

SPERMANIN ELEKTRON MİKROSKOP İLE TETKİKİNİN İZOLE ASTHENOSPERMİADA YERİ

THE ROLE OF THE ELECTRON MICROSCOPY IN ISOLATED ASTHENOSPERMIA

ÖZKARA., H*., GÜLGÜN, C**., ALICI, B*., AKKUŞ, E*., AYTEKİN, Y**., HATTAT, H*.

ÖZET

Amaç: İzole asthespermia vakalarında elektron mikroskopu ile spermatozoanın yapısal bozukluklarını saptamak.

Materyal ve Metod: Merkezimize 1992-93 yıllarında infertilite yakınması ile başvuran ve izole asthenospermia tanısı konan hastalarda fizik muayene, sperm kültürü ve IBT (Immuno Bead Test) ile asthenospermia etiolojisi açıklanamayan 6 hastada spermanın elektron mikroskopik incelemesi yapıldı. Bu hastaların spermiogramlarında asthenospermia ortak patoloji idi, canlı ve hareketsiz spermatozoa eosin G boyası ile ölü spermatozodan ayırt edildi. Altı hastanın da infertilite dışında başka yakınmaları yoktu.

Bulgular: Sperm kuyruklarının elektron mikroskop ile incelenmesinde *axoneme*'nin 9+2 formülüne uygun olması gereken mikrotübüler yapısı, iki hastada 9+0 olarak saptandı. Bunun dışındaki elektron mikroskopi bulguları spermatozoanın hareketinden sorumlu *axoneme*'e ait yapısal bozukluk göstermedi. 9+0 mikrotubul yapısında *axoneme*'i olan hastalara immotil-cillia sendromu tanısı kondu. Spermatozoa'nın elektron mikroskop ile incelemelerinde yapısal bozukluk saptanamayan hastaların *axoneme*'lerin *dynein* kollarında eksiklik veya spermatozoa hücre içi biokimyasal bir bozukluk olabileceği düşünüldü.

Sonuç: İzole asthenospermia vakalarında immotile-cilia sendromu ayırıcı tanıda düşünülmeli tanısını koymak için sperma elektron mikroskopu ile incelenmelidir.

SUMMARY

Aim: To evaluate the role of the electron microscopy in isolated asthenospermia.

Material and Method: Six patients with complaint of infertility were diagnosed as isolated asthenospermia between years 1992-1993 in urology department of Cerrahpaşa School of Medicine. Their physical examinations and investigation for infection (sperm culture) and antisperm antibodies (Imune Bead Test) were normal. Spermatozoa were stained with eosin G, which reveals live and dead cells. Semens of these patients was evaluated with electron microscopy for a structural defect of the axoneme.

Results: In two patients examinations with electron microscopy revealed deformity of the ultra-structure of the axoneme. The patterns of microtubular doublets 9+2 are changed to 9+0. Electron microscopy examinations of the other specimens revealed no abnormalities within the tail of sperm.

The diagnoses of the patients with the 9+0 pattern of the axoneme, were immotile cilia syndromes. Possible causes of immotile sperm in patients with normal electron microscopy examination could be missing dynein arms of the axoneme or biochemical defect within the spermatozoa.

* İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Aile Planlaması Uygulama ve Araştırma Merkezi

** İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji Embrioloji Anabilim Dalı

Conclusion: Immotile-cilia syndrome should be remembered in differential diagnosis of isolated asthespermia and electron microscopy of sperma should be performed for the diagnosis.

ANAHTAR KELİMELELER: Asthenospermia, elektron mikroskop.

KEY WORDS: Asthenospermia, electron microscopy.

GİRİŞ

Spermatozoan servikal mukusu geçmek, kadın genital kanalında ilerlemek ve corona radiata ile zona pellucida'yı delmek için hareket etmek zorundadır. Bu hareket spermatozoan kuyruğu içindeki hareket kaynağı olan axoneme ile gerçekleşir (1,2). Axoneme yapısı 9+2 periferik ve merkezi mikrotubuldan oluşmuştur, bu mikrotübüller hareket kaynağının iskeletini oluşturur (Resim 1). Dokuz adet periferik mikrotubulun üzerinde bulunan iç ve dış dynein kolcukların (arms) birbirleri ile etkileşmeleri ile flagellar hareket ortaya çıkar. Bu kolcuklar üzerinde adenosine triphosphatase (ATPase) bulunduğu gösterilmiştir ve cAMP flagellar hareket için gerekli enerji kaynağı olduğu düşünülmektedir (3,4). Mikrotübül yapısındaki her hangi bir yapısal bozukluk spermin hareketini doğrudan olumsuz olarak etkileyebileceği açıktır.

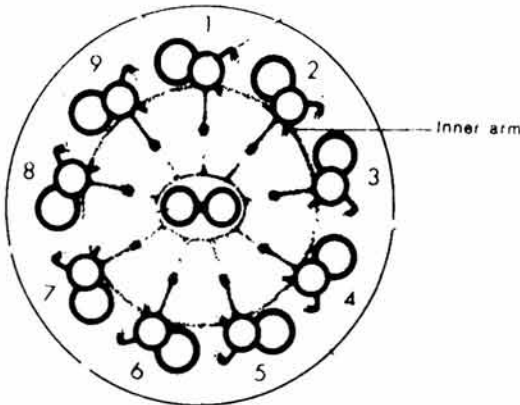
Spermatozoon'un hareket bozukluğuna asthe-

nospermia denir ve spermiogramda ilk yarım saatte spermatozoaların %60'ının ileri hareket etmediği durumdur (5). Genellikle bu patoloji sperm üretimindeki her hangi bir bozukluktan ortaya çıkar ve oligo-astenospermia şeklinde klinikte görülür. İzole, tek başına astenospermia subfertil erkeklerin yaklaşık %20'sini oluşturduğu söylenmektedir (6). Bu vakalarda oligospermia ve spermatozoon morfolojisinde bozukluk yoktur. Enfeksiyon, varikosel ve immunolojik faktörler hareket bozukluğuna yol açmakla birlikte, izole asthenospermının sebebi genellikle konjenital veya sonradan meydana gelen (akkiz) ortaya çıkan spermatozoon kuyruk morfolojisi ve/veya fonksiyon bozukluğu olarak kabul edilir.

Bu çalışmamızda amacımız izole asthenospermia vakalarında, hareket bozukluğu nedenleri (enfeksiyon, varikosel, immünolojik faktör) bulamadığımız hastaların spermatozoalarının ultrastruktüel yapılarını inceleyerek, kuyruk yapılarında spermin hareketinden sorumlu axoneme ait, olası yapısal bozuklukları elektron mikroskopu (EM) ile saptamaktır.

MATERYAL VE METOD

Ocak 93 ve Mayıs 94 tarihleri arasında infertilite nedeniyle Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Aile Planlaması Uygulama ve Araştırma Merkezine başvuran hastalar arasında yapılan incelemeler sonucu izole astenospermia saptanın 6 hasta çalışma grubunu oluşturmaktadır. Hastaların hepsi primer infertilite vakası idi ve yaşları 23-39 (ortalama 31) arasında ve evlilik süresi 2-16 yıl (ortalama 7.2) idi. Yapılan incelemeler; hastaların öz ve soy geçmişlerinin sorgulanması, fizik muayene, iki kez en az on beş gün ara ile merkezi-



Resim 1: Normal axoneme yapısının şeması.

mizdeki laboratuarda aynı teknisyen tarafından spermogram, canlı ve hareketsiz spermatozoaların ayırımı için eosin G boyası, sperm kültürü, ureaplazma urealyticum aranması, chlamydia antijeni araştırması ve immunolojik neden için direkt veya indirekt IBT (Immune Beat Test / Fertility Technologies Inc. Natick, MA, USA)'den oluşuyordu. İmmunolojik infertilite için IBT %10 üzerindeki pozitif sonuçlar patolojik olarak kabul edildi. Bu araştırmalar sonucu sperm hareket bozukluğu açıklanamayan altı hastanın spermatozoası İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embrioloji Anabilim Dalı'ndaki elektron mikroskopu (JEM-100C) ile incelendi.

Elektron mikroskopisi için kullanılan fiksasyon: Masturbasyon yoluyla alınan taze sperma örneğine epon gömme tekniği uygulandı. Alınan materyal 1500 rpm devirde on dakika santrüfüje edildikten sonra 24 saat gluteraldehid solüsyonunda fiksasyona tabi tutuldu. Ertesi gün osmik asit post fiksasyonuna alınan parçalar fosfat tampon solüsyonunda yıkandıktan sonra aseton serileri propilen oksit-epon serilerinden geçirildi. Daha sonra plastik bloklar içerisinde saf epona gömüldü. ultramikrotomda yapılan ince kesitler uranilasetat+reynolds kontrast yönteminden sonra

elektron mikroskopta incelendi.

BULGULAR

Tablo 1, altı hastanın sonuçlarını toplu olarak vermektedir. altı hastanın 1 ml'deki spermatozoa sayısı 20×10^6 üzerinde idi, bu durum en az on beş gün ara ile iki kez yapılan spermogram ile teyid edildi. Sperm motilitesine masturbasyonla steril cam kaba alınan semende ilk yarım saate yapılarak karar verildi, iki spermogramdaki en yüksek değer geçerli sayıldı. Motilite vakalarımızda %0-15 arasında, canlı spermatozoa oranı %60 üzerinde, normal morfoloji %55 üzerinde idi. Hastalar ayakta muayene edildiler, bir hasta 6 ay önce varikoselektomi ameliyatı olmuştu, beş hastanın da ayakta ve Valsalva manevrası ile varikoseli tesbit edilemedi. Tüm hastalara Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında yaptırılan sperm kültürü, ureaplazma urealyticum, chlamydia antijeni araştırmasında mikroorganizma saptanmadı. İmmunolojik infertilite araştırması için IBT kullanıldı ve <%10 pozitif sonuç normal değer olarak kabul edildi. Tüm hastalarda IBT negatif bulundu.

Özgeçmişlerinde beş hastanın kış aylarında

Tablo 1: İzole asthenospermia'lı altı hastanın sonuçları.

	Sperm Sayısı	Morofoloji	Hareketlilik	Variko.	Enfek.	IBT	Elek. Mikros.
Hasta 1	86.10 ⁶	%85 normal	%5 30.dak.	negatif	negatif	negatif	Kuyruk enine kesitlerinde normal (9+2) merkezi ve periferik mikrotübül yapısı, Akrozom bölgesinde vakuolizasyon
Hasta 2	23.10 ⁶	%90 normal	%15 30.dak.	negatif	negatif	negatif	Kuyruk enine kesitlerinde (9+2) merkezi ve periferik mikrotübül yapısı.
Hasta 3	20.10 ⁶	%55 normal	%0 30.dak.	opere	negatif	negatif	Kuyruk enine kesitlerinde normal (9+2) merkezi ve periferik mikrotübül yapısı,
Hasta 4	30.10 ⁶	%60 normal	%10 30.dak.	negatif	negatif	negatif	Kuyruk enine kesitlerinde normal (9+2) merkezi ve periferik mikrotübül yapısı,
Hasta 5	32.10 ⁶	%65 normal	%0 30.dak.	negatif	negatif	negatif	Kuyruk enine kesitlerinde normal (9+2) merkezi ve periferik mikrotübül yapısı,
Hasta 6	28.10 ⁶	%55 normal	%15 30.dak.	negatif	negatif	negatif	boyun bölgesinde düzensizlik, Kuyruk enine kesitlerinde (9+2) merkezi ve periferik mikrotübül yapısı.

sık tekrarlayan (>3) üst solunum yolu enfeksiyonu vardı. Hiç bir hastaya bronchiectasis, kronik sinusitis ve otitis tanısı konulmamıştı. Hastaların hiç birinde situs inversus yoktu.

Elektron mikroskopu sonuçları: Spermanın elektron mikroskop ile tetkikinde başlıca iki ana yapı incelendi. 1) Spermatozoanın ultrastrüktürel yapısı. 2) Spermaya ait spermatozoa dışı yapılar. Spermatozoa ultrastrüktüründe baş ve kuyruk bölgeleri incelendi. baş bölgesinde akrozomal membranlarda ayrılma, nukleer vakualizasyon ve nukleer dekonsantasyona bakıldı. Kuyruk yapısında ise 9+2 periferik ve merkezi mikrotübül yapısı yanısıra mitokondrial ve fibröz kıllıdaki değişiklikler gözlemlendi. Ayrıca bu bulguların dışında boyun bölgesinde stoplazmik damlacık formasyonunun olup olmadığı araştırıldı.

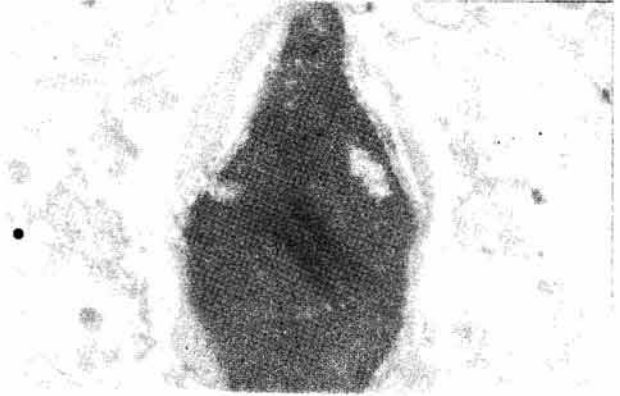
Hasta 2 ve 6 dışındaki örneklerin incelenen sperm kuyruk enine kesitlerinde 9+2 periferik ve merkezi mikrotubul yapılarına rastlandı (Resim 2). İkinci ve altıncı hastaya ait spermatozoon kuyruk enine kesitlerinde axoneme yapısal bozukluk tespit edildi. Axoneme ait merkezi bir çift mikrotubul mevcut değil idi, 9+0 yapısı bulunuyordu (Resim 3). Kuyruk yapısı dışında birinci hastanın spermalarının akrozom bölgesinde (Resim 4), ve beşinci hastanın spermalarının boyun bölgesinde düzensizlik görüldü (Resim 5).

TARTIŞMA

Hastalarımızın sperma EM incelemesinde iki hastada axoneme mikrotübüler yapısının bozuk



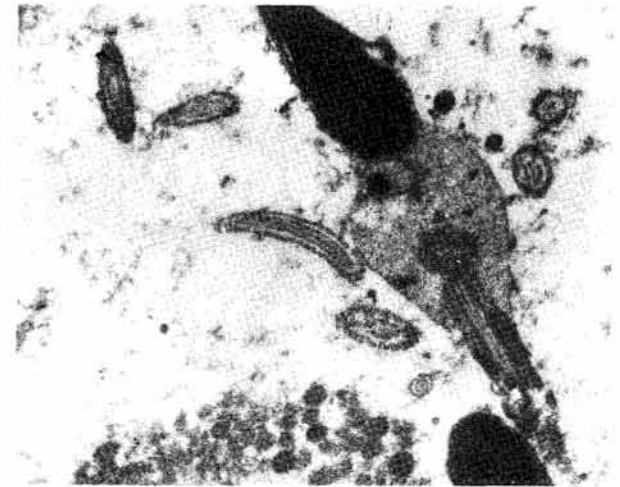
Resim 3: Büyük büyütmede kuyruk enine kesitinde 9+0 yapısındaki, merkezi mikrotübülün olmadığı, bozuk axoneme yapısı.



Resim 4: Büyük büyütmede akrozom bölgesindeki yapısal bozukluk ve düzensizlik.



Resim 2: Bir spermatozoon başı ile birlikte, başın üst ve alt bölümüne rastlayan bölgelerde kuyruk enine kesitlerinde 9+2 yapısındaki axoneme yapıları.



Resim 5: Spermatozoon boyun bölgesindeki şiş ve düzensiz yapı.

9+0 şeklinde merkezi ve periferik tübüler yapı olduğunu saptadık. Spermatazoon kuyruğundaki hareketten sorumlu axoneme iskeletini oluşturan Mikrotübüllerin yapısal bozukluğu, kuyruğun normal flagellar hareketini engellediği düşünülmektedir. Mikrotübüller üzerindeki dynein kolcuklarının çalışması aksamakta ve kuyruk progressif hareketini sağlayacağı hareketini tamamlayamamaktadır. Bu tip hastalarda genellikle spermelerin tamamen hareketsizliğinden daha çok, kısmi hareket azlığı gözlenmektedir (7). Bizim hastalarımızda da ilk yarım saatte %15 oranında, normalden az hareketlilik tesbit edilmişti. Bu duruma immotile-ciliasendromu denilmektedir (8). Bu sendrom otozomal resesif geçiş gösterir.

Sperm kuyruğundaki axoneme ile solunum yolu üzerinde ki silyalı epitelin cilial hareketini sağlayan axoneme ile tamamen aynı yapıdadır. Spermatozoa kuyruk axoneme bozukluğu olan kişilerde bazen o kişinin silyalı epitelinde de fonksiyon bozukluğu olabilmektedir. Bu kişilerde flagellar hareketin fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak sinusit, otit ve bronşektazi rastlanabilmektedir. Bu tabloya situs inversus eklenmesi Kartagener sendromunu oluşturmaktadır (9). Biz hiçbir hastamızda Kartagener sendromu tanısı koyduracak bulgulara rastlamadık.

EM ile axoneme yapısı normal diğer hastalarda, bizim saptadığımız akrozom bölgesinde vakuolizasyon, spermatozoa boyun bölgesinde düzensizlik diğer araştırmacılar tarafından da saptanmıştır (10). Bu tip yapısal bozukluğun spermatozoonun fertilitate yeteneğini nasıl olumsuz etkileyebileceği bugün kesin olarak bilinmemektedir.

EM yapısal bozukluk saptayamadığımız izole asthenospermia vakalarında axoneme dynein kolcuklarda eksiklik, seminal plasma faktörlerinde eksiklik veya hücre içi biokimyasal olaylarda bozukluk (örn: protein carboxyl methylase eksikliği) sonucu asthenospermia ortaya çıktığını düşündük. Literatürde sperm hücre içi biokimyasal patolojilerde sperm hareketlerini engellediği gösterilmiştir (11). Bizim dynein kolcuklarına ait patolojileri saptayamayızın nedeni, elimizde olan ve kullandığımız elektron mikroskopu dynein kolcukları teknik yetersizliği nedeniyle görüntüleyememesiydi.

SONUÇ

İzole asthenospermia vakalarında varikosel, immünolojik infertilite ve enfeksiyon yok ise; spermatozoon kuyruk axoneme ait ultrastruktürel bozukluk hatırlanmalı ve tanısını koymak için (mümkünse yüksek rezolusyonlu) bir elektron

mikroskopu ile sperm kuyrukları incelenmelidir.

KAYNAKLAR

- 1) **John, D. McConnell.**: Abnormalities in sperm motility: Techniques of evaluation and treatment. in: Infertility in the male. Edited by: L.I. Lipshultz, S.S. Howards, 2. edition. Mosby Year Book, pp 254-276, 1991.
- 2) **Zamboni, L.**: Sperm structure and its relevance to infertility. Arch. Pathol Lab. Med. 116: 25, 1992.
- 3) **Johnson, K., Porter, M., Shimizu, T.**: Mechanism of force production for microtubule-dependent movements. J. Cell Biol 99: 132, 1984.
- 4) **Fawcett, D.W.**: The mammalian spermatozoon. Dev Biol 44: 394, 1975.
- 5) **Sigman, M., Lipshultz, L.I., Howards, S.S.**: Evaluation of the subfertile male in: Infertility in the male. Edited by: L.I. Lipshultz, S.S. Howards. 2nd edition, Mosby Year Book. chapt 9, pp 179-222, 1991.
- 6) **Larry, I., Lipshultz**: Subfertility in: Current Urological Therapy. Edited by Kaufman J., Philadelphia. W.B. Saunders, pp 399-404, 1980.
- 7) **Baccetti, B., Burrini, A.G., Pallini, V.**: 9+0 immotile spermatozoa in an infertile man. Andrologia 11: 437, 1979.
- 8) **Elliason, R., Mossberg, B., Camer, P.**: The immotile-cilia syndrom. N. Engl. J. Med. 297: 1, 1977.
- 9) **Atkin, R.J., Ross, A., Lees, M.M.**: Analysis of sperm function in Kartagener's syndrome. Fertil Steril 40: 696, 1983.
- 10) **Williamson, R.a., Koehler, J.K., Smith, W.D., Stenchever, M.A.**: ultrastructural sperm tail defects associated with sperm immotility. Fertile Steril 41: 103, 1984.
- 11) **Cagnon, C., Sherins, R.J., Philips, D.M., Bardin, C.W.**: Deficiency of protein-carboxyl methylase in immotile spermatozoa of infertile men. N. Engl. J. Med. 306: 821, 1982.

Editöryel Yorum

İzole asthenozoospermili hastalara subfertilite kliniklerinde az rastlanır, fakat bu hasta grubunun değerlendirilmesinde değişik testlerin yapılması süresini uzatır.

Benim algoritmimde yazarın izole asthenozoospermii'ye yaklaşımına ek olarak, seminal plazmanın etkisini ekarte etmek için ani difüzyon spermogramı ve transrektal ultrasonografi yer alır.

Yazarların 9 vakalık mini serileri sperm ultrastruktürünün motilitateye etkisini vurgulamaya yöneliktir; ancak axoneme'de motilitateyi en etkili birim dynein kollarıdır. Dynein total axonemal adenosine triphosphatase aktivitesinin % 75'ini sağlar. Bu nedenle spermatozoa'nın elektron mikroskopik tetkiki mutlaka iç ve dış dynein kolları incelemesini içermelidir.

Doç. Dr. Ateş Kadioğlu
İstanbul Tıp Fak. Üroloji A.B.D.