

## SEMEN ANALİZİ VE YORUMLANMASI | INTERPRETATION OF SEMEN ANALYSIS

**Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Standart Semen Analizi**  
Standard Semen Analysis Criteria of World Health Organization

Ahmet Gökçe

Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

## Özet | Abstract

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) semen analizi için yayınladığı el kitabının beşinci baskısındaki bazı yeni görüşler vardır. Beşinci baskıda: Semen analizi bölümü, tüm prosedürlerin ayrıntılarını, hesaplamaları ve yorumları içermektedir. Sperm hazırlama bölümü genişletilmiş ve kriyoprezervasyonla ilgili yeni bir bölüm eklenmiştir. Semen dilüsyonu ve sperm sayımı ile ilgili yeni kriterler benimsenerek, örnekleme ve sayım hataları özellikle vurgulanmıştır. Semen volümünün doğru bir şekilde ölçülmesi şartıyla, testis fonksiyonunu sperm konsantrasyonu yerine total sperm sayısının daha doğru yansıttığı vurgulanmıştır. Yüzeysel olarak bakıldığında basit gibi görünen ancak pek çok faktörden etkilenen azospermi tanısında da yeni tavsiyelerde bulunulmuştur. Santrifüj edilmeden tespit edilen örneklerin direkt olarak incelenmesinin hassas bir tanı yöntemi olabileceği belirtilmiştir. Önceki baskıya göre en büyük değişiklik sperm motilitesinin sınıflandırılmasında yapılmıştır. Yeni baskıda sperm hücrelerinin a, b, c veya d yerine progresif hareketli, non-progresif hareketli ve hareketsiz şeklinde sınıflandırılmaları tavsiye edilmektedir. Bu el kitabındaki referans değerler son 12 ayda ya da daha kısa sürede eşi hamile kalan fertil erkeklerden elde edilen verilerden oluşturulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** İnfertilite, DSÖ kriterleri, semen analizi

There are some new aspects in the fifth edition of WHO laboratory manual on the examination and processing of human semen. In the fifth edition: the chapters on semen analysis include details of all procedures, calculations and interpretation. The section on sperm preparation has been expanded, and a new chapter on cryopreservation of spermatozoa has been added. The semen dilutions and the areas of the counting chamber used to assess the number of spermatozoa in a semen sample have been changed. The importance of sampling errors, and the certainty of the numerical results obtained are emphasized. Total sperm counts per ejaculate provides a more accurate assessment of testicular function than does sperm concentration, but for this semen volume has to be measured accurately. Although it is simple, the diagnosis of azoospermia is confounded by many factors and there are new recommendations about this subject. Recommended changes include examining fixed, uncentrifuged samples and indicating the sensitivity of the counting methods employed. A major change from previous editions is in the categorization of sperm motility. It is now recommended that spermatozoa should be categorized as progressively motile, non-progressively motile and immotile instead of grade a, b, c or d. Data characterizing the semen quality of fertile men, whose partners had a period to pregnancy of 12 months or less, provided the reference ranges for this manual.

**Key words:** Infertility, semen analysis, WHO criteria

Semen incelemelerinin standardizasyonuna duyulan ihtiyaç nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ilk kez 1980'den başlayarak 1987, 1992 ve 2002'de "İnsan semeni ve insan semeni servikal mukus etkileşimlerinin incelenmesi için laboratuvar el kitabını yayınlamıştır. Ancak androloji biliminin hızlı gelişimi ve semen analizlerinde standardizasyona verilen önem arttıkça şimdi yeni bir değerlendirme yapılarak beşinci baskı çıkartılmıştır.

Yapılan değişiklikler ışığında, DSÖ'nün yeni kriterlerine göre standart semen analizinin özeti bu yazının içeriğini oluşturmaktadır.(1)

Semen analizinin sonuçlarını etkileyebilecek bazı faktörler şu şekilde özetlenebilir:

- Ejakulatin toplanması: ejakulatin tamamının örnekleme kabına alınması önemlidir. (2)

- Aksesuar bezlerin aktivitesi: aksesuar bezlerin salgıları semeni dilue ettiklerinden sperm konsantrasyonunu etkileyebilmektedir. (3)
- Cinsel perhiz süresi: sperm hücreleri epididimde birikirler, üretra içine taşarlar ve idrarla atılırlar.(4,5) Epididimal fonksiyonlar bozulmadığı sürece sperm canlılığı ve kromatini cinsel perhiz süresinden etkilenmez.(5-7)
- Önceki ejakülasyonda epididimler tam olarak boşalmadıysa bu semen analizi sonuçlarını etkileyebilir ancak bunun ne kadar etkili olduğunu tespit etmek zordur.(4,8)
- Testis boyutları spermatogenetik aktiviteyi yansıtır ve morfolojiyi de etkiler.(9)

Aslında bu değişkenler ve büyük çoğunluğu da değiştirilemez olan faktörlerin varlığı semen kompozisyonundaki

birey içi farklılıkların da açıklamasıdır.(10, 11) Bu nedenle sadece bir semen analizi kişinin semen kalitesini değerlendirmek için yeterli değildir. Temel verileri elde edebilmek için iki veya üç örneğin incelenmesi yararlı olacaktır. Semen analizi kişilerin klinik durumları ile ilgili temel bilgileri edinmemizi sağlar. Semen analizi şu aşamalardan oluşur:

#### **İlk 5 dakika:**

- Alınan örneğin likefiye olması için inkübatöre (37°C) ya da tezgaha yerleştirilmesi.

#### **30-60 dakika arasında:**

- Semen görünümü ve likefaksiyonun değerlendirilmesi
- Semen hacminin ölçülmesi
- Semen pH'nın ölçümü
- Mikroskopik inceleme, sperm sayısı ve motilitesini değerlendirebilmek için dilüsyon ve ıslak preparatın hazırlanması
- Sperm canlılığının değerlendirilmesi (motil spermilerin oranı düşük ise)
- Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için semen yaymasının hazırlanması
- Sperm konsantrasyonunu değerlendirmek için semenin dilüsyonu
- Sperm sayısının değerlendirilmesi
- Gerek duyulursa MAR (mixed antiglobulin reaction) testinin yapılması
- Yuvarlak hücreler varsa peroksidaz pozitif hücrelerin değerlendirilmesi
- Immunobead testi için sperm hücrelerinin hazırlanması (gerek duyulursa)
- Semen santrifüje edilmesi (biyokimyasal belirteçler çalışılacaksa)

#### **Üç saat içinde:**

- Gerekliyorsa örneklerin mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmesi

#### **Dört saatten sonra:**

- Morfolojik değerlendirilme için preparat hazırlanması

#### **Aynı gün içinde daha sonraki dönemde (örnek dondurulmuşsa sonraki gün):**

- Aksesuar bez belirteçlerinin ölçülmesi (gerekirse)
- İndirekt immunobead testinin yapılması (gerekirse)

### **Örneğin Toplanması**

Analizle örnek alımı arasındaki zamanın kontrolü ve semenin sıcaklık farklılığına maruz kalmaması için örnek laboratuvar yakınında özel bir odada alınmalıdır. Örnek en az iki günlük cinsel perhiz sonrasında alınmalıdır ancak cinsel perhiz süresi yedi günü geçmemelidir. Ek analizler gerektiğinde sonuçların değişkenliğini azaltmak için cinsel

perhiz süreleri olabildiğince birbirine yakın olmalıdır. Kişiyi semen analizinin toplanması ile ilgili olarak yazılı ve sözlü bilgiler verilmelidir. Kişinin ismi, doğum tarihi, cinsel perhiz gün sayısı, örneğin alındığı tarih ve zaman, örnek toplama işleminin tamamlanan kısmı, örnek vermedeki zorluklar, alınma ve analiz arasında geçen süre raporuna kaydedilmelidir.

Örnek mastürbasyonla elde edilmelidir ve ejakülat temiz, geniş ağızlı, cam veya sperm için toksik olmayan plastik bir kap içine konmalıdır. Kişinin adı ya da numarası, örneğin alındığı tarih ve saat kapın üzerine yazılmalıdır. Semen likefiye olurken 37°C'de inkübatörde bekletilmelidir. Örneğin bir kısmı verilemediyse raporda belirtilmelidir. Bu durumda cinsel perhiz sonrasında ikinci bir örneğin alınması gerekecektir.

Örneğin mastürbasyonla elde edilememesi veya laboratuvarında yeterli altyapının olmaması gibi durumlarda evde verilebilir. Semen toplanması için özel kondomlar kullanılabilir. Lateks kondomlar kullanılmamalıdır. Kişiyi konuyla ilgili olarak ayrıntılı yazılı ve sözlü bilgi verilmeli, semenin tamamını toplaması gerektiği ve herhangi bir kayıp varsa bildirmesi gerektiği anlatılmalıdır. Kişi bir saat içinde örneği laboratuvara ulaştırmalıdır. Örnek laboratuvara getirilirken 20-37°C arasında tutulmalıdır. Rapora örneğin evde özel kondomla cinsel ilişki ile veya laboratuvar dışında toplandığı not edilmelidir. Koitus interruptus semen kaybı ihtimalinden dolayı örnek almak için uygun bir yöntem değildir.

Semen örnekleri içinde HIV, herpes simpleks ve hepatit virüsleri gibi biyolojik tehlikeler içerebilir. Semen kültürü yapılacaksa veya örnek biyolojik çalışmalar, intrauterin inseminasyon ya da IVF için kullanılacaksa, steril materyaller ve teknikler kullanılmalıdır.

### **İlk Makroskopik İnceleme**

Likefaksiyondan hemen sonra ya da ejakülasyondan sonraki 30 dakika ile bir saat içinde semenin gözlenmesi ile analize başlanmalıdır. Likefaksiyon genellikle ilk 15 dakika içinde görülmesine karşın normal semenin likefaksiyonu oda sıcaklığında 60 dakikada tamamlanır. Tam likefaksiyon 60 dakikada oluşmazsa bildirilmelidir. Likefaksiyon sırasında örneğin düzenli olarak karıştırılması homojen bir örnek elde edilmesine yardımcı olabilir. Nadiren likefaksiyon oluşmayarak semen değerlendirmesini zorlaştırır. Bu tür vakalarda mekanik karıştırma veya enzim ile çözme gerekebilir. Bu uygulamalar seminal plazma biyokimyasını, sperm motilitesini ve morfolojisini etkileyebileceklerinden dolayı raporda belirtilmelidir.

Likefaksiyondan sonra geniş ağızlı (yaklaşık 1.5 mm) plastik pipete örneği dikkatlice çekerek ve yerçekiminin etkisiyle damlamasını bekleyip damla ile pipet arasında oluşan ince ipliğin uzunluğu gözlenerek viskozitesi ölçülebilir. Normal bir örnek pipeti küçük ayrı damlalar şeklinde terk eder. Anormal viskozitelerde bu uzunluk 2 cm'den daha

uzundur. Yüksek viskozite sperm motilitesini, konsantrasyonunu, sperm antikora kaplanmasını ve biyokimyasal ölçümleri etkileyebilir. Viskoziteyi azaltma yöntemleri gecikmiş likefaksiyonda kullanılanla aynıdır.

Likefiye olmuş normal bir örnek homojen ve gri-opelasan bir görünüme sahiptir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse örnek daha az opak görünür. Renk, örneğin eritrosit varsa (hemospermi) kırmızı-kahverengi, hastanın sarılığı varsa veya bazı vitaminlerin ve ilaçların kullanımı ile sarı olabilir.

Ejakülata hacminin oluşumuna ağırlıklı olarak seminal vezikül, prostat salgıları, az bir oranda bulboüretal bezler ve epididim katkıda bulunur. Total sperm hücresi ve sperm olmayan hücrelerin sayısının hesaplanmasında kullanılacağı için hacmin hassas bir şekilde ölçülmesi gerekir. Hacim en iyi şekilde örneğin içine verildiği kabın ağırlığı tartılarak ölçülebilir. Dansite 1gr/ml olarak varsayılır. Hacmin 0.3-0.9 ml daha düşük hesaplanmasına neden olabileceğinden, örneğin pipete veya enjektöre çekilmesi veya ölçme silindirene boşaltılması tavsiye edilmemektedir.(12-15) Semen hacmi için en düşük referans değeri 1.5 ml'dir (Tablo 1).

Düşük semen hacimleri, ejakülatuar kanal obstrüksiyonu veya seminal vazikül gelişiminin yetersiz olduğu konjenital bilateral vas deferens agenezisinin karakteristiğidir.(16-19) Hacmin düşük olması aynı zamanda örnek toplama problemi, parsiyel retrograd ejakülasyon ve androjen eksikliğini de gösterebilir. Yüksek semen volümleri aksesuar bezlerin aktif inflamasyonunda gözlenen aktif eksudasyonun bir yansıması olabilir.

Semen pH'sı esas olarak alkali özellikteki seminal vezikül sekresyonu ile asidik prostatik sekresyon olmak üzere

**Tablo 1. Semen analizi için en düşük referans değerler (5. persentil ve %95 güvenlik aralıkları).**

Parametreler	En düşük referans değer
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (106)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (106 / ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (106 per ml)	<1.0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	>20

aksesuar bezlerin sekresyonları arasındaki dengeyi yansıtır. pH likefaksiyondan sonra o laboratuvar için belirlenmiş standart bir zamanda, tercihen 30 dk içinde ölçülmelidir. Normal örnekler için aralığı 6.0 ile 10.0 arasında olan pH kağıdı kullanılmalıdır. Semen örneği iyice karıştırıldıktan sonra bir damla semen pH kağıdı üzerine eşit olarak yayılır, 30 saniyeden uzun olmamak koşulu renk değişimi beklenir ve kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılarak pH okunur. Semen pH'sı için alt referans değeri 7.2 olarak kabul edilmiştir. Düşük hacimli ve sperm sayısı az olan bir örnekte eğer pH 7.0'dan küçükse ejakülatuar kanal obstrüksiyonu veya seminal vezikül gelişiminin yetersiz olduğu konjenital bilateral vas deferens agenezisi akla gelmelidir.(16-19) Semen pH'sı doğal tamponlama azaldıkça zamanla artabilir. Bu nedenle yüksek pH değerleri klinik olarak az miktarda yararlı bilgi verir.

### İlk Mikroskopik İnceleme

Taze semen değerlendirmesi için faz-kontrast mikroskopisi önerilir. İlk mikroskopik değerlendirme sırasında konsantrasyon, motilite, mukus iplikleri formasyonu, sperm agregasyon ve aglütinasyonu ve spermden farklı hücresel elemanların değerlendirmesi yapılabilir. Örnek iyi karıştırılmıyorsa aynı örnekten yapılan iki ayrı inceleme arasında motilite, canlılık, konsantrasyon ve morfolojik olarak belirgin farklılıklar gözlenebilir. Geniş ağızlı plastik bir pipete 10 kez aspire edilmesi ile örnek karıştırılabilir. Spermelere hasar verebileceğinden dolayı yüksek hızlı karıştırıcılar kullanılmamalıdır. Semen hacmi ve lamel boyutlarının da standart olması gerekir. Böylece analizler her zaman derinliğin yaklaşık 20 µm'de sabit olduğu preparatlarla yapılmış olur. Derinliğin 20 µm'nin altında olması spermelerin rotasyonel hareketini zorlayabilir. On µl'lik hacimde semen lam üzerine konur. Üzeri lamelle kapatılır. Lam ile lamel arasında hava kabarcığı oluşturulmamalıdır. Hareketsiz spermelerin birbirleriyle, mukus iplikleriyle debris veya sperm olmayan hücrelere yapışması sonucu oluşan nonspesifik agregasyon gözlenirse kaydedilmelidir. Hareketli spermelerin birbirlerine baş-baş, kuyruk-kuyruk veya mikst şekilde yapışmalarına aglütinasyon denir ve bu izole form, orta, çok ve şiddetli olmak üzere derecelendirilebilir (1-4 arası). Aglütinasyon, agregasyondan ve hareketli spermelerin debris veya sperm dışı hücrelere yapışmasından ayırt edilmelidir. Aglütinasyon olması infertilitenin nedeninin immünolojik olduğu için yeterli kanıt değildir ama antisperm antikor çalışılmasını ve daha ileri incelemelerin yapılmasını düşündürülebilir. Şiddetli aglütinasyon sperm motilite ve konsantrasyon değerlendirmesini etkileyebilir.

### Sperm Dışı Hücreler

Ejakülat genitoüriner sistemden epitel hücreleri, lökositler ve immatür germ hücreleri gibi başka hücreler de içerebilir. Son ikisine yuvarlak hücreler de denir ve normal durumda tüm ejakülatta  $1 \times 10^6$  /ml'den fazla yuvarlak hücre bulunması

halinde peroksidaz testi, lökosit belirteçleri çalışılmalı ve konsantrasyonları doğru bir şekilde hesaplanmalıdır.

### Sperm Motilitesi

Ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde, tercihen likefaksiyondan sonraki 30 dakikada motilite değerlendirilmelidir. Taze hazırlanmış preparatların stabil hale gelmesi için yaklaşık bir dakika bekletilir. Motilite değerlendirmesi faz kontrast mikroskopta 200-400 büyütmede yapılır. Sperm motilitesi 37°C'de ısıtılmış tabla üzerinde veya oda sıcaklığında bakılabilir. Farklı motilite kategorilerindeki spermlerin oranlarını hesaplayabilmek için en az beş mikroskopik alanda en az 200 sperm hücrelerinin değerlendirilmesi gerekir. Aynı semen örneğinden hazırlanmış başka bir preparatta tekrar 200 sperm sayılıp birbirinden bağımsız bir şekilde motilite yüzdeleri kıyaslandığında kabul edilebilir farklılık oranları varsa işleme devam edilir. Büyük farklar varsa bu durumda yeni preparat hazırlamak gerekir. Fokal bir mikroskop düzleminde gratikülle belirlenmiş çizgilerin sınırladığı alanda ya da sperm sayısı azsa tüm alanda sperm hücreleri sayılarak motilite değerlendirilir.

Motilitenin değerlendirmesi için spermeleri progresif hareketli, nonprogresif hareketli ve hareketsiz şeklinde sınıflandıran basit bir yöntem tavsiye edilir.

**Progressif hareket:** sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket eder.

**Nonprogresif hareket:** ilerleyici olmayan hareketlerin tamamını içerir. Örneğin çok küçük daireler şeklinde, kuyruğun hareketiyle baş kısmının çok zor olarak yer değiştirmesi, sadece kuyruğun hareket etmesi gibi.

**Hareketsiz:** Hiç hareketin olmaması.

Bir önceki WHO baskısında progressif hareketli spermeler hızlı ileri hareketli ve yavaş ileri hareketli olarak sınıflandırılıyordu ancak bunun teknisyenler tarafından yanlışlık olmadan doğru bir şekilde hesaplanması zordur. Ayrıca sperm motilitesi tartışılırken total hareketliliğin mi yoksa progresif hareketliliğin mi olduğu belirtilmelidir. Önce progresif hareketli olanlar sonra nonprogresif hareketliler ve hareketsizler değerlendirilir. Total hareketlilik için en düşük referans değeri %40 iken bu değer progresif hareketlilik için %32'dir.

### Sperm Canlılığı

Sperm canlılığı hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranının %40'dan az olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Aynı zamanda bu testle hareketlilik değerlendirmesinin doğru yapıldığı da kontrol edilebilir. Canlı olmayan hücrelerin sayısı hareketsiz olan spermelerin sayısını aşmamalıdır. Normalde canlı hücrelerin sayısı motil hücrelerden fazladır.

Canlı spermelerin oranı boya eksklüzyonu ya da hipoozmotik şişme yöntemleri ile hücre zarı sağlam olanların değerlendirilmesi ile hesaplanabilir. Boya eksklüzyonu metodu ölü hücrelerde hasarlanan plazma zarının bazı boyaları alması prensibine dayanır. Bu yöntem eosin-nigrosin veya sadece eosin boyaları kullanılarak yapılabilir. Hipoozmotik şişme ise sadece sağlam membranı olan hücrelerin hipotonik solüsyonlarda şişmesi prensibine dayanır. Isı değişikliği ve dehidratasyonun sperm canlılığı üzerine olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla likefaksiyondan sonraki 30 dakikada ya da ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde canlılık değerlendirilmelidir.

Hareketsiz spermelerin canlı olup olmadıkları klinik açıdan önemlidir. Canlılık değerlendirmesinin sonuçları aynı semen örneğinin hareketlilik sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmelidir. Canlı ama hareketsiz hücrelerin büyük oranda bulunması kuyruktaki yapısal defektlerin göstergesi olabilir. (20) Hem hareketsiz hem de ölü hücrelerin (nekrozoospermi) yüksek oranda bulunması ise epididimal bir patolojinin göstergesi olabilir. (7, 21) Sperm canlılığı için en düşük referans değeri %58'dir.

### Sperm Sayımı

“Total sperm sayısı” ve “sperm konsantrasyonu” terimleri aynı değildir. Sperm konsantrasyonu her bir ünite semen volümü başına düşen sperm sayısını ifade ederken total sperm sayısı tüm ejakülattaki sperm sayısını ifade eder. Total sperm sayısı semen analizi sırasında hesaplanan sperm konsantrasyonundan elde edilir. Ejakülattaki total sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu dölleme yeteneği, gebelik oluşumuna kadar geçen süre ve gebelik oranları ile ilişkilidir. (22-26) Normal bir erkekte obstrüksiyon yoksa ve cinsel perhiz süresi çok uzun değilse total sperm sayısı testis volümü ile koreledir ve bu da testislerin sperm üretme yeteneğini ve yolun sağlamlığını gösterir. (27, 28) Seminal vezikül ve prostat salgılarının miktarından etkilenebilen sperm konsantrasyonu ise fertilizasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir ancak testis fonksiyonunu değerlendirmek için özgün değildir. (29) Sperm sayımı için 100 µm derinlikte hemositometre sayma kamaraları tavsiye edilmektedir. Spermelerin doğru bir şekilde sayılıp hesaplanabilmesi için semenin dilüe edilmesi gerekir. Ne kadar dilüe edileceği taze preparatta 200 veya 400 büyütmede görüntü alanı başına sayılan sperm hücresi sayısına göre belirlenebilir (Tablo 2). Örnekte mikroskopla hiç sperm görülmediyse yeni bir taze preparat hazırlanır. Yine sperm görülmezse azoospermiden şüphelenilebilir. Örnek 3000 g'de 15 dakika santrifüj edilir ve sperm hücresi tespit edilirse kriptozoospermi, görülmezse azoospermi denir.

Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi 3x3 mm'lik iki ayrı sayım kamarası içerir. Sayım kamarası ile arasında

0.1mm'lik mesafe sağlayan özel kalınlıkta (0.44 mm) bir lamel kullanılır. Her bir kamara 1x1 mm'lik 9 kare içerir. 100 µm derinlikte bu karelerin her biri 100 nl'yi ifade eder. Bu karelerden 1, 3, 7 ve 9 numaralı olanlar 16 adet (6.25 nl), 2, 4, 6 ve 8 numaralı olanlar 20 adet (5 nl) ve 5 numaralı kare ise 25 (4 nl) adet küçük kareden oluşmaktadır (Şekil 1).

Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi ile sayım yaparken kabul edilebilir düşüklükte bir sayım hatasına ulaşabilmek için her birinde 200 sperm olan iki sayım yapılmalıdır. Sayım sonuçları arasındaki fark kabul edilebilir sınırlar üzerinde ise bu yanlış sayım, dilüsyon hatası veya spermlerin eşit dağılmamış olduğunun bir göstergesi olabilir. Yeniden dilüsyon hazırlanıp yeni sayım yapılmalıdır.

Sperm konsantrasyonu hesaplaması sayım sonucu elde edilen sperm sayısının o spermilerin içinde bulunduğu volüm bölünmesi esasına dayanır ve " $C = (N/n) \times (1/20) \times \text{dilüsyon faktörü}$ " formülüyle hesaplanabilir (C: konsantrasyon, N: sperm sayısı, n: sayım yapılan kare sayısı).

Sperm konsantrasyonu için en düşük referans değer  $15 \times 10^6 / \text{ml}$ 'dir. Total sperm sayısı ise sperm konsantrasyonunun tüm ejakülat volümüyle çarpılması sonucu hesaplanır ve en düşük referans değeri  $39 \times 10^6$ 'dır.

## Sperm Morfolojisi

İnsan spermının morfolojik değişkenliği, sperm morfolojik açıdan değerlendirmesini güçleştirmekle beraber özel-

likle postkoital mukustan olmak üzere kadın genital sisteminden ya da zona pellucida yüzeyinden elde edilen sperm gözlemleri normal bir sperm görünümünün tanımlanmasında yardımcı olmuştur.(30-32)

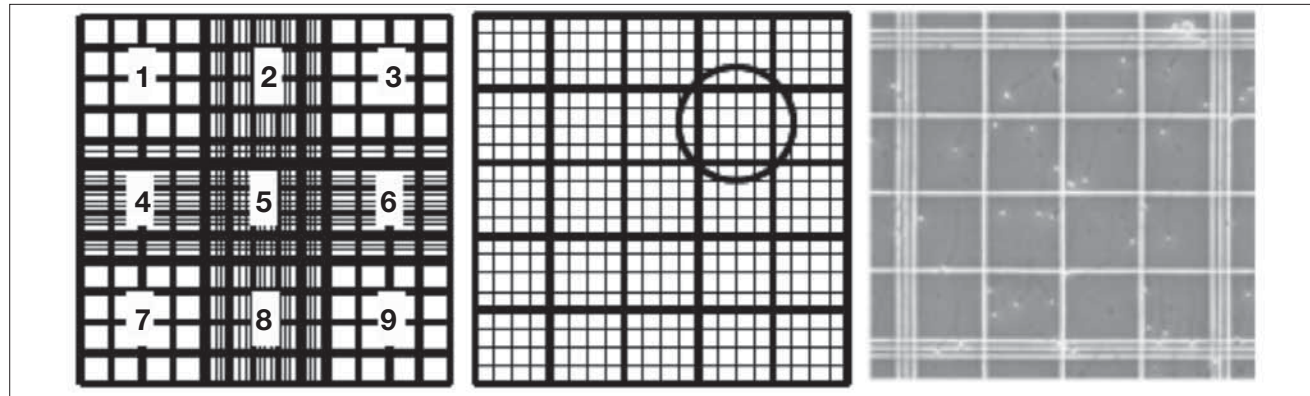
Normal formda görünen sperm hücrelerinin oranı ile fertilité sonuçları (gebelik oranları veya gebeliğe kadar geçen süre) arasında bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır.(33-40) Sperm morfolojik değerlendirmesi şu aşamalardan oluşur:

- Semen smear preparatlarının hazırlanması
- Preparatı havada kurutma, fiksasyon ve boyama
- Eğer uzun süre saklanacaksa lamın üzerini lamelle kapatma
- Parlak alan objektifi ile 1000 büyütmede immersiyon yağı kullanarak preparatın incelenmesi
- Normal ve anormal formdaki spermeleri değerlendirebilmek için yaklaşık 200 sperm sayılması
- Sayım hatalarını azaltmak için iki kez sayım yapmak. Sonuçlar karşılaştırıldığında kabul edilebilir fark varsa devam edilir ama öyle değilse yeniden sayım yapılmalıdır.

Boyama yöntemi olarak Papanicolaou, Shorr ve Diff-Quick boyaması tavsiye edilen yöntemlerdir. Bu boyalarla baş akrozomal bölgede soluk mavi, post-akrozomal bölgede koyu mavi boyanır. Orta kısım bir miktar kırmızı boyanma gösterebilir. Kuyruk kısmı mavi ya da kırmızımsı boyanır. Sitoplazmik artıklar genellikle başın arkasında ve orta kısım etrafında bulunur Papanicolaou boyası ile pembe veya kır-

**Tablo 2. Gerekli semen dilüsyonunun nasıl yapılacağı, sayma kamarası ve değerlendirilecek alanlar.**

Sperm (her 400 büyütmede)	Sperm (her 200 büyütmede)	Gerekli dilüsyon	Semen (µl)	Fiksatif (µl)	Kamara	Sayılacak alanlar
>101	>404	1:20 (1 + 19)	50	950	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
16-100	64-400	1:5 (1 + 4)	50	200	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
2-15	8-60	1:2 (1 + 1)	50	50	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1 + 1)	50	50	Geliştirilmiş Neubauer veya büyük volüm	9 karenin tamamı



**Şekil 1. Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi.**

mızı, Shorr boyası ile kırmızımsı-turuncu boyanır. Papanicolaou boyaması sperm ve diğer hücrelerin iyi boyanmasını sağlar. Shorr boyaması normal formlar için Papanicolaou boyamasına yakın sonuçlar verir. Klinik laboratuvarlarda özellikle aynı gün sonuç verilebilmesinden dolayı kullanışlı olan Diff-Quick boyaması zeminin çok fazla boyanmasından dolayı Papanicolaou boyaması kadar kaliteli sonuçlar vermeyebilir.

Normal formlu sperm hücreleri için en düşük referans değer %4'tür.

### Kaynaklar

1. World Health organization: Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva: WHO Press, 2010.
2. Bjorndahl L, Kvist U. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod Biomed Online* 2003;7:440-8.
3. Eliasson R. Basic semen analysis. In: Matson P, ed. *Current topics in andrology*. Perth, Ladybrook Publishing: 35-89. 2003.
4. Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum Reprod* 1993;8:1251-8.
5. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril* 2004;82:57-65.
6. Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation II. Spermatozoal vitality and storage. *Clin Reprod Fertil* 1982;1:287-93.
7. Correa-Perez JR, Fernandez-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospermia. *Fertil Steril* 2004;81:1148-50.
8. Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics. *Clin Reprod Fertil* 1982;1:273-85.
9. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:107.
10. Baker HW, Kovacs GT. Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean. *Int J Androl* 1985;8:421-6.
11. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod* 2003;18:2082-8.
12. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995;332:281-5.
13. Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB et al. Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004;25:635-44.
14. Cooper TG, Brazil C, Swan SH, Overstreet JW. Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *J Androl* 2007;28:1-4.
15. Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T et al. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod* 2006;21:760-5.
16. de la Taille A, Rigot JM, Mahe P, Gervais R, Dumur V, Lemaitre L et al. [Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens]. *Prog Urol* 1998;8:370-6.
17. Weiske WH, Salzler N, Schroeder-Printzen I, Weidner W. Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia* 2000;32:13-8.
18. Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Mieuisset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril* 2000;74:1164-74.
19. von Eckardstein S, Cooper TG, Rutscha K, Meschede D, Horst J, Nieschlag E. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2000;73:1226-31.
20. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;9:405-28.
21. Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HW, de Kretser DM. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil Steril* 1988;49:1052-8.
22. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002;17:503-15.
23. World Health Organization. Task Force for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril* 1996;65:821-9.
24. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl* 2000;21:145-53.
25. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 1998;352:1172-7.
26. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod* 2000;15:1562-7.
27. MacLeod J, Wang Y. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertil Steril* 1979;31:103-16.
28. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl* 1984;7:369-82.
29. Eliasson R. Analysis of semen. In: Behrman SJ KR, eds. *Progress in Infertility*. NY, Little, Brown: 691-713. 1975.
30. Fredricsson B, Bjork G. Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil Steril* 1977;28:841-5.
31. Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1991;30:346-52.

32. Liu DY, Baker HW. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil* 1992;94:71-84.
33. Eggert-Kruse W, Kohler A, Rohr G, Runnebaum B. The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertil Steril* 1993;59:617-28.
34. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl* 1988;11:379-94.
35. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update* 1998;4:73-82.
36. Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ, Oehninger S. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia* 1995;27:143-8.
37. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* 2001;16:1165-71.
38. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001;7:495-500.
39. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod* 2003;18:1643-9.
40. Liu DY, Garrett C, Baker HW. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod* 2003;18:2382-9.