



# BİRÜNİ

## LABORATUVARI

<http://www.biruni.com.tr> e-posta: [info@biruni.com.tr](mailto:info@biruni.com.tr)



## ERKEK İNFERTİLİTESİNDE KULLANILAN TESTLER

**Semen;** spermatozoonlar, testis ve epididim salgıları ile ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerin salgılarının bir araya gelmesi sonucu oluşur. Vizkositesi yüksek olan bu sıvı “*ejakülât*” olarak adlandırılır.

Semen analizi, spermatozoonların üzerinde yapılan değerlendirmeler ile semenin fiziksel ve kimyasal inceleme parametrelerini kapsamaktadır. Ejakülasyona uğramış spermatozoonların tümü üzerinde yapılan değerlendirmeler, fertilizasyon sahasına ulaşanların fertilizasyon kapasitesini tanımlamada yeterli değildir; ancak semen analizi bireyin klinik durumu hakkında genel bir bilgi verir.

Günümüzde çevresel faktörlerin, beslenmenin ve tarımda kullanılan insektisidlerin sperm üretimini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Vücutta biriken toksik kimyasallar, hava kirliliği, yakıtlardan atılan kurşun vb. toksik elementler sperm nükleusu ve DNA yapısını olumsuz biçimde etkileyerek, erkek infertilite oranında artışa yol açmaktadır. Bu da semen analizinde yeni testlerin geliştirilmesine, özellikle sperm fizyolojisine yönelik ve nükleus yapısını ilgilendiren testlerin rutine konmasına yardımcı olmuştur.

Semen analizi makroskopik ve mikroskopik inceleme, sperm vitalitesinin değerlendirilmesi, sperm konsantrasyonunun ölçülmesi ve antisperm antikorlarının incelenmesini içerir. Son yıllarda bunlara ilave olarak sperm fonksiyon ve kromatin testleri de güncel hale gelmiştir. Bunun dışında aksesuar genital organ fonksiyonunu değerlendirmek için çeşitli biyokimyasal parametrelerden faydalanılabilir. Prostat bezi ile ilgili olarak sitrik asit, çinko, gamma-glutamil

transpeptidaz ve asit fosfataz; seminal vezikül için fruktoz ve prostaglandinler ile epididim için serbest L-karnitin, gliserofosfokolin ve nötral alfa-glukozidaz tayinleri yapılabilir.

### **Antisperm Antikor (ASA) Testleri**

Semende antisperm antikorlarının varlığı spermatozoon'un fertilizasyon yeteneğini azaltır. Fizyolojik koşullarda kan testis bariyeri aracılığıyla sperm erkeğin immün sisteminden korunurlar, ancak bu bariyerdeki herhangi bir travma, infeksiyon veya obstrüksiyon antisperm antikorlarının yapımını indükler. Semende bulunan antikorlar immünglobulin A ve G sınıfındadır. IgA antikorlarının aksesuar bezlerden salındığı bilinmektedir. IgG antikorları ise genital kanallarda sentezlenir. Antisperm IgA ve IgG antikorları serum ve semende bulunurlar. IgM antikorları moleküler büyüklükleri fazla olduğu için semende nadiren bulunur. IgA antikorlarının klinik önemini IgG'lere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. ASA pozitifliğinde aglutinasyon, sitotoksik etki, spermin zona'ya bağlanmasında güçlükler gibi bozukluklar görülebilir. Antisperm antikor tayininde tarama testi niteliğinde **Immunobead (IBT) ve Mixed Antiglobulin Reaction (MAR)** testleri geliştirilmiştir.

### **Sperm Fonksiyon Testleri**

Spermin yumurtayı fertilize etmesinden gebelik oluşmasına kadar geçirilen aşamalar ve başarılı bir gebeliğin meydana gelmesi spermlerin fonksiyonunun normal olması ile mümkündür. Fonksiyonel olarak normal bir sperm “*iyi morfolojiye*

sahip, hızlı hareket yeteneği olan, membran geçirgenliği normal, akrozom reaksiyonunu yeterince gerçekleştiren, ovum zona pellusida'sını penetre edebilen ve kromatin'i ovum sitoplazması'nda iyi kondanse olan" sperm demektir. İdiopatik erkek infertilitesinin, toplam erkek infertilitesi olgularının yaklaşık olarak % 25'ini oluşturduğu düşünülürse, fertilizasyon belirteci olarak fonksiyon testlerinin kullanılmasının önemi daha iyi anlaşılabilir.

**Sperm fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla şu testler yapılabilir:**

➤ Sperm otoantikorları
➤ Postkoital test
➤ Hipo-ozmolar şişme testi (HOS)
➤ Akrozim tayini
➤ Akrozom reaksiyonu
➤ Hamster yumurta penetrasyon testi
➤ Hemizona bağlanma testi
➤ Servikal mukus penetrasyon testi
➤ Hyaluronik asit bağlanma testi (HBA)

### Hipo-ozmolar şişme testi (HOS)

Jeyendran ve arkadaşları tarafından spermilerin hipoozmotik ortama konulduğunda dış ortamdan hücre içine sıvı alması ve hücrenin şişmesi prensibine dayanılarak geliştirilen bir testtir. Normal membran yapısına sahip olan spermilerin hipoozmotik sıvıda su alarak şiştiği ve kıvrıldığı gözlenmiştir. Anormal HOS reaksiyonu veren spermilerin diğer fonksiyonlarının da bozulmuş olduğu saptanmıştır. Günümüzde hipoozmolar şişme testi bir sperm fonksiyon testi olmasının yanısıra, sperm canlılığının değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır. Testis biyopsilerinde veya hareketsiz sperm örnekleri ile ICSI (intracytoplasmic sperm injection) uygulamalarında HOS testi canlı sperm ayrımında kullanılmaktadır.

### Akrozom Reaksiyonu (AR)

Sperm akrozomu spermatogenez sırasında Golgi kompleksinin bir ürünü olarak gelişir. Akrozomun sperm fertilizasyon bölgesinde reaksiyon geçirecek enzim içeriğini aktif hale getirdiği ve cumulus oophorus hücrelerinin ürünü olan matriksi eriterek zona pellusida'ya bağlandığı bilinmektedir. Akrozom, başlıca hyaluronidaz ve akrozim enzimleri olmak üzere pek çok sayıda proteolitik enzim içermektedir. Normal akrozom reaksiyonunu başlatan olayın kalsiyumun içeri akışı olduğuna inanılmaktadır. Akrozom reaksiyonunu indükleyen başlıca ajanlar cumulus matriksi, zona pellusida glikoproteinleri, progesteron, foliküler sıvı, lizofosfatidilkolin, Ca-iyonofor A 23187 ve albümin olarak sayılabilir.

### Hemizona Bağlanma Testi (HZA)

Spermatozoon'un zona pellusida'ya bağlanması akrozom reaksiyonunun başlamasına, litik akrozom içeriğinin serbest kalmasına ve spermatozoon'un zona matriksi'ne penetrasyonuna sebep olur. HZA, sperm ovum zona pellusida'sına bağlanma yeteneğini araştırma amacı ile geliştirilen bir yöntemdir. Bu test için IVF ve ICSI uygulamasında fertilize olmayan oositler kullanılmaktadır. Test sonucunda sperm zona pellusida'ya bağlanma oranı hesaplanır. Hemizona indeksi %35 üzerinde ise normal kabul edilir.

### Sperm Penetrasyon Testi (SPA)

Sperm zona pellusida'sı giderilmiş hamster oositini delmesi prensibine dayanan bu test, IVF sonuçları ile çok yüksek korelasyon göstermektedir. Ancak hamster oositi bulunmasındaki teknik zorluklar testin yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir.

### Sperm Fonksiyonlarının Belirteçleri

FONKSİYON	UYGULANAN TEST
Servikal mukus penetrasyonu	Postkoital test Tru Trax, Penetrax
Kapasitasyon	IVF, SPA, Mannose receptor assay
Akrozom reaksiyonu	IVF, SPA, AR testi
Zona pellusida bağlanması	IVF, HZA
Zona pellusida penetrasyonu	IVF
Oosit- Sperm füzyonu	IVF, SPA
Sperm kromatin dekonsansasyonu ve pronukleus füzyonu	Kromatin dekonsansasyon testi (SDS EDTA) Aniline Blue kromatin kondansasyonu testi DNA denaturasyonu testi (Acridine Orange) DNA fragmentasyon testleri (COMET, TUNEL)

## Sperm Kromatin Testleri

Semen analizi erkek infertilitesinin teşhisinde kullanılan temel bir yöntem olmasına karşın, artık standart sperm konsantrasyonu ile sperm motilitesi ve morfoloji ölçümlerinin yeterli olmadığı görülmüştür. Sperm nükleus matüritesi, DNA fragmentasyonu ve denaturasyonu fertilitiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Sperm kromatin anomalileri ve DNA hasarları spermatogenez sırasında veya sonrasında meydana gelebilir. Bu konuda geliştirilmiş üç ayrı hipotez vardır. Bunlar sırasıyla defektif sperm kromatin paketlenmesi, apoptosis ve oksidatif stres olarak özetlenebilir. Lökospermi veya varikosel olgularında sperm DNA hasarlarının ortaya çıktığı bilinmekle birlikte, semen parametreleri normal olan olgularda görülen fertilizasyon yetersizlikleri araştırmacılara sperm DNA incelemeleri için yeni bir yaklaşım getirmiştir.

### Sperm Kromatin Dekondansasyonu Testi (SDS-EDTA)

Fertilizasyon sonrası spermin kromatini çözülür, sonra da erkek pronükleus oluşumu gözlenir. Bu test spermlerin kromatinlerinin şişme ve çözülebilme yeteneğini araştırmaktadır.

## Aniline Blue Testi

Spermatogenezde, spermler morfolojik değişime uğrarken nükleer protein yapısını da değiştirirler. DNA histonları protaminlerle yer değiştirerek, epididimal pasajda protaminler arasında disülfid bağları oluşmakta ve kromatin yapısı stabilize hale gelmektedir, böylece matürasyonunu tamamlamış spermlerin gelişimi sağlanır. Sperm kromatin yapısının normal oluşu başarılı bir fertilizasyon prosesini sağlamaktadır. Sperm nükleuslarında histonların bulunuşu immatürite kriteridir ve Aniline Blue Testi immatür spermleri işaretleyerek (histon pozitif) spermiohistogenezdeki hataları belirlemektedir.

### Sperm Kromatin Strüktür Assay (SCSA)

Bu test sperm kromatininin aside veya sıcaklığa maruz kaldığı durumdaki dayanıklılığını ölçmektedir. Yeşil floresan normal DNA yapısını, kırmızı floresan ise denature DNA yapısını göstermektedir.

Sperm Kromatin Anomalilerinin Araştırılmasında Kullanılan Testler

TEST	PARAMETRE
Acidic Aniline Blue	Nükleer matürite (DNA protein içeriği)
Toluidine Blue	DNA fragmentasyonu
Kromomisin A3	Nükleer matürite (DNA protein içeriği)
Sperm Kromatin Dispersiyon Testi	DNA fragmentasyonu
DNA Kırılımı Tayini (FISH)	DNA fragmentasyonu (ss DNA)
In Situ Nick Translation	DNA fragmentasyonu (ss DNA)
Acridine Orange	DNA denaturasyonu (asit)
TUNEL	DNA fragmentasyonu
COMET	DNA fragmentasyonu(ds DNA)
Sperm Kromatin Strüktür	DNA denaturasyon (asit/sıcak)
8-OHdG ölçümü	8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanosin)

Laboratuvarımızda intrauterin inseminasyon uygulamalarında kullanılmak üzere tek ve iki tabakalı dansite gradient yöntemi uygulanarak sperm hazırlanmasına başlanmıştır. Laboratuvarımızda semen değerlendirmesinde direkt ve indirekt IBT (immunobead) yöntemi ile ASA tayini, sperm fonksiyonlarının araştırılması amacıyla yapılan HOS, Eozin canlılık, Ca-iyonofor indüklenmiş akrozom reaksiyonu, semende ROS tayini ile sperm penetrasyon testleri rutin olarak uygulanmaktadır. Ayrıca sperm kromatin yapısının incelenmesi amacıyla Toluidine Blue DNA fragmentasyon ve Aniline Blue sperm immatürite testleri ile Acridine Orange, SDS-EDTA kromatin dekondeksasyon testi yapılmaktadır. Yakında SCSA testinin rutin olarak uygulanmasına başlanılacaktır.

## Kaynaklar

1. Siegel MS. *The Male Infertility Investigation and the Role of the Andrology Laboratory*. J Rep. Med. 1993; 38(5): 313-334.
2. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Cervical Mucus Interaction. 1999. 4th Edition, Cambridge Univ. Press.
3. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives*. (I, II) 2004. Ed. Gardner DK, Weissman Ariel, Howles CM, Shoham Q. Taylor&Francis Co.
4. Lipshultz LI, Howards SS. *Infertility in the Male*. 1997, Mosby INC.
5. Siebel MM, Zilberstein M. *The Diagnosis of Male Infertility by Semen Quality*. Hum. Rep. 1995; 10(2): 247-252.
5. *Manual on Basic Semen Analysis*. 2002 ESHRE, NAFA, SIGA.
6. Blerkoom VJ, Gregory L. *Essential IVF: Basic Research and Clinical Applications*, 2004 Acad. Publishers.
7. Evanson DP, Jost LK, Marshall D, et al. *Utility of the Sperm Chromatine Structure Assay as a Diagnostic and Prognostic Tool in Human Fertility Clinic*. Hum. Rep. 1999; 14: 1039-1049.
8. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, et al. *The Effect of Chromatine Condensation (aniline blue staining) and Morphology (strict criteria) of Human Spermatozoa on Fertilization, Cleavage and Pregnancy Rates in an ICSI Programme*. Hum. Rep. 1996; 71: 2468-2471.
9. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, et al. *The Relationship Between Acridine Orange Floresance of Sperm Nuclei and the Fertilization Ability of Human Sperm*. Fertil. Steril. 1996; 66: 634-639.

### **MECİDİYEKÖY**

Büyükdere Caddesi,  
Gökfiliz İşhanı, Kat: 3  
34387 Mecidiyeköy - İstanbul  
Tel. : 217 41 41  
Faks : 217 41 10

### **KADIKÖY**

Cemil Topuzlu Cad. Fazilet Sitesi  
No: 44/1 D: 2 34726  
Çiftelhavuzlar - Kadıköy - İstanbul  
Tel. : 369 17 67  
Faks : 369 01 61

### **BAKIRKÖY**

İncirli Caddesi, Santral Çıkmazı,  
Toprak Blokları A Blok 1-2  
34147 Bakırköy - İstanbul  
Tel. : 570 88 60  
Faks : 570 93 00

### **ETİLER**

Tepecik Yolu, Tepe Apt.  
No: 3 D: 2  
34337 Etiler - İstanbul  
Tel. : 352 02 95  
Faks : 352 02 98

### **NIŞANTAŞI**

Valikonağı Caddesi,  
Çam Apt. No: 161 D: 10  
34363 Nişantaşı - İstanbul  
Tel. : 233 22 95  
Faks : 233 38 42

### **ULUS**

Etiler Adnan Saygun Cad.  
Uydu Sok. Gündeş Apt. No: 2/B  
34340 Ulus - İstanbul  
Tel. : 287 43 00  
Faks : 287 33 83

### **ERENKÖY**

Şemsettin Günaltay Cad.  
Manolya Apt. No: 214/1  
34738 Erenköy - İstanbul  
Tel. : 411 31 66  
Faks: 411 20 61