



Başkent

UNIVERSITY
ÜNİVERSİTESİ

SEMEN ANALİZİNİN TEKNİĞİ, YORUMU ve KLİNİKTEKİ UYGULAMASI

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Doç. Dr. GÖĞŞEN ÖNALAN

Erkek infertilitesi

- %35-50
- ART' deki gelişmelerden dolayı gözardı edilir

Erkek infertilitesi

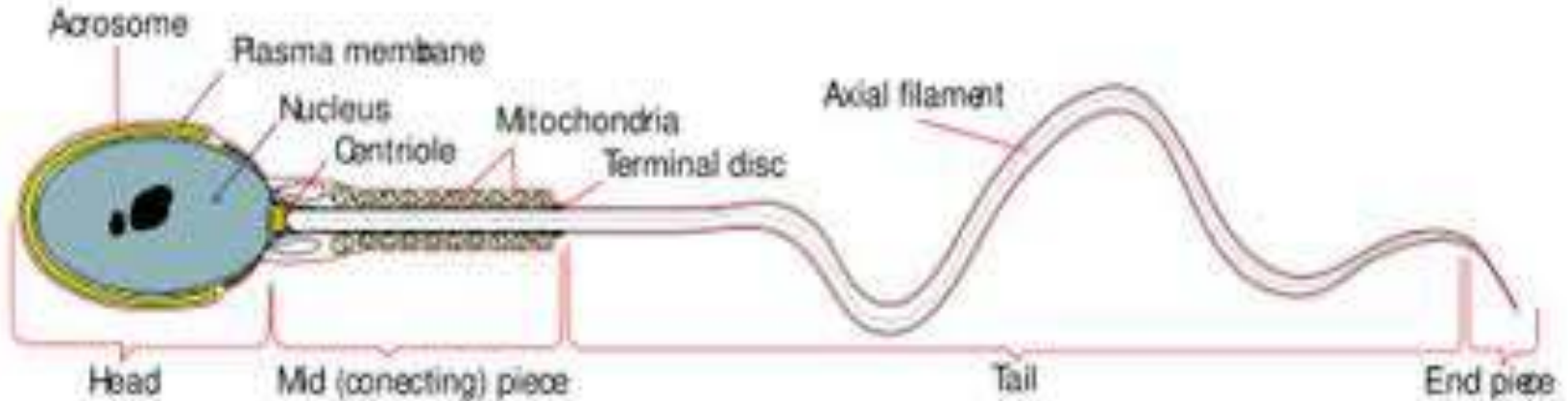
- ART uygulayıcıları çoğunlukla jinekologlardır ve erkek infertilitesi-subfertilitesi ile ilgili eğitimleri azdır
- Teorik olarak konu ile ilgilenmesi gereken ürologların ilgisi azdır ve araştırma bütçeleri sınırlıdır

Erkek infertilitesi

- Belkide en önemlisi sperm fonksiyon testleri oldukça tartışmalı bir araştırma alanıdır
- Düşük spesifite, sensitivite, metodolojide standart olmaması, optimal olmayan çalışma dizaynı, sonuçların değerlendirme problemleri ve uzun süreli takip yokluğu

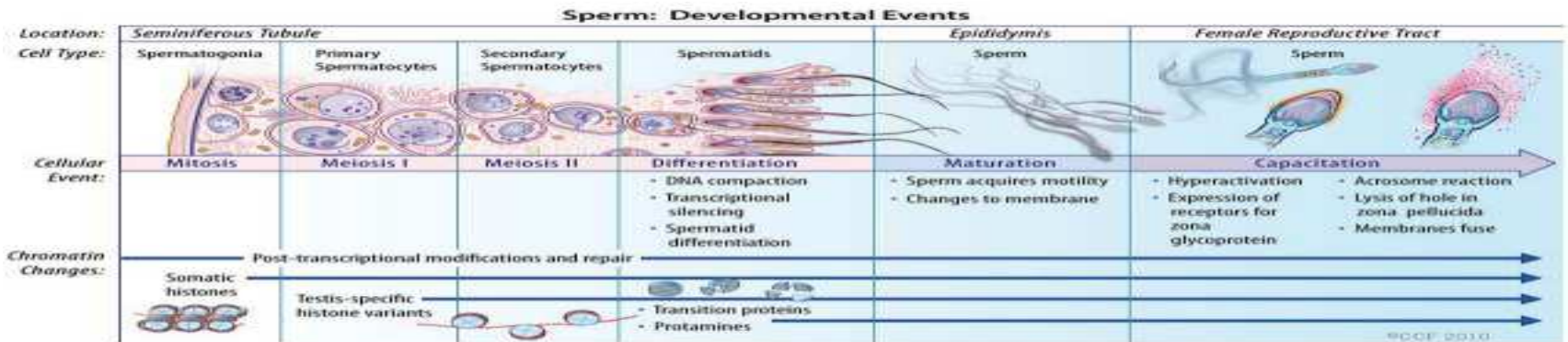
Erkek infertilitesi

- Kadın infertilitesi gibi erkek infertiliteside multifaktöriyeldir
- Fertilizasyon çok basamaklı bir işlem olduğundan tek testle değerlendirme mümkün olamamakta



Sperm fonksiyonu

- Feritilizasyon bölgesine ulaşmak
- Kapasitasyon
- Akrozom reaksiyonu
- Pronukleus oluşumu



İrdelenecek Konular

- Semen içeriği
- Örnek verilmesi
- Seminal sıvının değerlendirilmesi
 - Makroskopik:görünüş,viskozite,volüm,pH
 - Mikroskopik:motilite, vitalite, sayı, morfoloji
 - İmmunolojik analiz:sperm MAR testi, immunobead testi
 - Biyokimyasal analiz:fruktoz-seminal vesikül belirteci,
çinko, asit fosfataz, sitrik asit- prostat belirteci
Alfa glukozidas, karnitin-epididim belirteci
 - Sperm fonksiyon testleri:post-koital, servikal mukus penetrasyon,
hamster egg penetrasyon, hipoosmotik şişme, CASA
- Normal değerler WHO 1999 ve 2010
- Semen kalite isimlendirmesi

Normal semen

- Erkek genital sisteminin glandlarından salgılanan sekresyonlar ile (Seminal Plazma) spermin suspansiyon şeklindeki karışımıdır.
- Ejakulat 4 bölüme ayrılabilir:
 - Pre-ejakulat fraksiyon Cowper' s veya Litter' s glandlerinin protein içerikli salgısı olup orta derecede viskosedur ve idrarı nötralize eder.
 - Öncü fraksiyon kestane çiçeği kokusunu veren prostat sekresyonudur ve spermatozoal koagulumu likefiye eder
 - Temel fraksiyon seminal vesikül, testis, epididim ve kısmen prostat gland salgısıdır.Öncü ve temel fraksiyon spermatozanın çoğunu salgılar
 - Terminal fraksiyon seminal vesikül kaynaklı ve jelatinöz yapıdadır.

Normal semen parametreleri

- 65 yıldır, major sperm parametrelerinin referans değerleri 3 çalışmaya göre (1951-1980, 1981-1991, 1991-2010)
 - MacLeod çalışması (1951-1953)
 - Guzick çalışması (1991) Değişen sperm morfoloji değerleri idi
 - 2010, 5ci Baskı

2010 WHO Semen analizi

- Dört farklı populasyon verisi,
- Toplam 4500 erkek 4 kıtadan 14 ülkeden–
 - Oniki ay ve daha kısa sürede baba olan erkekler(gebeliğe ulaşma süresi:TTP)
 - Fertilitesi bilinmeyen, araştırılmamış genel popülasyondan erkekler
 - Fertil erkekler baba olduklarında geri bildirim olmayan grup
 - 1999, WHO ya göre normozoospermik saptanan erkekler

2010 WHO Semen analizi

- Ortalama, ve üst ve alt limitlerden farklı olarak TTP < 12 ay fertil erkeklerin 5ci yüzdelik dilimi normalin alt sınırı olarak kabul edildi
- %95 güven aralığı %5 in dışında kalan olarak hesaplandı

Cut-off reference values for semen characteristics as published in consecutive WHO manuals

Semen characteristics	WHO 1980	WHO 1987	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010
Volume (mL)	ND	≥ 2	≥ 2	≥ 2	≥ 1.5
Sperm count (10 ⁶ /mL)	20-200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 15
Total sperm count (10 ⁶)	ND	≥ 40	≥ 40	≥ 40	≥ 39
Total motility (%)	≥ 60	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 40
Progressive motility	≥ 2	≥ 25%	≥ 25% (a)	≥ 25% (a)	≥ 32% (a+b)
Vitality (%)	ND	≥ 50	≥ 75	≥ 75	≥ 58
Morphology (%)	80.5	≥ 50	≥ 30	(14)*	≥ 4*
Leukocyte count (10 ⁶ /mL)	< 4.7	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0

Percentile distribution of semen characteristics values of recent fathers whose partners had a TTP ≤ 12 months, used to establish the reference limits in the 2010 WHO manual

	Centiles		
	5%	50%*	95%
Volume (mL)	1.5	3.7	6.8
Sperm count per mL ($\times 10^6$)	15.0	73.0	213.0
Sperm count per ejaculate ($\times 10^6$)	39.0	255.0	802.0
% Motility (total)	40	61	78
% Motility (progressive)	32	55	72
% Normal (strict criteria)	4	15	44
% Alive (eosin-nigrosin staining)	58	79	91

Örnek Toplama ve Transport

- Hastaya uyarılar yazılı ve sözel olarak net verilmelidir
- Minimum 48 saat cinsel perhiz olmalı ve 7 günü geçmemeli ideali 3-5 gün
- **Başlangıçta 2 örnek alınmalı, araları 7 günden az veya 3 haftadan uzun olmamalı**
- Motil spermatozoa sayısı azsa 2 örnek arası olabildiğince kısa olmalı
- Örnek laboratuara 1 saat içinde ulaştırılmalı

Örnek Toplama ve Transport

- Örnek mastürbasyonla temiz cam veya plastik kaba alınmalı, dışı sarılmamalı
- Likefiye olduktan sonra en geç yarım saat içinde değerlendirilmeli
- Kondom veya koitus interruptus kullanılmamalı
- Örnek ortam ısısı 25°C az veya 40°C den fazla ortam ısısına maruz kalmamalı

Semen Deęerlendirmesi

- Makroskopik-fiziksel inceleme
- Mikroskopik inceleme
- Biyokimyasal testler
- Bakteriyel-serolojik-immunolojik testler

Koagulasyon

- Semen likid olarak ejaküle edilir, seminal vesikülden Protein kinaz enzimi ile kuagüle olur
- Likefikasyon 30 dk içinde olmalı, olmaması konjenital vas deferens, seminal vesikül yokluğu veya tıkanıklığı
- 20 dk' dan kısa veya 30 dk' dan uzun sürmesi inkomplet likefikasyon
- Likefiye olmaması durumunda plazmin 0.35-0.5 U/ml veya kimotripsin 150 USP/ml ile muamele

Makroskopik-fiziksel inceleme

- Koku: kestane çiçeği kokusu, olmaması prostatik aktivitenin olmaması
- Bulanıklık= sperm dansitesi
- Renk: bulanık beyazdan griye
- Renk perhiz süresine göre değişkendir; süre kısaysa şeffaf, uzunsa sarı gri
- Salgı bezlerinde inflamasyon kirli-sarı(piyospermi)
- Beyaz, berrak azoospermi
- Kahverengi ve kırmızı renk hemospermia

Volume

- Normal 1.5-4 ml
- 0.1 ml Dereceli tüplerle değerlendirilmeli
- Hipospermi:retrograd ejakulasyon, prostat ve seminal vesikül hastalıkları veya konjenital yokluğu

Viskosite

- Cam çubukla ölçülür, semene daldırılır ve çıkarılır, semen uzaması 10-20 mm olmalı
- Aşırı viskosite genital trakt infeksiyonu veya antisperm antikoru

pH

- pH kağıtları veya pHmeter
- Ejakulasyondan 1 saat içinde bakılmalı ve 7.2-8
- 7 nin altı seminal vesikül, vas deferens disgenezisi
- Orşit, seminal vesikülitis nötral veya alkalın
- Bakteri kontaminasyonu veya ölü sperm varlığı amonyum oluşumu ve artmış pH

Ozmolalite

- Semen 300 g de santrifüjden sonra ayrılan seminal plazmanın osm 360-380 mOsm/kg
- Düşük osm morfolojik anomali(kıvrık kuyruk)

Biyokimyasal inceleme

- Seminal plazmada temel şeker fruktoz 13 mol veya daha fazla
- Azlığı seminal vesikül disgenezisi, konjenital vas deferens yokluğu
- Çinko: 14 mg/100ml, direkt prostatik salgı
- Sitrik asit: 52 umol/ejekülat, prostatik salgı olup plazma testosteron seviyesi ile direkt orantılıdır
- Hiyaluronidaz, asit fosfataz kumulus dağıtıcı

Mikroskopik inceleme

- Sperm yoğunluđu, motilite, aglutinasyon ve diđer sellüer elementler
- İdeal Faz kontrast mikroskop, ve tabla ısısı 37° C
- Sayı çok değişkense çok homojen olmadığını, iyice karıştırdıktan sonra tekrar incelenilmeli
- Sperm yoksa 3000g de 15 dk santrifüj sonrası tekrar değerlendirilmeli
- Baş ve kuyruklu spermler sayılmalı

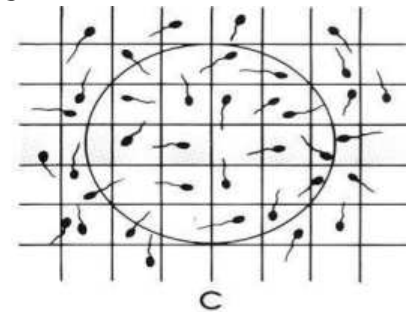
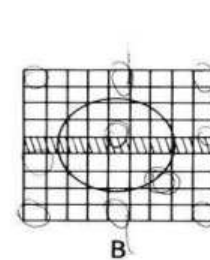
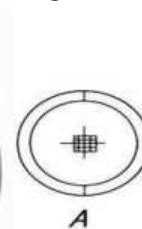
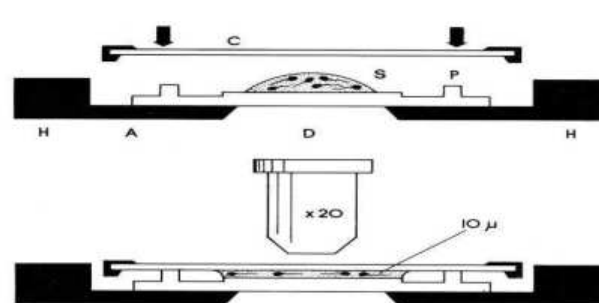


Sperm sayımı

- Dilusyondan sonra örnek kibarca karıştırılır ve 0.5 dereceli pipetle çekilir, çembere yerleştirilir, 4 karedeki sperm sayılır
- $\text{Sperm/ml} = \frac{4 \text{ karedeki sperm} \times 10 \times 20 \times 100}{4}$

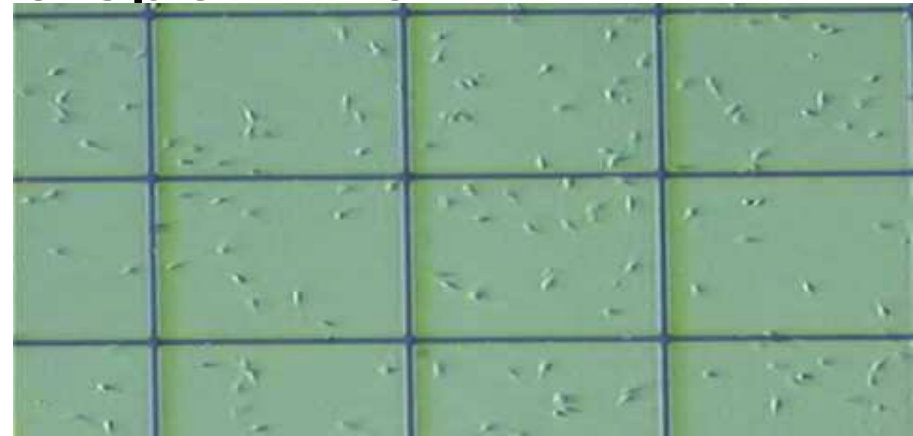
4

- Hesaplama beyaz küre sayımı ile aynıdır



Mikroskopik inceleme

- Büyük büyütmede 5-10 alan sayılıp 1 milyonla çarpılır.
- Sperm yokluğu azoospermia
- oligospermia:10-20 sperm tek büyütme alanında
- Normal yoğunluk 30-40 sperm tek büyütme alanında



Mikroskopik inceleme

- Sellüler elementler:genitoüriner sistem kaynaklı poligonal epitel hücreleri, spermatogenik yuvarlak hücreler ve lökositlerdir
- Peroksidaz ile nötrofiller maviye boyanır

Mikroskopik inceleme

- Aglutinasyon motil spermin diğetine yapışmasıdır
- İmmotil spermlerin birbirine yapışması veya motil spermlerin mükoz iplikler yapması ‘agregasyondur’
- Aglutinasyon immunolojik erkek infertilitesi yani antisperm antikoru araştırılması

Mikroskopik inceleme

- Motilite fertilizasyon ve konsepsiyonun en önemli belirleyicisidir
 - Hızlı-linear progresif
 - Yavaş-linear progresif
 - Nonprogresif
 - İmmotil
- Çoklu fotoğraf çekimli makler, lazer-doppler spektroskopi (Lazymot)

Mikroskopik inceleme

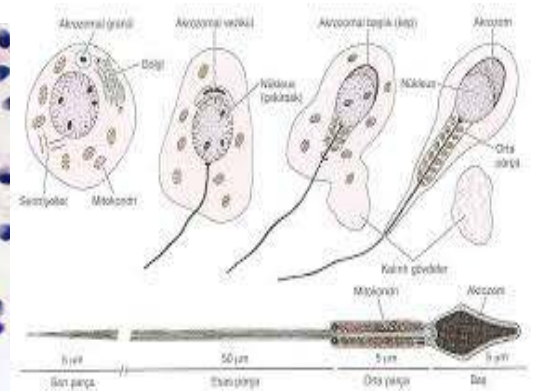
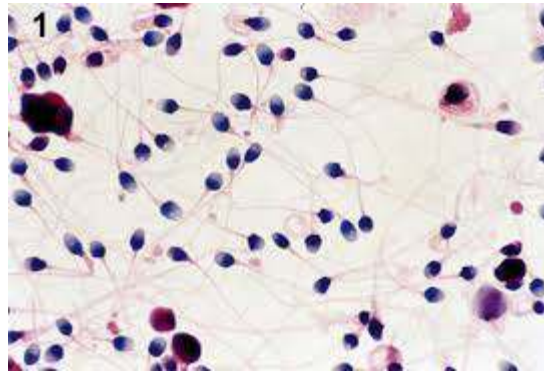
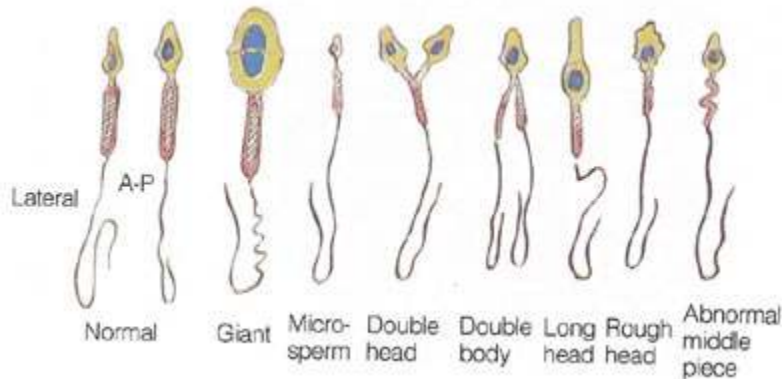
- CASA : sperm kinematik, sperm hareket karakterlerinin kantitatif ölçümü
- Düz hat, eğrisel hareket, lateral yerdeğiştirme vb
- **Maliyet** (faz kontrast mikroskop, video kamera, kayıt cihazı, monitor, kompüter, yazdırıcı) **ve laboratuara ek yük**
- Sperm azsa sayım-yorum zor
- Sperm fazlaysa-aglütinasyona- sayım-yorum zor

Spermatozoal yoğunluk

- Normo 15-250 milyon/ml
- Oligospermia <15milyon/ml
- Polizoospermia >250 milyon/ml

Mikroskopik inceleme

- Morfoloji normal ile anormal-Kruger Strict -Boyanmış spesmen; Papanicolaou, Giemsa, Bryan Leishman, Shorr Boyama
- -Faz kontrast mikroskop (baş uzunluk 5-6 μ m/çap 2.5-3.5 μ m, akrpzm başın %40-70, orta-kısım yuvarlak, <1 μ m genişlik, > %50 baş, kuyruk düz, uzunluk 45 μ m)
- ‘Most consistent prediction’



Vitality

- Canlı sperm oranını yansıtır
- Semende Eosin Nigrosin ile kırmızıya boyananlar ölü, beyazlar canlı spermelerdir
- Motilite değerlendirmesinin sağlamasıdır
- Fertil erkekte $\geq\%60$ vital
- subfertil erkek $\%40-60$
- İnfertil erkek $\leq\%40$

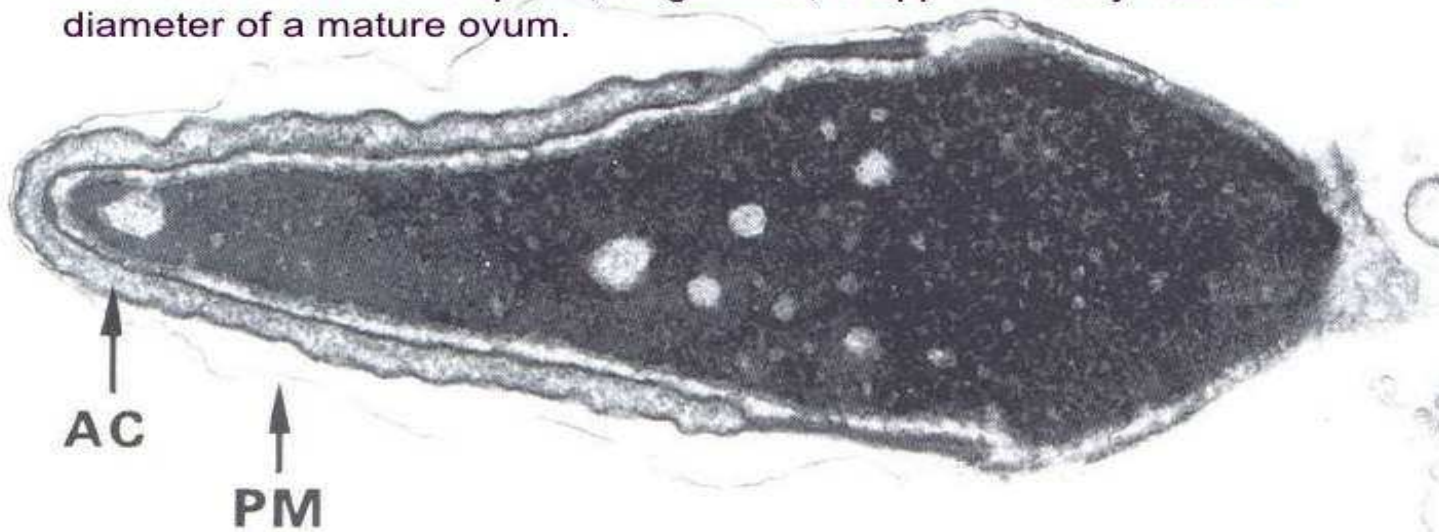
Sperm Fonksiyon testleri

- Rutin sperm analizi spermin fertilizasyon kapasitesini göstermez
- 4 test
 - Hipoozmotik şişme testi
 - Akrozom bütünlük testi
 - Nükleer kromatin dekonsansasyon testi
 - Mitokondriyal aktivite indeksi

Sperm Fonksiyon testleri

The Sperm Head

The head of a mature sperm, lengthwise, is approximately 1/20 the diameter of a mature ovum.



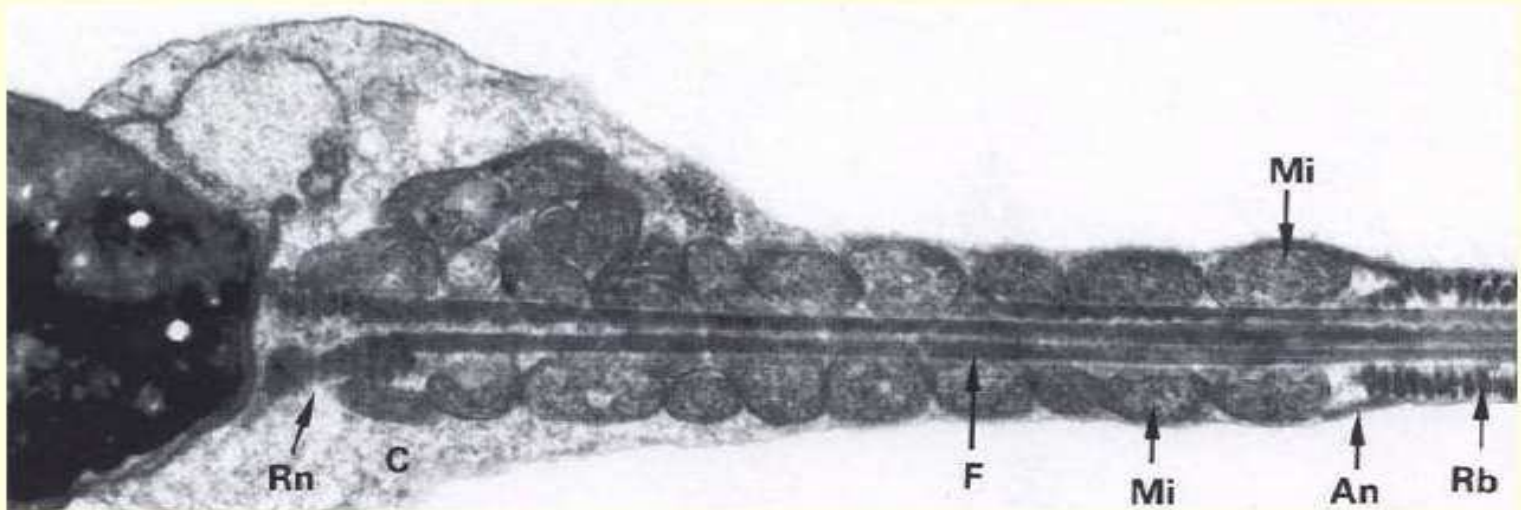
Head: EM, LS $\times 14\ 000$

AC = acrosome; PM = plasma membrane

From Wheater's Functional Histology, 4th ed., 2000.

Sperm Fonksiyon testleri

The Sperm Neck



Neck (middle piece and principal piece): EM, LS × 17 000

Mi = mitochondria; C = cytoplasm; F, Rn, Rb, & An = all parts of flagellum structure
From Wheater's Functional Histology, 4th ed., 2000.

Sperm Fonksiyon testleri

TEST	AMAÇ
Hipoozmotik şişme testi	Hipoozmotik solüsyona membran yanıtı (> %60-normal)
Akrozom bütünlük testi	Faz kontrast mikroskopta akrozomal bütünlüğü(> %70-normal)
Nükleer kromatin dekondeksasyon testi	Sperm nükleusunun dekondeksasyonu (> %50-normal)
Mitokondriyal aktivite indeksi	Tahmini mitokondriya içeriği

Sperm Fonksiyon testleri

- Zona-free hamster oosit penetrasyon testi, human zona pellucida bağlanma testi
- Teknik olarak zor ve özel laboratuvar ortamı
- Fertilitiyi arttırıcı etkisi saptanamadı
- Hemizona assay, fertilize olmayan oosit 2 ye bölünür fertil donör ve hasta spermin zonaya bağlanması 4 saat inkubasyon

İmmunolojik Testler

- Anti Sperm Antikor testi(elisa) sperm antijen tespiti- IgG ve A antiserum
- Mixt agglutinasyon reaction

Swim-up vs gradient

- Hazırlanma süresi 1 saat / 20 dk
- ↑ Motil sperm: gradient
- ↑ Progresif motil: Swim up
- ↑ Normal morfoloji: Swim up
- ICSI fertilizasyon oranları benzer
- Konvansiyonel IVF: Gradient güvenilir
- ICSI :swim up

Moleküler düzeyde anomaliler

- İntrasellüler oksidatif stres-spermde yüksek poliansatüre yağ asidi oranı
- Plazma membran fosfatidil gliserin eksternalizasyonu
- Mitokondriyal membran potansiyelinin hasarlanması
- Hasarlı kromatin(İlaç, çevresel toksin, sigara, alkol, artmış testiküler ısı, infeksiyon, varikosel, ileri yaş ve genetik)

DNA fragmantasyon

- Testlerin tanısal ve/veya prognostik değeri tartışmalı:
 - 1-Hasarın nedeni net ayırt edilememekte; intrinsik veya ekstrinsik
 - 2-DNA tek veya zincir kırığı
 - 3-Test yöntemi henüz net değildir

Defects in Sperm DNA Structure

Single-strand DNA break (ss-DB)
Double-strand DNA break (ds-DB)
Base deletion or modification
Inter or intra-strand cross linkage



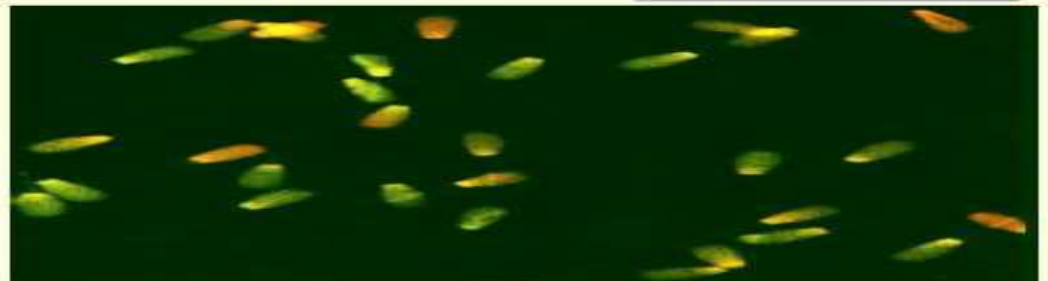
Esteves et al 2013; Alvarez and Gosálbez 2011; Ward 2011

DNA fragmantasyon

- Single-cell jel elektroforezi(COMET)
- Sperm kromatin strüktür analizi(SCSA) < %30-normal
- Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP(TUNEL) <%20-normal
- Sperm kromatin dekonsasyon(SCD)

Sperm Chromatin Structure AssaySCSA

SCSA/SDFA test is a good predictor, relative to other sperm measures, for the clinical diagnosis of male infertility



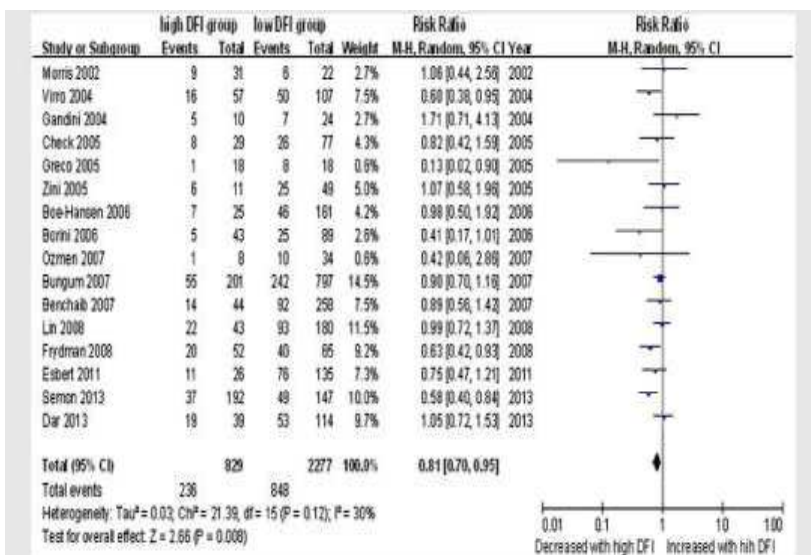
Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis

Jing Zhao, M.D., Qiong Zhang, M.D., Yonggang Wang, M.D., and Yanping Li, M.D.

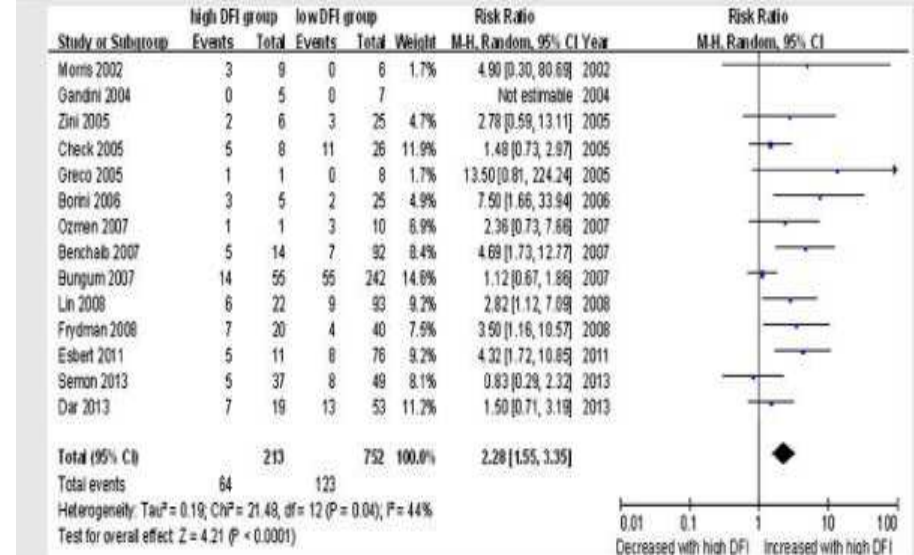
Gebelik (RR 0.81; 95% CI 0.70–0.95; P:008)

Abortus (RR 2.28; 95% CI 1.55–3.35; P<.0001)

Metaanaliz handikapları:Farklı çalışma karakterleri, farklı DNA hasar test ölçümleri, farklı tedaviler (IVF/ICSI/IUI), farklı DNA test eşik değerleri, net olmayan çalışmaya dahil olma ve dışlanma kriterleri ve gebelik kaybı tanımları



Forest plot showing the results of meta-analysis of studies comparing the effect of high sperm DNA damage and low sperm DNA damage on pregnancy after IVF/ICSI.



Forest plot showing the results of meta-analysis of studies comparing the effect of high sperm DNA damage and low sperm DNA damage on miscarriage after IVF/ICSI.

Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm

Sandro C. Esteves, M.D., Ph.D.,^a Fernando Sánchez-Martín, M.D.,^b Pascual Sánchez-Martín, M.D.,^b Danielle T. Schneider, M.Sc.,^a and Jaime Gosálvez, Ph.D.^c

Clinical pregnancy, miscarriage, and live birth in TESTI-ICSI and EJA-ICSI cohorts.

Variable	TESTI-ICSI (n = 77) ^a	EJA-ICSI (n = 87) ^a	Pvalue	Relative risk (95% CI)
Embryos				
Number, mean ± SD	7.0 ± 3.7	6.4 ± 3.7	.327	NA
High quality on day 3 (%), mean ± SD	45.2 ± 12.0	41.8 ± 14.1	.118	
No. transferred, mean ± SD	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.6	.206	
Clinical pregnancy, n (%)	40 (51.9)	35 (40.2)	.131	1.29 (0.92–1.80)
Miscarriage, n (%)	4 (10.0)	12 (34.3)	.012	0.29 (0.10–0.82)
Live birth, n (%)	36 (46.7)	23 (26.4)	.007	1.76 (1.15–2.70)

Note: NA = not applicable.

^a Among the enrolled patients (see Table 1), a total of eight fresh transfers were cancelled, including four in the TESTI-ICSI group and four in the EJA-ICSI group.

Esteves. TESTI-ICSI in men with high SDF. *Fertil Steril* 2015.

DNA fragmantasyon

- Antioksidan tedavi(selenyum, çinko vit C, E, koenzim Q10) yararlı, gebelik ve canlı doğumda artış

Showell MG, Cochrane 2014

- 2-3 ayda testlerde düzelme ancak sperm parametreleri değişmiyor
- Testiküler fonksiyonda düzelmeden ziyade Spermin fonksiyonel kapasitesinde düzelme

Sonuç

- Semen analizi erkek infertilitesinde günümüzde hala en önemli test olmaya devam ediyor
- Bununla beraber güncel formatı ile fertilitiyi öngörme amacıyla uygulanılmamalı
- Test fertilitiyi azaltmaya neden olan sorunları tespitinde kullanılabilir

Sonuç

- Motilite, morfoloji, DNA hasarı en önemli parametreler



29 EKİM

CUMHURİYET BAYRAMINIZ
KUTLU OLSUN

