

# Asthenozoospermia olgularında sperm morfolojisi değerlendirilmede Spermac ve Diff-quick boya yöntemlerinin karşılaştırılması

Elvan Ok (\*), Doğan Özyurt (\*\*), Bülent Gülekli (\*\*\*)

## Özet

Sperm hareket bozuklukları (asthenozoospermia) erkek infertilitesi nedenleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Asthenozoospermia olgularında hareket bozukluğuna sperm morfolojisi bozuklukları eklendiğinde infertilitenin daha da arttığı saptanmıştır. Bu çalışmada 15 Kasım 2004 ile 5 Nisan 2005 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran toplam 65 erkek (sperm motilite bozukluğu olan 21 erkek ile motilite bozukluğu olmayan 44 erkek) çalışma kapsamına alındı. Tüm semen örneklerine sperm morfolojisi bakısında Spermac ve Diff-quick boya yöntemleri uygulandı. İncelenen 55 semen örneğinde test sonuçları her iki boyada da uyumluluk gösterdi. Test sonuçları uyumlu olan 32 semen örneğinde sperm morfolojisi her iki testte de normal bulunurken, 23 olguda morfoloji yüzdesi düşük bulundu. Geri kalan 10 olgunun ise 7'sinde sperm morfolojileri Diff-quick boya ile normal yüzdede bulunurken, Spermac boya ile anormal bir yüzde saptandı. Üç örnekte ise Spermac boya ile sperm morfolojisi normal sınırlarda gözlenirken, Diff-quick boya ile anormal sperm morfolojisine rastlandı. Yapılan Mc Nemar istatistiksel değerlendirmede her iki boya yönteminin de güvenilir olduğu saptandı. Sperm morfolojisi bakışı için kullanılan iki testin birbirine olan üstünlüğünün saptanmaması nedeniyle, bu testlerden ekonomik olanının seçilerek maliyetin düşürülmesi sağlanabilir.

\* Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD

\*\* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, İzmir

\*\*\* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi, İzmir

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 99.3456.23 sayılı ile desteklenmiştir

**Ayrı basım isteği:** Dr. Elvan Ok, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Kozlu, Zonguldak  
E-mail: elvanok@karaelmas.edu.tr

**Makalenin geliş tarihi:** 04.07.2007

**Kabul tarihi:** 28.02.2008

**Anahtar kelimeler:** Asthenozoospermia, Diff-quick, Spermac, sperm morfolojisi

## Summary

**Comparison of Spermac and Diff-quick staining methods in the assessment of sperm morphology in asthenozoospermia cases**

Sperm motility problems (Asthenozoospermia) is one of the major causes of male infertility. In cases with asthenozoospermia infertility increases to a greater extent when sperm morphology disorders are added to coexisting motility disorders. A total of 65 males (21 males with sperm motility disorder and 44 males without this disorder) who referred to the in vitro fertilization unit of Dokuz Eylul University Medical School between November 15, 2004 and April 5, 2005 were included in the present study. Spermac and Diff-quick staining methods were used in the assessment of sperm morphology in all semen samples. Test results showed consistency with both staining methods on 55 semen samples examined. Sperm morphology was normal in 32 semen samples with consistent test results by both methods, while the percentage of morphology was low in 23 cases. In 7 of remaining 10 cases, the sperm morphology was in the normal range with Diff-quick staining method while an abnormal percentage was detected with Spermac method. In 3 cases the sperm morphology was within normal limits with Spermac staining method while Diff-quick staining method demonstrated abnormal sperm morphology. Statistical analysis with Mc Nemar test demonstrated that both staining methods were reliable. Since neither of the two methods used in the evaluation of sperm morphology has proven superiority to the other, a cost reduction may be provided by choosing the economical one.

**Key words:** Asthenozoospermia, Diff-quick, Spermac, sperm morphology

## Giriş

Günümüzde yardımcı üreme tekniklerinin hızlı bir gelişme göstermesi ile infertilite nedenleri daha fazla araştırılmaya başlanmıştır. Eskiden sadece kadın odaklı

olduğu düşünölen infertilite nedenlerinin son çalışmalarda yaridan fazla oranda erkek faktörüne bağı olduğu görölmüştür (1).

Erkek infertilitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda özellikle temel sperm parametrelerinin son derece önemli olduğu görölmektedir. Asthenozoopermia veya düşük sperm motilitesinin erkek infertilitesinde en sık neden olduğu bildirilmektedir (2).

Sperm morfolojisi de erkek infertilitesinde önemli yer tutmaktadır. Özellikle asthenozoopermia ile birlikte olan sperm morfoloji bozuklukları infertilitenin şiddetinin artmasına yol açmaktadır (2).

Sperm morfolojisinin infertilitede bu denli önem taşıması sperm morfoloji değerlendirmesini de doğru bir şekilde yapma gereğini doğurmaktadır. Morfoloji değerlendirmesi Kruger ve "World Health Organization" (WHO) kriterlerine göre yapılmaktadır. Son yıllarda Kruger kriterlerinin infertil hastanın tanı ve tedavisini değerlendirirken daha anlamlı bilgiler verdiği kabul edilmektedir (3-5).

Tüp bebek merkezlerinde sperm morfoloji boyası için rutinde kullanılan iki boya bulunmaktadır: Diff-quick ve Spermac boyaları. Bu çalışmada bu iki boya yönteminin sonuçları karşılaştırılarak, sperm morfolojisini göstermede boyaların birbirine üstünlüğü olup olmadığının gözlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

*Olgular:* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezi'ne 15 Kasım 2004 ile 5 Nisan 2005 tarihleri arasında başvuran toplam 65 olgu (sperm motilite bozukluğu olan 21 olgu ile motilite bozukluğu olmayan 44 olgu) çalışma kapsamına alındı.

Kontrol grubunun yaş ortalaması 34.4 yıl ve yaş aralığı 24-45 yıl idi. Motilite bozukluğu olan grubun ise yaş ortalaması 34.6 yıl ve yaş aralığı 24-52 yıl idi. Olguların infertilite süreleri ise 24 aydı.

*Semen analizi:* Semen örnekleri mastürbasyon yöntemi ile 4 günlük ideal cinsel perhiz sonrası elde edildi. Mastürbasyonla elde edilen semen örneği steril ve geniş ağızlı bir kaptan toplandı.

Semenin likefaksiyonu için 30 dakika beklendi. Tüm olgulara makroskopik değerlendirme yapıldıktan sonra mikroskopik değerlendirme ile sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi değerlendirildi. Mikroskopik değerlendirme faz kontrast mikroskobu ile yapıldı.

Sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdelerinin belirlenmesi için Makler Sayım Kamerası kullanıldı.

Semen örnekleri 37 °C'de bekletildi ve motilite değerlendirmesi ejakülyasyondan sonra 1 saat içinde oda

sıcaklığında yapıldı. Sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdesi WHO kriterlerine göre belirlendi. Her semen örneğinde 200 sperm sayıldı. Her bir sperm motilitesi 4 kategoride skorlandı: a) Hızlı ileri hareketli b) Yavaş ileri hareketli c) Yerinde hareketli d) Hareketsiz (immotil).

Mikroskop alanını lineer motilite ile geçen sperm ileri hareketli olarak değerlendirildi. Lineer motilitesi olmayan spermle, lineer motilitesi olan spermle toplam yüzdesi ise toplam hareketlilik olarak belirlendi. Ejakülyasyondan sonra 60 dakika içinde %50 ve daha fazla ileri motilitesi (hızlı ileri hareketli+yavaş ileri hareketli) veya %25'den fazla hızlı ileri motilitesi olan örnekler sperm hareketliliği açısından normal kabul edildi.

Sperm morfolojisi bakısında Diff-quick (Diff-Quick®), Allegiance Healthcare Corp., USA) ve Spermac boyaları (Stain Interprise, Willington) kullanıldı. Toplam 65 olgunun semen örnekleri her iki boya yöntemi ile boyandı.

Değerlendirme 1000X büyütmede yapıldı. Boyanan her örnekte 200 sperm sayıldı ve Kruger kriterlerine göre değerlendirme yapıldı. Yüzde 5'in üzerinde normal formu olan semen örnekleri morfolojik açıdan normal kabul edildi.

Kruger kriterlerine göre bir sperm normal olarak değerlendirilebilmesi için sperm 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 orta kısmın genişliği 1 µm'den az, boyu baş uzunluğunun 1.5 katı olmalıdır. Kuyruk ise düz ve kıvrılmamış olmalıdır. Kuyruğun yaklaşık uzunluğu 45 µm olmalıdır. Kruger kriterlerine göre bu sınırlamaların dışındaki tüm değerler anormal kabul edilmektedir (6,7).

Diff-quick boyama yöntemi ile toplam orta parça anomali yüzdesi ortalaması ve toplam kuyruk defekti yüzdesi ortalaması hesaplandı. Bu ortalama hesaplanırken hareketliliği düşük olan ve sperm parametreleri normal olan grubun toplam orta parça ve kuyruk anomali yüzdesi toplamı ayrı ayrı hesaplanarak örnek sayısına bölündü.

*Diff-quick boya:* Diff-quick boya kiti, 1 adet fiksatif ile 2 adet boyadan oluşmaktadır. Boyalardan biri eosin, diğeri ise azure solüsyonu içermektedir.

*Diff-quick boyama prosedürü:* Yaymalar önce Diff-quick fiksatifinde fikse edildi. Daha sonra sırayla solüsyon 1 ve 2'de 5'er saniye bekletilerek boyandı. Üçüncü adım sonrası lamlar deiyonize su ile yıkandı ve böylelikle fazla boya uzaklaştırıldı. En son lamlar kapatıcı ile kapatıldı (6,7).

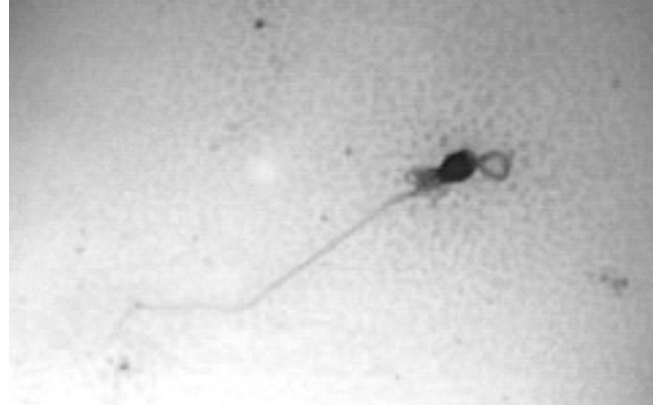
**Spermac boya:** Spermac boya kiti, 1 adet fiksatif ile 2 adet boyadan oluşmaktadır.

**Spermac boyama prosedürü:** 1 damla semen lama yayıldı. Lam fiksatifte kondu ve fiksatifte 5 dakika bekletildi. Sonra preparat bir saat kadar havada kurutmaya bırakıldı. Bir kap içinde bulunan distile suya 7 kez daldırılarak yıkandı. Fazlası kurutma kâğıdı ile alındı ve biraz kuruması beklendi. Kuruyan preparatlar sırasıyla A boyasında 2 dakika, B ve C boyalarında ise birer dakika tutuldu ve her boyadan sonra distile suya daldırılarak yıkandı. Preparatlar havada kurumaya bırakıldı ve 100 büyütmede immersiyon yağı ile incelendi (7).

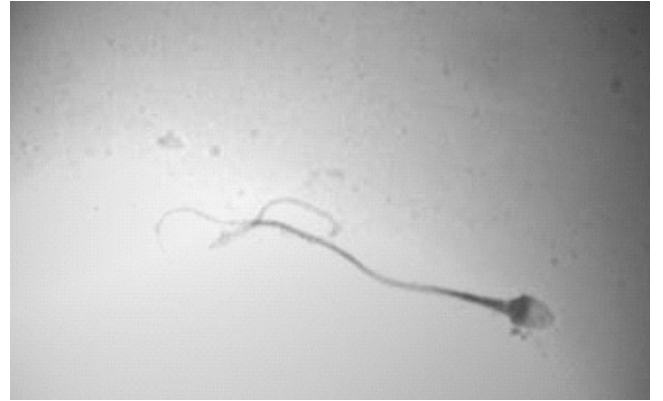
Sonuçların Mc Nemar testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmesinde (8) anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p=0.09$ ).

### Bulgular

İncelenen 55 örnekte Diff-quick ve Spermac boyalarının test sonuçları paralellik gösterdi. Test sonuçları paralellik gösteren 32 olguda sperm morfolojisi her iki testte de normal bulunurken, 23 olguda morfoloji yüzdesi düşük bulundu (Tablo I). Geri kalan 10 olgunun ise 7'sinde sperm morfolojileri Diff-quick boya ile normal yüzdede bulunurken, Spermac boya ile anormal bir yüzde saptandı. Üç olguda ise Spermac boya ile sperm morfolojisi normal sınırlarda gözlenirken, Diff-quick boya ile anormal sperm morfolojisine rastlandı (Şekil 1 ve Şekil 2).



**Şekil 1.** Bir asthenozoospermia olgusunda baş, orta parça, kuyruk anomali gözlenen sperm (Diff-quick boyası, X1000)



**Şekil 2.** Bir normozoospermia olgusunda normal morfolojide bir sperm (Spermac boyası, X1000)

**Tablo I.** Diff-quick ve Spermac boya yöntemleri ile sperm morfolojisi bakılan semen örneklerinde, normal ve anormal sperm morfolojisi saptanan örneklerin sayı ve yüzdeleri

Boyama yöntemi	Sperm morfolojisi bakılan semen örneği						
	Normal		Anormal		Toplam		
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Her iki boyama yöntemi ile paralel sonuç alınanlar	Diff-quick	32	58.19	23	41.81	55	100
	Spermac	32	58.19	23	41.81	55	100
Sonuçların uyumsuz olduğu olgular	Diff-quick	7	70	3	30	10	100
	Spermac	3	30	7	70	10	100

Yapılan istatistiksel değerlendirmede her iki testin de güvenilir olduğu saptandı.

Sperm hareketliliği normal olan 44 olgu ile sperm hareketliliği düşük olan 21 olguda sperm morfolojisi bakılırken, Diff-quick boyama yöntemi ile toplam orta parça anomali yüzdesi hesaplandı. Toplam orta parça defekti yüzdesi ortalaması, hareketliliği düşük olan olgularda kontrol grubuna göre iki kat daha yüksek oranda bulunurken (%9 ve %18), toplam kuyruk defekti yüzdesi ortalaması 0.6 kat daha yüksek bulundu (%21.3 ve %34.8).

### Tartışma

Günümüzde yardımcı üreme tekniklerinin yaygınlaşması ile infertilite nedenleri daha çok araştırılmakta ve fertilizasyonda önemli rolü olan sperm morfolojisi birçok çalışmada yer almaktadır.

Sperm morfolojisi bozuklukları ile sperm motilitesi arasında anlamlı ve yakın ilişki olduğunu vurgulayan bir çalışmada morfolojik bozukluğun lokalizasyonunun motiliteyi etkileyebileceği gösterilmiştir (9).

Üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde sperm morfoloji bakışı için genellikle hızlı boyama teknikleri kul-

lanılmaktadır. Bunlardan özellikle Diff-quick ve Spermac boyaları sık kullanılan boyalardır. Çok hastası olan merkezlerde testlerin hem hızlı sonuç vermesi, hem de güvenilir olması büyük önem taşımaktadır.

Günümüzde sperm morfoloji değerlendirmesini standart hale getirmek ve optimum doğruluğu sağlamak için genellikle katı Kruger kriterleri kullanılmaktadır. Normal morfoloji yüzdesini hesaplamada likefiye semen spermatozoaya kaynağını oluşturmaktadır (10). Kruger ve ark. 1987 yılında çift kör yöntemi ile 2 teknisyen tarafından 20'şer semen örneğinin morfolojik değerlendirme sonuçlarını incelemişler ve Papanicolaou boyası ile Diff-quick boyama sonuçları arasında anlamlı bir farklılık görmemişlerdir (11).

Literatürde yapılan bir başka çalışmada semen örneğinin yıkanmasından önce ve sonrasında 2 boya arasında mükemmel bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (12). Ancak bu çalışma 20 semen örneği üzerinde yapılmıştır. Bizim çalışmamız ise 65 örnek üzerinde çalışılmıştır ve sonuçlarımız bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Graves ve ark.nın 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada laboratuvarında çalışanların yapmış oldukları sperm morfoloji bakışı değerlendirilmiş ve %7.3'den %15'e kadar değişen normal form yüzdeleri saptanmıştır (13). On ayrı laboratuvarın sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve canlılığını değerlendiren bir başka çalışmada ise motilite ve canlılık açısından teknisyen değerlendirmelerinde anlamlı farklılıklar saptanmıştır (14). Bu farklılık, testlerin farklı teknisyenlerce uygulanmasından kaynaklanmış olabilir. Çalışmamızda tüm uygulama aşamalarının ve özellikle de boyanmış preparatların değerlendirme aşamasının tek bir kişi tarafından (Dr. Elvan Ok) yapılmış olması sonuçları daha güvenilir kılmaktadır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde sperm orta parça uzunluğunun kontrol gruplarına göre asthenozoospermik olgularda belirgin olarak kısa olduğu (15), açıklanamayan asthenozoospermia olgularında yapılan bir başka çalışmada da periaksonemal anomalilerle aksonemal defektlerin sıkı ilişkide olduğu ve azalan motilitede aksonemal anomalilerin tek neden olmadığı gözlenmiştir (16). Çalışmamızda ise Diff-quick boya ile morfolojik bakı yapılırken toplam orta parça defekti yüzdesi ortalaması, hareketliği düşük olan olgularda kontrol grubuna göre iki kat daha yüksek oranda bulunurken (%9 ve %18), toplam kuyruk defekti yüzdesi ortalaması 0.6 kat daha yüksek bulundu (%21.3 ve %34.8). Basit ve noninvaziv bir yöntem olan semen analizi ile de asthenozoospermia olgularında mikroskopik olarak orta parça ve kuyruk defektlerinin fazla gözlenmesi bu olgu-

ların tanınmasını daha da önemli kılmaktadır.

Sonuç olarak sperm morfoloji bakışı için kullanılan 2 testin birbirine herhangi bir üstünlüğünün saptanmaması nedeniyle, bu testlerden ekonomik olanın seçilerek maliyetin düşürülmesi sağlanabilir.

### Teşekkür

Makalenin istatistiksel değerlendirilmesinde katkıda bulunan Illinois State Üniversitesinden Doç. Olcay Akman'a ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi çalışanlarına teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

1. Brugh VM 3rd, Matschke HM, Lipshultz LI. Male factor infertility. Evaluation and management. *Endocrinol Med Clin North Am* 2004; 88: 367-385.
2. Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl* 2003; 49: 343-349.
3. Enginsu ME, Dumuolin JCM, Pieters MHEC, et al. Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quick® staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1991; 6: 854-858.
4. Vazquez-Levin MH, Goldberg SI, Friedmann P, et al. Papanicolaou and Kruger assessment of sperm morphology: threshold and agreement. *Int J Androl* 1998; 21: 327-331.
5. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, et al. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum Reprod* 1996; 11: 139-146.
6. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination on Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999; 76: 4-33 .
7. <http://www.aksuvar.com/frameset.htm> (son erişim tarihi: 20 Mart 2008).
8. Conover WJ. Practical nonparametric statistics, 2nd ed. New York: Wiley, 1980.
9. Aydos K, Ünlü C, Demirel C. Relation of the morphological alterations of spermatozoa with motility. *J Turkish German Gynecol Assoc* 2000; 1: 5-8.
10. Barroso G, Mercan R, Ozgur K, et al. Intra- and inter-laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: impact of semen preparation, staining techniques and manual versus computerized analysis. *Hum Reprod* 1999; 14: 2036-2040.
11. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl* 1987; 18: 275-277.
12. Menkveld R., Lacquet FA, Kruger TF, et al. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia* 1997; 29: 1-7.
13. Graves JE, Higdon HL 3rd, Boone WR, et al. Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22: 219-225.
14. Auger J, Eustache F, Ducot B, et al. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 2000; 15: 2360-2368.
15. Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod* 1995; 10: 116-119.
16. Courtade M, Lagorce C, Bujan L, et al. Clinical characteristics and light and transmission microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1998; 70: 300-304.