eds. Erkeklerde infertiliteye neden olabilen sistemik hastalıklar ve gonadotoksinler. Klinik Androloji, AÜ Basımevi, Ankara: 2000;525-36.
15. Anthony V Hirsh. The investigation and therapeutic options for infertile men presenting in assisted conception units. In: In vitro fertilization and assisted reproduction: the Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. Second ed, Brinsden PR, ed. New York: Parthenon Publishing. 1999; 27-52.

16. Brinkworth MH, Handelsman DJ. Environmental influences on male reproductive health. In Andrology: Male reproductive health and dysfunction, Nieschlag E, Behre HM, eds. Springer-Verlag: New York. 2001;253-70.
17. Anthony V Hirsh. The investigation and therapeutic options for infertile men presenting in assisted conception units. In: In vitro fertilization and assisted reproduction: the Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. Second ed, Brinsden PR, ed. New York: Parthenon Publishing. 1999; 27-52.
18. Report on optimal evaluation of the infertile male Infertility: American Urological Association, Inc. American Society for Reproductive Medicine, 2001.
19. B Young, JW Heaty. Wheater's Functional Histology A Text Atlas; Forty edition, 2000.
20. TW Sadler. Langman Medikal Embriyoloji. Çev A.Can Başaklar.9.baskı, Palme yayıncılık, Ankara 2005: 328-343.
21. Aysel Şeftalioğlu. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, Dördüncü Baskı. Alp Ofset Matbaacılık, Ankara 2003: 14.
22. Keith L. Moore, TVN Persaud. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Çev Mehmet Yıldırım. 6. baskı, Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul 2002: 323-334.
23. Drews U. Renkli Embriyoloji Atlası. Çev. Ed. Aytekin Y, Gürsoy E, Nobel/ Yüce, Thieme 2000.
24. Williams J.Larsen. Human Embriyology, 2nd Edition. Churchill Livingstone, 2001.
25. Gökmen FG. Sistematik Anatomi. İzmir Güven Kitabevi,2003; S: 549-560.
26. Junqueira LC, Carneiro J, RO Kelley. Çev Ed Aytekin Y. Temel Histoloji. Barış Kitabevi İstanbul,1998; S: 407- 422.
27. www.octc.kctcs.edu/.../anat2/notes/Image613.gif (Son erişim tarihi 25.08.2008)
28. Ozan H. Anatomi. Nobel Kitabevi. Ankara,2 004;S: 304-312
29. Kadioğlu A.Çayan S, Semerci B, Orhan İ. Erkek Reprodüktif Sistem hastalıkları ve Tedavisi. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2004. S: 91-102.
30. Barratt CLR. In Grudzinskas JG, Yovich JL ed. Spermatogenesis, Gametes The spermatozoa . Cambridge, Cambridge University Pres.1995; pp: 250-267.
31. Kurt E. Johnson Ph. D. Histology and cell biology. 2nd edition Williams and Wilkins. Harwal Publishing Company Media, Pennsylvania. 1991;pp:295-303.
32. www.lab.anhb.uwa.edu.au (Son erişim tarihi 25.08.2008).
- 33.Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. Çev. Ed. Yıldırım M. Tıp Fakültesi Öğrencileri için Gray's Anatomi. Güneş kitabevi. Ankara 2007; S: 406-410.
- 34.Weiss L. Histology Cell and Tissue Biology. Fifth Ed, Elsevier Biomedical.1983.
- 35.Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in: 198-236.
- 36.William Bloom, Don W. Fawcett. A Textbook of Histology, Tenth Edition, 1975. pp: 821.

37. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B.Saunders Company, 1997; pp: 406-412.
38. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology a Text and Atlas, 4th ed. Lippincott Williams-Wilkins, Philadelphia. 2003; pp: 689-696.
39. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. Theriogenology, 2003;59:73-86.
40. Syed V, Hecht NB. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. Mol Cell Endocrinol (MCE) 2002;186:144-157.
41. Amann RP. Structure and function of the normal testis and epididymis. J am Coll Toxicol 1989;8(3):457-71.
42. Russel LD, Etlin RA, Hikim APS, Clegg ED. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Pres, 1990.
43. Johnson L. Spermatogenesis and aging in the human. J Androl, 1986;7:331-354.
44. İbni Sina Laboratuvarı. www.ibnisina.org/ibnisina/ibnisinakatalog/diagnostik.doc (Son erişim tarihi 30.09.2008).
45. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination on Human Semen and Spermatozoa-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1999; 76: 4-33 .
46. <http://www.aksuvar.com/frameset.htm> (son erişim tarihi: 20. 08. 2008).
47. Rajvi H Mehta, Sanjay Makwana, Geetha M Ranga, RJ Srinivasan, SS Virk. Prevalences of oligozoospermia and azoospermia in male partners of infertile couples from different parts of India. Asian J Androl 2006; 8 (1): 89-93.
48. John D Bancroft, Alan Stevens. Teory and Practice of Histological Techniques. Third Edition, 1990.
49. RD Lillie. Histopathologic Technic and Pratical Histochemistry. Third Edition, 1965.
50. Demir Ramazan. Histolojik boyama teknikleri. Palme Yayıncılık Ankara 2001.
51. Blue Histology <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/MoreAbout/stains.htm> (Son Erişim Tarihi: 20. 03. 2008).
52. Soylu Refik, Sezen Şaban. Genel Histoloji. Atlas Kitabevi, 1996.
53. Avcı Berrin. Farklı fiksasyon protokolleri ile spermatozoa kromatin protokolleri ile spermatozoa kromatin kondansasyon anomalisinin değerlendirilmesi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2006; 32(2): 55-59.
54. George Clark. Staining Procedures, Fourth Edition. By Williams and Wilkins.
55. <http://www.bristol.ac.uk/vetpath/cpl/wrights.html>. (Son Erişim Tarihi: 20. 04. 2008)
56. J A Kiernan. Histological and histochemical Methods Teory and Practice. Second Edition 1990.
57. The Centre for Cancer Education. All Rights Reserved. www.CancerEducation.org Published at the Centre for Cancer Education, Universty of Newcastle upon Tyne (05 March 2000).

58. <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/hematoxylin/iron/weigert.htm>. (Son Erişim Tarihi: 03. 04. 2008).
59. ME Hammadeh, SA Hasani, M Stieber, P Rosenbaum, D Kiipker, K Diedrich. The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoon fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic spermatozoa injection programme Human Rep 1996;vol 11.11 pp: 2468-2471.
60. Erica G, Wachtel, MD. Pratik jinekolojide eksfoliyatif sitoloji. 2. baskı, Mayıs 1969.
61. Türkan Samim Dr. Reprodüktif Period Gebelik ve Patolojik Gebelikte Vaginal Sitoloji. Hilal Matbaacılık İstanbul 1973; Sayfa 22.
62. http://www.mrothery.co.uk/bio_web_prac/practicals/2anaerobic%20resp%20student.doc (Son Erişim Tarihi: 03. 04. 2008).
63. <http://www.sh.lsuhs.edu/fammed/outpatientManual/OptimizingthePapanicolaouSmear> (Son Erişim Tarihi: 03. 04. 2008).
64. <http://www.med.umich.edu/flowcytometry/PDF%20files/aostain.pdf> (Son Erişim Tarihi: 03. 04. 2008).
65. Edna B. Prophet, Bob Mills. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. Washington 1992.
66. Ombelet W, Pollet H, Bosmans E, Vereecken A. Results of questionnaire on spermatozoa morphology assesment. Hum Reprod 1997; 12: 1015- 1020.
67. Eggert- Kruse W, Reiman- Andersen J, et al. Clinical relevance of spermatozoa morphology assesment using strict criteria and relation ship with spermatozoa mucus interaction in vivo and in vitro. Fertil Steril 1995; 63(3): 612-3.
68. Garcia Herreros M, Aparicio IM, Baron FJ, Garcia Marin LJ, Gil MC. Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated spermatozoa head morphometry analysis of boar spermatozoa. Int J Androl. 2006 Oct;29(5):553-63.
69. C Soler, B Gadea, AJ Soler, MR Fernandez Santos, MC Estes, J Nunez, PN Moreira, M Nunez, R Gutierrez, M Sancho and JJ Gadre. Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer spermatozoa morphometry by computerized analysis with ISAS Theriogenology Volume 64, Issue 5, 15 September 2005, Pages 1236-1243.
70. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rouge D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. J Forensic Sci. 2001 Mar; 46(2):349-51.
71. MC Sardor, MI Carretero and DM Neild. Evaluation of stallion spermatozoa DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. Animal Reproduction Science Volume 107, Issues 3-4, September 2008; Pages: 349-350.
72. Reda Z. Mahfouz MD, Rakesh K. Sharma Ph D, Tamer M Said MD, Juris Erenpreiss M D and Ashok Agarwal PhD, HCLD. Association of spermatozoa apoptosis and DNA ploidy with spermatozoa chromatin quality in human spermatozoa doi:10.1016/j. Fertil stert.2008;01.047

73. Beletti ME, Mello ML. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit spermatozoa chromatin condensation and their relationship with spermatozoa morphology. *Theriogenology*. 2004 Aug; 62(3-4):398-402.
74. Schütte B. Human spermatozoa stained with toluidine blue-pyronine. A rapid method for differentiation. *Andrologia*. 1986 Nov-Dec;18(6):567-9.
75. Krzanowska H. Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. *J Reprod Fertil*. 1982 Jan;64(1):97-101.
76. Sanchez R, Villagran E, Risopatron J, Celis R. Evaluation of nuclear maturity in human spermatozoa obtained by spermatozoa-preparation methods. *Andrologia*. 1994 May-Jun;26(3):173-6.
77. Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of spermatozoa chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl*. 2001 Mar-Apr;46(2):99-104.
78. Frederic Morel BS, Sylvie Mercier Ph D, Christophe Roux MD, Ph D, Tariq Elmrini M.D, Marie Claire Clavequin PhD. and Jean Luc Bresson M.D. Interindividual Variations in the Disomy Frequencies of Human Spermatozoa and their correlation with Nuclear Maturity as Evaluated by Aniline Blue Staining. *Fertility and Sterility* Volume 69, Issue 6, June 1998; Pages. 1122-1127.
79. R H Foote. Bull spermatozoa surface "craters" and other aspects of semen quality *Theriogenology* Volume 51, Issue 4, 1999, Pages 767-775.
80. Delgado NM, Sanchez-Vazquez ML, Hernandez O, Reyes R. Correlation between spermatozoa membrane destabilization by heparin and aniline blue staining as membrane integrity index. *Arch Androl*. 1998 Mar-Apr;40(2):147-52.
81. K Borg, B Colenbrander, A Fazeli, J Parlevliet and L Malmgren. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa *Theriogenology* Volume 48, Issue 4, September 1997, Pages. 531-536.
82. Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Küpker D, Diedrich K, Schmidt W. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic spermatozoa injection programme. *Hum Reprod*. 1996 Nov;11(11):2468-71.
83. Hou JW, Chen D, Jeyendran RS. Spermatozoa nuclear maturity in spinal cord-injured men: evaluation by acidic aniline blue stain. *Arch Phys Med Rehabil*. 1995 May;76(5):444.
84. Kutvölgyi G, Stefler J, Kovacs A. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. *Biotech Histochem*. 2007 Feb;82(1):45.

85. Elvan Ok, Doğan Özyurt, Bülent Gülekli. Asthenozoospermi olgularında spermatozoa morfolojisi değerlendirmede Spermac ve Diff-quick boya yöntemlerinin karşılaştırılması. *Gülhane Tıp Dergisi* 2008; 50: 23-26.
86. Vildan Karpuz, Aslı Göktürk, Meral Koyutürk. The effects of spermatozoa morphology and motility on the outcome of intracytoplasmic spermatozoa injection. *Marmara Medical Journal* 2007;20(2):92-97.
87. CM Tartaglione and MN Ritta. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen *Theriogenology* Volume 62, Issue 7, 1 October 2004; Pages: 1245-1252.
88. Günay Ülgen, Nur Zekariya, Soylu M. Kemal. Dondurulmuş-Çözündürülmüş Köpek Spermatozoanın Boyama ve Fikzasyon İşlemlerinden Sonra Değerlendirilmesi. *Uludag Univ. J. Fac Vet Med.* 22 (2003); 1-2-3: 27-31.
89. Amer M, Abd Elnasser T, El Haggag S, Mostafa T, Abdel-Malak G, Zohdy W. May-Grünwald-Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate: a simple predictive parameter for successful testicular spermatozoa retrieval. *Hum Reprod.* 2001 Jul;16(7):1427-32.
90. Sz. Nagy, G Hazas, A Bali Papp, J Ivancsics, F Szasz, F Szasz, Jr, A Kovacs and R H Foote, Evaluation of spermatozoa tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology* Volume 52, Issue 7, November 1999; Pages: 1153-1159.
91. Root Kustritz MV, Olson PN, Johnston SD, Root TK. The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1998 Jul-Aug;34(4):348-52.
92. Jacob Ashkenazi, Raoul Orvieto, Ruth Gold-Deutch, Dov Feldberg, Dov Dicker, Isachar Voliovitch and Zion Ben-Rafael The impact of woman's age and spermatozoa parameters on fertilization rates in IVF cycles *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* Volume 66, Issue 2, June 1996; Pages: 155-159.
93. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, Demirakca T, Tilgen W, Runnebaum B. Spermatozoa morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum Reprod.* 1996 Jan;11(1):139-46.
94. Madan K. Tamuli and PF Watson . Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live spermatozoa subpopulation *Animal Reproduction Science* Volume 35, Issues 3-4, May 1994; Pages: 247-254.
95. Kovacs A, Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem.* 1992 May;67(3):119-24.
96. Marshburn PB, Stovall DW, Hammond MG, Talbert LM, Shabanowitz RB. Fertility rates in men with normal semen characteristics: spermatozoal testing by induction of the acrosome reaction and Wright-Giemsa staining for subtle abnormal forms. *Obstet Gynecol.* 1991 Jun;77(6): 961-2.

97. Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res.* 1989 Jan;22(1): 51-7.
98. Henkel R, Maass G, Schuppe HC, Jung A, Schubert J, Schill WB. Department of Urology, Friedrich Schiller University, Jena, German. Schuppe HC, Jung A, Schubert J, Schill WB. Molecular aspects of declining spermatozoa motility in older men. *Fertil Steril.* 2005 Nov; 84(5):1430-7.
99. Ralf Henkel Ph. D. Jörg Bittner M.D. Ralf Weber Ph.D. Friedrich Hüther Ph.D. and Werner Miska Ph. D. Relevance of zinc in human spermatozoa flagella and its relation to motility Fertility and Sterility. Volume 71, Issue 6, June 1999; Pages: 1138-1143.
100. Spiros Milingos, Frank H. Comhaire, Anthi Liapi and Dionisios Aravantinos. The value of semen characteristics and tests of spermatozoa function in selecting couples for intra-uterine insemination *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* Volume 64, Issue 1, January 1996; Pages: 115-118.
101. Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. Relationship between human spermatozoa morphology and acrosomal function. *J Assist Reprod Genet.* 2003 Oct;20(10):432-8.
102. Coetzee K, Bermes N, Krause W, Menkveld R. Comparison of normal spermatozoa morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia.* 2001 May;33(3):159-63.
103. Daniel R. Franken PhD, Regula Barendsen Clin. Med. Tech. and Thinus F. Kruger MD A continuous quality control program for strict spermatozoa morphology *Fertility and Sterility* Volume 74, Issue 4, October 2000; Pages: 721-724.
104. Matalliotakis I, Panidis D, Vlassis G, Kalogeropoulos A, Zolindaki A, Koumantakis E. The evaluation of morphological abnormalities of human spermatozoa in fertile and infertile men. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996 May;66(1):65-8.
105. Dimitrios Panidis, Georgios Vlassis, Malamatenia Vayionas, Ioannis Matalliotakis and Achilleas Kalogeropoulos. Coexistence of spermatozoa morphological abnormalities in the semen of potentially fertile men *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* Volume 29, Issue 4, December 1988; Pages: 281-286.
106. Xiaoli Chen MD, Jin Zhao MD, Sadia Salim MD and Fernando U. Garcia MD. Intraprostatic spermatozoa: zonal distribution and association with atrophy. *Human Pathology* .Volume 37, Issue 3, March 2006, Pages 345-351.
107. Donald P. Evenson and Regina Wixon. Clinical aspects of spermatozoa DNA fragmentation detection and male infertility *Theriogenology* Volume 65, Issue 5, 15 March 2006; Pages. 979-991.

108. Roux C, Dadoune JP. Use of the acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment: evaluation of the chromatin condensation. *Andrologia*. 1989 May-Jun;21(3):275-80.
109. C. Van Duijn Jr. Photodynamic effects of vital staining with diazine green (Janus green) on living bull spermatozoa. *Experimental Cell Research* Volume 25, Issue 1, October 1961; Pages: 120-130.
110. Michael AY, Drejer JO, Bagger PV, Detlefsen GU, Stakemann G Complete staining of human spermatozoa and immature germ cells combined with phase contrast microscopy *Archives of andrology* vol 19-3, 1987; pp: 217-221.
111. Gago C, Pérez-Sánchez F, Yeung CH, Tablado L, Cooper TG, Soler C Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of spermatozoa heads in the *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*) using computer- assisted image analysis. *Int J Androl*. 1998 Jun;21(3):169-76.
112. Davis RO, Gravance CG. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated spermatozoa-head morphometry analysis. *Fertil Steril*. 1993 Feb;59(2): 412-7.
113. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick, reliable staining technique for human spermatozoa morphology. *Arch Androl*. 1987;18(3): 275-7.
114. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, de Villiers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human spermatozoa morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia*. 1997 Jan-Feb;29(1): 1-7.
115. Meschede D, Keck C, Zander M, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Influence of three different preparation techniques on the results of human spermatozoa morphology analysis. *Int J Androl*. 1993 Dec;16(6): 362-9.

9.TEŞEKKÜR

Tezin hazırlanmasında ve tüm asistanlık eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Hasan Cüce Hocam'a ,

Danışman Hocam Doç. Dr. Murat Aktan'a, Öğretim Üyeleri Prof. Dr Serpil Kalkan, Prof.Dr. Selçuk Duman ve Prof. Dr. Aydan Canbilen Hocam'a,

İstatistik çalışmalarını yapan Uz. Dr. Fatih Kara'ya, Laboratuar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biolog Hüseyin Akbulut'a

teşekkür ve saygılarımı sunarım.