

Farklı Semen Parametrelerinde Işık Mikroskobu Düzeyinde Spermatozoa Morfolojisi ve Nükleer Kondansasyon Değerlendirmesi

Emine Aksoy¹, Tahsin Murad Aktan², Selçuk Duman², Duygu Dursunoğlu², Gökhan Cüce²

1 Konya Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Konya

2 Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı

Adres : Sille Akmahalle Konevi Sokak No: 15 Selçuklu Konya Konya - Türkiye

Cep: 05056331425 e-mail: aksoyeminedr@yahoo.com.tr

ÖZET:

Amaç: Oligozoospermili ve teratozoospermili hastalarda Işık Mikroskobu düzeyinde sperm morfolojisi ve sperm DNA kondansasyonunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: oligozoospermili (n: 20) ve teratozoospermili (n: 25) hastalardan alınan seminal plazma örnekleri PBS ile 2 kez yıkandı ve smear hazırlandı, metil alkol ile fikzasyonu hazırlandı. Hematoksilen-Eosin, Toluidin-Blue, Giemsa ve Wright özel histolojik boyaları ile boyandı. Işık mikroskobunda 200 sperm hücresi sayılıp kondanse ve decondansate başa sahip olan spermatozoalar belirlendi.

Bulgular: Bu dört boya ile yapılan yaymalarda kondanse sperm, Hematoksilen-Eozin ve Toluidin Blue boyası ile boyanmış preparatlarda daha kolay ve net görüldü. İstatistiksel olarak dört boya ile kondansasyon değerlendirmesinde hasta grupları arasında fark olmadığı görüldü. Ayrıca oligozoospermili ve teratozoospermili hasta grupları için boyalar kendi içinde karşılaştırıldığında fark olmadığı görüldü. Ancak güven aralığı grafiğine bakıldığında; teratozoospermili hastaların oligozoospermili hastalara göre özellikle de Toluidin blue ile boyanmış grubun belirgin ölçüde homojen dağılım göstermesi; teratozoospermili hasta grubunun daha güvenilir kondanse sperm sağladığını gösterdi

Sonuç: Sperm kondansasyon değerlendirmesi için toluidin blue boyası en güvenilir boyalardan biridir. Oligozoospermili ve teratozoospermili hastalar arasında ve bu dört boya arasında sperm nükleer kondansasyonunda fark yoktur. Ancak intrastoplazmik sperm injeksiyonu için kondanse sperm seçimi yapılırken oligozoospermili hastalara göre teratozoospermili hastalar daha güvenilir sonuç verebilir.

Anahtar Kelimeler: Sperm, morfoloji, kondansasyon

SUMMARY:

Evaluation of nuclear condensation and spermatozoa morphology at the level of light microscope in different semen parameters

Aim: It was aimed to evaluate sperm DNA decondensation of oligoasthenospermic and teratozoospermic patients at the level of light microscope.

Material and Methods: Seminal plasma of oligoasthenospermic (n: 20) and teratozoospermic (n: 25) samples were washed twice with PBS and then smear was prepared, fixation was done with metil alcohol. Staining was done with; heamatoxylin-eosin, toluidine blue, Giemsa and Wright stains. Under light microscopy 200 sperm was counted, condansated and decondansated ones were counted.

Findings: Between four stains condensation/decondensation selection was done more easier with haematoxylin-eosin and toluidine stains. Statistical analyses did not show any difference on condensation evaluation between stains. There was no any significant difference for condensation ratio values between groups. Also comparasion between oligoasthenospermic and teratozoospermic samples done with stains showed no any difference. But when safety area of graphic was considered (especially when teratozoospermic was compared to oligoasthenospermic) toluidine stain showed a homogen appearance. Condansated sperm ratio was higher in teratozoospermic samples.

Results: As a result toluidine blue is the most trustable stain for condensation evaluation. There was no any difference between four stains between oligoasthenospermic and teratozoospermic samples. For intracytoplasmic sperm injection teratozoospermic samples are more reliable than oligoasthenospermic samples.

Key words: Sperm, morphology, condensation

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 gebe kalma şansı %75 ve bir yıl içerisinde gebe kalma şansı 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 sayesinde erkek faktörlü infertilite tedavisinde önemli gelişmeler olmaktadır. Bu amaçla klinisyenler, androloji laboratuvarlarından tanı ve tedavi amaçlı yardımlar alırlar (3).Yardımcı üreme teknikleriyle başarılı bir fertilizasyon elde edilmesi ve erken embriyonik gelişimin devamının sağlanmasında spermatozoa seçimi önemli faktörlerden biridir. Semen parametrelerinden spermatozoa morfolojisinin ve baştaki kondansasyonun bilinmesi fertilite çalışmalarının, semen analizinin önemli bir parçası olup kaliteli spermatozoa seçiminde en önemli kriterdir (4).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. Yani akrozomal bölge, baş bölgesinin %40-70'ini kaplamalıdır(5,6,7). Akrozom oluşumu evrelerinde golgi kompleksinin ve kromatid cisimciğinin katkısı önemlidir. Hücredeki tüm kromatin, nükleus şekillenmesi sırasında homojen, koyu boyanan bir yapıya dönüşür (8,9,10).

Erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden biri de sperm DNA yapısındaki bozulmadır. (1,2). Kötü kalitedeki spermatozoa DNA'sı fertilizasyonun bozulmasına neden olur. İn vitro fertilizasyon(IVF) yapılan hastalarda hasarlı genetik yapıya sahip spermatozoada fertilizasyon oranları azalmaktadır(11). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda(ICSI) ise hasarlı DNA'dan fertilizasyon olmuşsa embriyoların genetik yapısında bozulma olacaktır(3,4). Bunun sonucunda, ejakulatta

hasarlı DNA'ya sahip spermatozoa oranının bilinmesi fertilizasyon başarısında ve sağlıklı embriyonun gelişmesinde önemlidir. Bu çalışmada, oligozoospermili ve teratozoospermili hastalarda Işık Mikroskopu düzeyinde, Hematoksilen-Eosin, Toluidin-Blue, Giemsa ve Wright özel histolojik boyaları ile sperm morfolojisi ve sperm DNA kondansasyonunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VEYÖNTEM

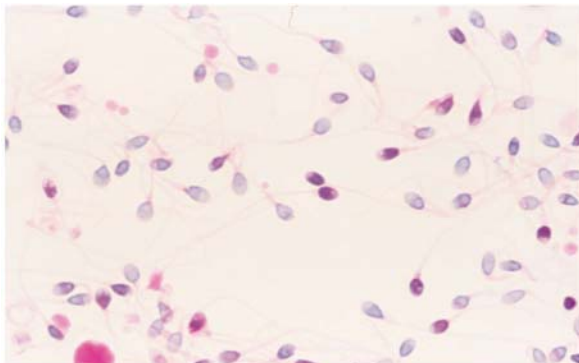
Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne spermiyogram için başvuran hastalardan spermiyogram sonuçlarına göre randomize yöntemle 20 oligozoospermili ve 25 teratozoospermili hasta seçildi. Bu hastaların likefiye olmuş semenleri konik tüp içinde 1:1 volum oranında PureSperm Wash (Nidacón) medyumunu ile dilüe edilip vorteksle karıştırıldı. Önce1600 rpm'de on dakika santrifüj edilip üstteki süpernatant kısmı alınıp atıldı. Dipte kalan pelet kısmı 0.5 mlt medyumla karıştırıldı ve sonra 1000 rpm'de on dakika santrifüj edilip süpernatantı atıldı. Pellet 0.2 mlt medyumla karıştırıp birer damla alınıp yaymaları yapıldı. Oda sıcaklığında kurutulup metil alkolde 2 saat tespit edildi. Her bir hasta için ayrı ayrı olmak üzere; spermatozoa morfolojisini ve spermatozoa başında çekirdek içi detayları iyi gösteren boyalardan, Hematoksilen-Eozin, Toluidin Blue, Giemsa ve Wright boyaları yapıldı. Boyanmış preparatlar Olympus-CH Işık Mikroskopunda 100'lük objektif büyütmesinde incelenip önce sperm morfolojisi değerlendirildi. Sonra 200 sperm hücresi sayılıp kondanse ve dekondanse başa sahip olan spermatozoalar belirlendi. Spermatozoa başı boyayı tamamen alıyorsa dekondanse, 2/3 'lük başakrozom oranı rahatça değerlendirilebiliyorsa kondanse olarak kabul edildi. Bulguların Olympus B-H2 foto ataşmanlı mikroskop yardımıyla mikrofotografaları alındı. Çalışmanın istatistiksel analizi Student T Testi ile yapıldı(p <0,05).

BULGULAR

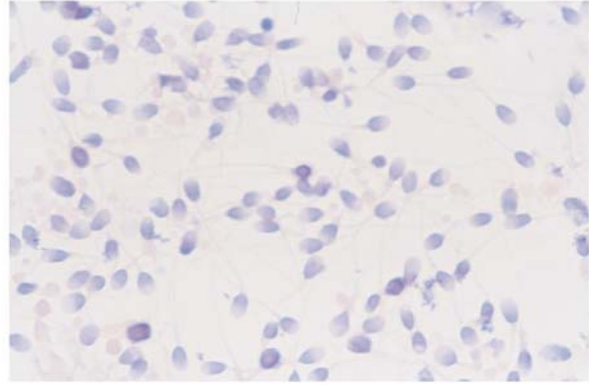
Hematoksilende 1,5 dakika, Eozinde 3,5 dakika tutularak yapılan Hematoksilen-Eosin

boyası ile spermilerin baş, orta parça ve kuyruk kısmı net ve temiz olarak görüldü. Başta çekirdek içi detaylar iyi seçildi. Akrozom çekirdek oranı açık ve koyu mor renginde son derece iyi görülüyordu (Kondansasyon). Dekondanse olanlarda ise baş boyayı tamamen alarak koyu mor renginde idi. Orta parça ve kuyruk net morfolojisi ve anomalileri çok iyi değerlendirilebiliyordu. %0,1'lik Toluidin Blue ile 1,5 dakika boyanmış preparatlarda spermatozoa baş ve kuyruk morfolojisi değerlendirilebiliyordu. Orta parça iyi seçilemiyordu. Baştaki kondansasyon iyi seçiliyordu. Giemsa Boyası 18 dakika boyanmış preparatlarda spermatozoa baş morfolojisi ve kondansasyon iyi görülüyordu. Orta parça ve kuyruk boyayı iyi almamış, net seçilemiyordu. Lilly'nin Wright boyası 5 dakika boyanmış spermelerde 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. Bu dört boya ile yapılan yaymalarda kondanse spermeler, Hematoksilen-Eozin ve Toluidin Blue boyası ile boyanmış preparatlarda daha kolay ve net görüldü. İstatistiksel olarak dört boya ile kondansasyon değerlendirmesinde, oligozoospermili ve teratozoospermili hasta grupları arasında fark olmadığı görüldü. Her bir boya için kondansasyon oranında bu gruplar arasında fark yoktu. Ayrıca oligozoospermili ve teratozoospermili hasta grupları için boyalar kendi içinde karşılaştırıldığında fark olmadığı görüldü. Ancak güven aralığı grafiğine bakıldığında; teratozoospermili hastaların oligozoospermili hastalara göre -özellikle de Toluidin blue ile boyanmış grubun-belirgin ölçüde homojen dağılım göstermesi; teratozoospermili hasta grubunun daha güvenilir kondanse sperm sağladığını gösterdi (Şekil1,Resim1,2,3,4).

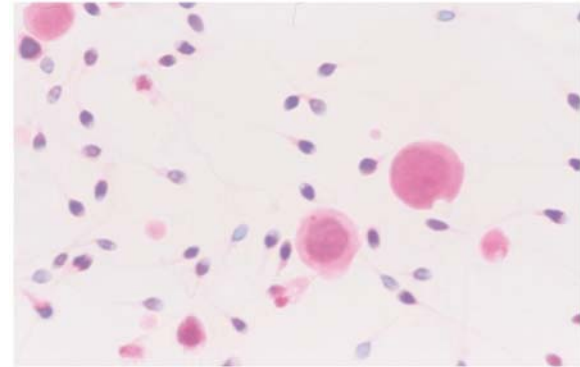
Resim 1: Hemotoksilen - eozin FMB x 330



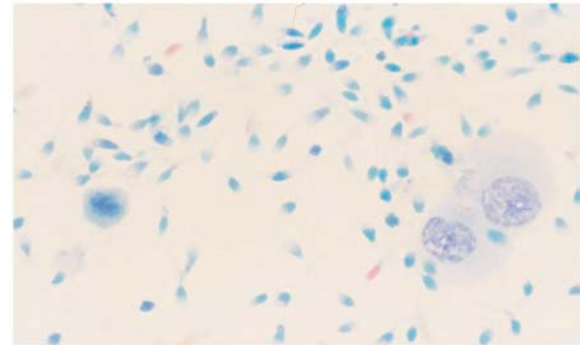
Resim 2: Toluidin Blue FMB, x 330



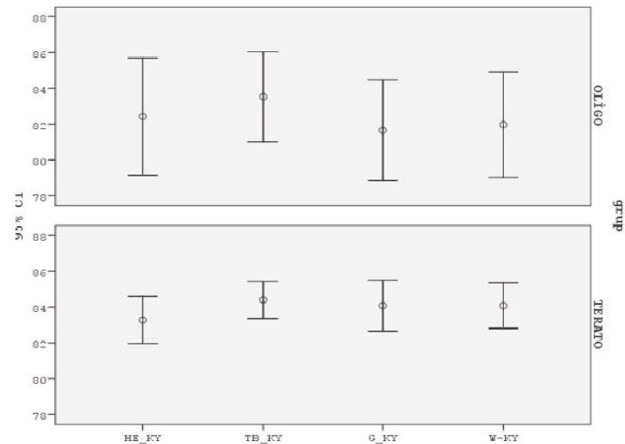
Resim 3: Giemsa FMB, x 330



Resim 4: Wright FMB, x 330



Şekil 1:



HE-KY: HematoksilenEozin-Kondansasyon yüzdesi
 TB-KY : Toluidin Blue-Kondansasyon yüzdesi
 G-KY : Giemsa-Kondansasyon yüzdesi
 W-KY : Wright-Kondansasyon yüzdesi

TARTIŞMA

Spermlerde başın büyük kısmını nükleus kaplar, 2/3 ön kısmı ise akrozom kılıfı ile çevrelenmiştir(12). DNA kondansasyonu tam olan bir sperm başında üst kısım boyayı çok hafif alırken, kalan 2/3'lük kısım boyayı daha fazla alır. Dekondanse DNA'ya sahip spermde ise baş tamamen boyayı alarak lacivertimsi-siyah homojen renkte görüntü verir. İnflamasyon, apopitoz, sigara ve serbest oksijen türevleri spermde kromatinin kondanse hale geçmesini engeller(13). Kromatinde yeterli kondansasyon gelişmez ise sperm DNA'sı da kırılmaya karşı hassaslaşır (14). Spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde somatik histonlar ve testise spesifik TH1 ve TH2B histonları; ileri evre spermatidlerde ise TP1 ve TP2 transisyon proteinleri, daha ileride ise artık protamin P1 ve P2 proteinleri bulunur(15). Spermiyogenez sırasında, nükleus kondanse olur ve DNA yapısındaki histon proteinleri yerine, daha stabil olan protamin proteinleri geçer(16). Memeli spermdeki kromatinin oldukça sıkı ve stabil yapısından sorumlu ana faktör; protaminler içindeki ve arasındaki disülfid bağlarına çapraz bağlanmadır(17). Protaminlerdeki anomali ve ya eksiklik kromatinin paketlenmesini bozarak sperm kalitesini ve fertilizasyon kapasitesini azaltır. Spermatozoadaki DNA kromatin paketlenmesi özel boyalarla ve DNA'ya bağlanabilen florokrom ile gösterilebilir. Anilin mavisi ile histonlar(Haidl ve Schill,1994) boyanabilmektedir. Spermatozoa içerisindeki denatüre DNA miktarının belirlemek için akridin orange boyası kullanılabilir(Claasens et al.1992). Kromatin A3 boyası ile spermatozoa içindeki kötü kromatin paketlenmesi ve protamin eksiklikleri gösterilebilir(Bianchi et al.,1993). IVF veya subzonal sperm enjeksiyonu(SUZI) uygulamalarına alınan erkek hastalarda, guanin-sitozinden zengin DNA'ya spesifite gösteren CMA3 boyası kromatin paketlenme defekti olan spermatozoalarda yüksek oranda CMA3 pozitifliği göstermiş ve dölleme kapasitesinde düşme izlenmiştir(Bianchi ve ark., 1996). Sakkas ise 1996'da kromatin veya morfoloji yönünden anomali gösteren spermatozoaların ICSI sonrası dölleme kapasitelerini incelemiş ve sonuçta anormal paketlenen ve/veya DNA hasarı

gösteren spermlerde ICSI sonrası dekondansasyon defekti geliştiği ve bunun da fertilizasyon kapasitesini azalttığı ileri sürülmüştür. Ayrıca kromatin paketlenmesinin değerlendirilmesi için akridin orange ile boyanmayı takiben, DNA flow-sitometrisi uygulanarak kromatin dekondansasyonu gösterilmiştir(18). Garcia ve arkadaşları 2006'da yaptıkları bir çalışmada Hemaklor, Harris Hematoksileni ve hızlı panoptik boyama tekniklerini kullanarak bilgisayar yardımlı spermatozoa morfolometrik 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(19).

Soler ve arkadaşları 2005'te yaptıkları bir çalışmada kompüterize ISAS (Integrated Semen Analysis System) analiz sistemiyle epididimal spermatozoa morfolometrisinin 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 (20). Toluidin Blue boyası disülfid bağlarının yokluğu ya da rüptürünün tesbit edilmesiyle spermatozoa kromatin değerlendirmesinde kullanılan nükleer boyadır. Toluidin blue, sperm baş morfolojisini özellikle de nükleer kondansasyonu göstermesi bakımından önemlidir. Toluidin blue ile DNA'ya bağlanma ve metakromatik boyanma ile DNA'nın açığa çıkması kromatin DNA'sından fosfat grupları ve disülfid bağlarının ayrılması sonucunda sağlanır(17). 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 kromatin kondansasyonu tesbitinin erkek fertilitésinin

değerlendirmesinde değerli bir parametre olduğunu ve klasik semen parametrelerinden bağımsız olduğunu göstermiştir(21). 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 preparatlarda DNA fragmentasyon indeksi, yüksek DNA boyanabilirliği, DNA sitometrisi ile, erken ve geç apoptozis değerlendirilmiştir. 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(22). Beletti ve arkadaşı 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(23). 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(24).

Bizim çalışmamızda literatür bilgisiyle uyumlu olup, Hematoksilen-Eozin ve Toluidin Blue ile boyanmış yaymalarda 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. Giemsa boyası, spermatozoa akrozomu, baş, kuyruk membran bütünlüğü ve morfolojiyi eş zamanlı değerlendirmede kullanılabilen boyadır. Kutvölgyi ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada spermatozoada morfolojiyi daha kusursuz ayırt edebilmek için bir metod geliştirerek, Tripan 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 Tripan blue-Giemsa ile CBS arasında uygunluk olduğunu görmüşlerdir (25). Tartaglione ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada dondurulmuş çözünmüş spermatozoade invitro fertilitenin tahmini olarak spermatolojik prognostik değerleri incelemişler. Normal spermatozoa fonksiyonları için önemli değerler olan spermatozoa plazma membranı ve akrozom bütünlüğünü incelemek için Tripan Blue ve Giemsa boyası ile boyanmış spermatozoa yaymalarını incelediklerinde bu boyaların IVF için kullanılan semen numunesinde, potansiyel fertilitenin prognozu için kullanılabileceği sonucuna varmışlar(26). 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(27). Eggert ve arkadaşları 1996’da yaptıkları bir çalışmada in-vivo şartlardaki gebelikte erkek fertilitesi ve strick kriterleri kullanarak spermatozoa morfolojisini Diff-Quick(Giemsa-Wright) boyası ile değerlendirmişler. Özellikle fertilite ile spermatozoa sayısı, progressif motilite ve standart spermatozoa morfolojisi arasında

anlamli 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(28). Kovacs ve ekibinin 1992'deki bir çalışmasında spermatozoa akrozom boyanması ve canlılığını incelemişler. Tripan blue ve Congo Red boyasına akrozomun daha iyi görünlenebilmesi 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 spermatozoade siyah, koyu violet ya da gri renkte idi. Sonuçta çalışmaya Giemsa boyasının eklenmesiyle değerlendirmenin daha iyi olduğunu görmüşlerdir (29).Protamin molekülüne afinitesi olan Giemsa ve Wright Boyaları için yaptığımız değerlendirme literatürle uyumlu idi. Spermatozoa baş morfolojisi ve kondansasyonu iyi seçilebiliyordu(30).

SONUÇ

Çalışmamız göstermiştir ki; Işık mikroskopunda sperm morfoloji değerlendirmesi çalıştığımız bu dört boya ile rahatlıkla, güvenle yapılabilir. Sperm kondansasyon değerlendirmesi için toluidin blue boyası en güvenilir boyalardan biridir. Oligozoospermili ve teratozoospermili hastalar arasında ve bu dört boya arasında sperm nükleer kondansasyonunda fark yoktur. Ancak intrastoplazmik sperm injeksiyonu için kondanse sperm seçimi yapılırken oligozoospermili hastalara göre teratozoospermili hastalar daha güvenilir sonuç verebilir. Sperm dekondansasyon defektleri ve DNA anomalileri normal morfolojiden bağımsız olarak döllenme kapasitesini etkilemektedir ve ciddi erkek infertilitesinde sperm DNA'sına yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

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. 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.
4. RS, Althouse GC. *Determining sample size for the morphological assessment of spermatozoa. Theriogenology* 2004;61: 691-703.
5. *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 .*
6. Delilbaşı L.A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. *Veri medikal Yayıncılık.*2008; 62.
7. 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.
8. Junqueira LC, Carneiro J, RO Kelley. *Çev Ed Aytakin Y. Temel Histoloji. Barış Kitabevi İstanbul,1998; S: 407- 422.*
9. 35.Clermont Y. *Kinetics of spermatogenesis in: 198-236.*
10. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. *Prospects for spermatogenesis in vitro. Theriogenology, 2003;59:73-86.*
11. 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.
12. Brugh VM, Matschke HM, Lipshultz LI. *Male factor infertility: Evaluation and management. Endocrinol Med Clin North Am* 2004; 88: 367-385.

13. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal spermatozoa morphology a structured review. *Hum Reprod* 1998; Update 4: 73-82.
14. Ombelet W, Pollet H, Bosman E, Vereecken A. Results of a questionnaire on spermatozoa morphology assessment. *Hum Reprod* 1997; 12: 1015-1020.
15. Bernard Jegou, Charles Pineau, Jorna Toppari. Spermatogenesis in vitro in mammals. In *Assisted Reproductive Technology*. Jonge CD, Barratt CLR, eds. Cambridge University Press: Cambridge. 2002;3-25.
16. Brugh VM, Matschke HM, Lipshultz LI. Male factor infertility: Evaluation and management. *Endocrinol Med Clin North Am* 2004; 88: 367-385
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. 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.
19. 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.
20. C Soler, B Gadea, AJ Soler, MR Fernandez Santos, MC Esteso, 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 , 15 September 2005, Pages 1236-1243.
21. MC Sardor, MI Carretero and DM Neild. Evaluation of stallion spermatozoa DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue., September 2008; Pages: 349-350.
22. 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 spermatozoachromatin quality in human spermatozoa
23. 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.
24. Krzanowska H. Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. 1982 Jan;64(1):97-101.
25. 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.
26. CM Tartaglione and MN Ritta. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen , 1 October 2004;Pages: 1245-1252.
27. 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 , June 1996; Pages: 155-159.
28. 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. 1996 Jan;11(1):139-46.
29. Kovacs A, Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. 1992 May;67(3):119-24.
30. 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.