

Astenozoospermi Olgularında Semende Canlılık Testinin Değerlendirilmesinde Eozin ve HOS Testlerinin Karşılaştırılması

Elvan OK¹, Doğan ÖZYURT², Bülent GÜLEKLİ³

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Zonguldak Karaelmas University, Zonguldak, Turkey

²Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey

³Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey

Received 04 June 2008; received in revised form 28 July 2008; accepted 29 July 2008;

published online 18 November 2008

Abstract

Comparison of Eosin and HOS Test Methods in Assessment of Sperm Viability in Asthenozoospermia Cases

Objective: This study investigated whether one of the two viability tests is superior to the other in cases with asthenozoospermia (reduced sperm motility) in which the rate of immotile spermatozoa exceeded 50%.

Materials and Methods: A total of 21 male patients who visited the IVF (in vitro fertilization) unit of the Department of Obstetrics and Gynecology of Dokuz Eylül University Medical Faculty were included in the study. Semen samples were subjected to both macroscopic and microscopic examinations. Makler counting chamber was used for the sperm motility and concentration analyses. All semen samples were subjected to eosin viability test and HOS (hypo-osmolar swelling) test. The result of the eosin test was accepted as normal in the case of presence of 75% or more unstainable spermatozoa in a semen sample. The result of the HOS test was accepted as normal if swelling behavior were observed in more than 60% of the spermatozoa tails in a semen sample.

Results: Both tests yielded normal results in 10 cases, while the test results were found to be abnormal in 4 of the cases. In 7 cases, the HOS test yielded abnormal results, while the results of the eosin test were found to be normal. The binomial (sign test) statistical evaluation revealed that the two tests have no superiority over one another ($p>0.05$).

Discussion: The fact that the HOS test as a viability test yielded very similar results when compared to the eosin test demonstrates the significance of the HOS test in the sense that it is economic.

Keywords: asthenozoospermia, eosin test, HOS test, sperm motility

Özet

Amaç: Bu çalışmada, immotil spermatozoa sayısı %50'yi geçen astenozoospermi (sperm motilite düşüklüğü) olgularında iki canlılık testinin birbirine üstünlüğü olup olmadığı araştırıldı.

Materyal ve Metot: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran toplam 21 erkek çalışma kapsamına alındı. Semen örneği makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi. Sperm motilite ve konsantrasyon değerlendirmesi için Makler sayım kamerası kullanıldı. Tüm semen örneklerine eozin canlılık testi ve HOS testi (hypo-osmolar swelling test) birlikte uygulandı. Bir semen örneğinde %75 ya da daha fazla boya almayan sperm varlığında, eozin testi normal olarak değerlendirildi. Bir semen örneğinde spermlerin %60'ından fazlasında kuyruklarında şişme görüldüğünde ise HOS testi normal olarak kabul edildi.

Sonuçlar: On olguda her iki testte de normal sonuç alınırken, 4 olguda ise anormal sonuç elde edildi. Yedi olguda ise HOS testi anormal sonuç verirken, eozin testi normal olarak saptandı. Yapılan binomial (sign test) istatistiksel değerlendirmede testlerin birbirlerine üstünlüğünün olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Tartışma: Canlılık testi olarak HOS testinin, eozin testinden çok farklı sonuçlar vermemesi bu testin ekonomik olması açısından değer taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: astenozoospermi, eozin testi, HOS testi, sperm motilitesi

Corresponding Author: Dr. Elvan Ok
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD, Kozlu 67600 Zonguldak, Türkiye
Phone : +90 372 261 32 29
GSM : +90 532 303 81 61
E-mail : elvanok@karaelmas.edu.tr

Giriş

Sperm motilite bozuklukları (astenozoospermi) erkek infertilitesi nedenleri arasında önemli bir yer tutmaktadır (1-4).

Sperm motilitesi yeterli miktarda ATP, fonksiyonel aksone-mal dinein ATPazları ve aksonemlerin içinde yüzdükleri normal bir iyon ortamı gibi hücre içi faktörlerin karşılıklı etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Hareketliliğin başlatılması ve sürdürülmesinde bu faktörler temel gereksinimdir. Bu temel gereksinimi etkileyebilecek herhangi bir dış faktör hareketliliği bozmaktadır (1).

Sperm hareket bozukluklarına pek çok faktör neden olabilmektedir. Enfeksiyon, bakteri ve bakteri ürünleri, sitokinler, anormal spermatozoa gibi faktörler sperm hareketliliğini olumsuz olarak etkileyebilmektedir (1). Ancak semen analizinde immotil olarak değerlendirilen spermelerin tümünün ölü olduğu düşünülmemelidir. Bu nedenle, yüksek oranda immotil sperm içeren örneklerde boyama teknikleri ya da hipoozmatik şişme testi uygulanarak canlı sperm oranı saptanmaktadır (5).

HOS testi ile sperm hücre membranının işlevsel bütünlüğü hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Spermatozoa, hipoozmatik bir çözelti ile karıştırıldığında sperm kuyruğunda şişme şeklinde bir reaksiyon gözlenir (6). Eozin testinde ise ölü hücreler, hücre zarı geçirgenliği özelliğini kaybettiklerinden eozin boyasını hücre içine alarak kırmızı renge boyanır. Canlı hücreler ise boya almazlar (7).

İmmotil spermatozoa sayısı %50'yi geçerse canlılık testlerinin yapılması önerilmektedir. Canlı, ancak immotil olan hücrelerin büyük oranda varlığı, kuyruktaki yapısal defektlerin göstergesi olabilmektedir (3,4). Bu da tedaviye yaklaşım açısından önemlidir.

Materyal ve Metot

Çalışmanın tipi, kontrollü prospektif çalışmadır ve olgular Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Tüp Bebek Merkezi'ne başvuranlardan alınmış immotil spermatozoa sayısı %50'yi geçen toplam 21 semen örneği çalışma kapsamına alındı.

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 kapta toplandı. Semen lifefaksiyonu için 30 dakika beklendi. Tüm olgulara makroskopik değerlendirme yapıldıktan sonra mikroskopik değerlendirme ile sperm sayısı ve motilitesi değerlendirildi. Mikroskopik değerlendirme faz kontrast mikroskopu ile yapıldı.

Sperm hareketliliği ve konsantrasyon değerlendirmesi için Makler sayım kamerası kullanıldı Semen örnekleri 37°C'de bekletildi ve hareketlilik değerlendirmesi ejakülasyondan sonra 1 saat içinde oda sıcaklığında yapıldı. Sperm kon-

santrasyonu ve motil sperm yüzdesi DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) kriterlerine göre belirlendi (3,4). Her semen örneğinde 200 sperm sayıldı. Her bir sperm motilitesi 4 kategoride skorlandı: a) Hızlı ileri hareketli, b) Yavaş ileri hareketli, c) Yerde hareketli, d) Hareketsiz (immotil).

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

Semende canlı sperm yüzdesini saptamak için özel testler mevcuttur (4,5). Bu çalışmada canlılık testleri olarak eozin testi (Vital Screen-Fertipro, Beernem, Belgium) ile HOS testi (HOST test-Fertipro, Beernem, Belgium) kullanıldı.

Eozin testi boyama prosedürü

- 50 µl semen ile 2 damla A boyası steril test tüpünde karıştırıldı.
- 30 sn sonra bu karışıma 3 damla B boyası eklenerek tekrar karıştırıldı.
- B boyasının eklenmesini izleyen 30 saniye içinde semen boya karışımından 1 damla bir lama kondu ve ince bir smear olarak yayıldı.
- Yayıldıktan sonra üzerine lamel kapatıldı.
- Mikroskopta x400 veya x600 büyütürek incelendi.
- 100 sperm sayıldı.
- Kırmızı ya da total olarak beyaz görünmeyen hücreler ölü olarak kabul edildi.
- Sonuçlar canlı (beyaz) spermlemlerin yüzdesi olarak verildi.
- Bir semen örneğinde %75 veya daha fazla boya almayan sperm varlığında test normal olarak değerlendirildi (8,9).

HOS testi

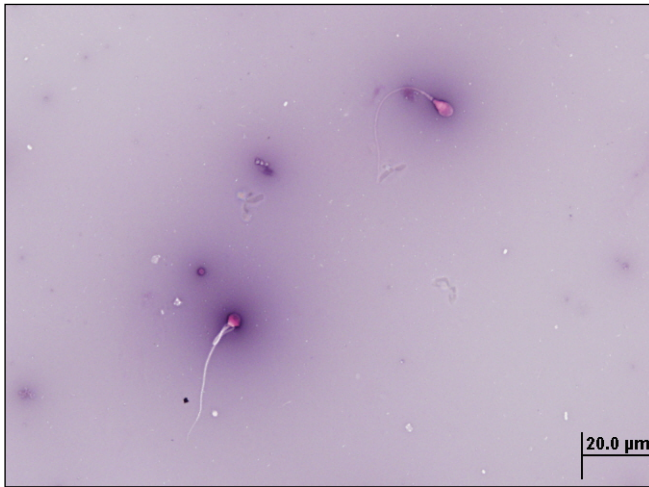
- Prosedür:
- 1 ml HOS solüsyonu ılındırıldı (37°C'de 5 dakika)
- Bu solüsyona 1 ml lifefaksiyon semen eklenerek pipetle karıştırıldı.
- 30 dakika 37°C'de tutuldu.
- Mikroskopta bakıldı.
- 100 sperm sayıldı.
- Kuyruk kıvrılması olan spermlemler ölü; kuyruk kıvrılması olmayan spermlemler canlı kabul edildi. Bir semen örneğinde spermlemlerin %60'ından fazlasında kuyruklarında şişme görüldüğünde HOS testi normal kabul edildi (8).

Çalışma, Helsinki deklarasyonu prensiplerine (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) uygun olarak yapılmış olup bu çalışmanın etik kurul onayı bulunmaktadır.

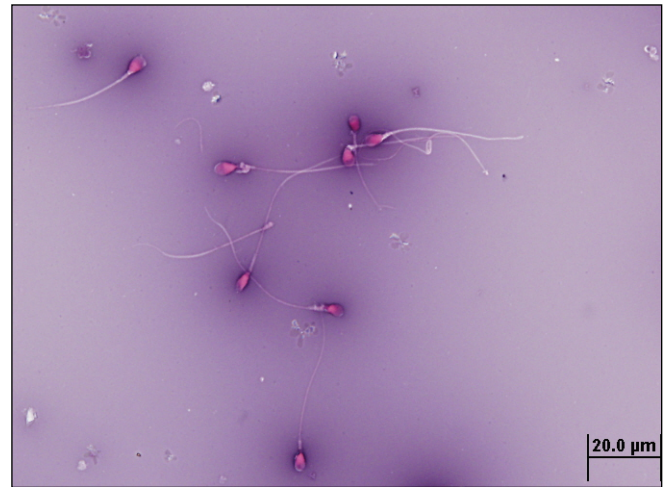
Eozin canlılık testi ile HOS testinin karşılaştırılmasında binomial (sign test) kullanılmıştır.

Tablo 1. İncelenen semen örneklerinde HOS ve eozin testlerinin karşılaştırılması

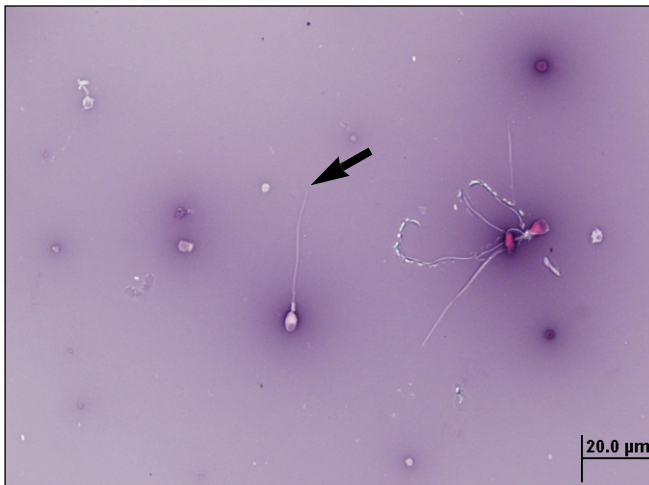
		Canlılık testi bakılan semen örneği				Toplam Sayı (%)	
		Test sonucu normal Sayı (%)		Test sonucu anormal Sayı (%)			
Her iki canlılık testi ile paralel sonuç alınanlar	Eozin testi	10	71.42	4	28.58	14	100
	HOS testi	10	71.42	4	28.58	14	100
Sonuçların uyumsuz olduğu olgular	Eozin testi	7	100	0	0	7	100
	HOS testi	0	0	7	100	7	100



Resim 1. Eozin testi ile boyanmış semen örneğinde 2 ölü sperm (x400).



Resim 3. Eozin testi ile boyanmış semen örneğinde ölü sperm (x400).



Resim 2. Eozin testi ile boyanmış semen örneğinde 2 ölü ve okla gösterilen 1 canlı sperm (x400).

Sonuçlar

Canlılık testlerinin karşılaştırılmasında 21 olguya HOS ve eozin testleri birlikte uygulandı. On olguda her iki testte de pozitif sonuç alınırken, 4 olguda negatif sonuç elde

edildi. Yedi olguda ise HOS testi sonucu negatifken, eozin testi pozitif olarak saptandı (Tablo 1, Resim 1-3). Yapılan binomial (sign test) istatistiksel değerlendirmede testlerin birbirlerine üstünlüğü olmadığı saptandı.

Tartışma

Sperm canlılık testi değerlendirmesi, özellikle tüp bebek merkezlerinde olgunun ICSI (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) için yönlendirilmesinde oldukça önemlidir. Yapılan bir çalışmada, kullanılan iki testten biri olan HOS testinin astenozoospermi olgularında sperm canlılığını gösterebilen bir test olduğu sonucuna varılmıştır (10).

Tartagni ve arkadaşlarının 2002 yılında yayımlanan bir çalışmasında, normal semen parametreleri olan, ancak subnormal HOS testi skorlarına sahip erkeklerin eşlerinde çok düşük oranda gebelik olduğu görülmüştür (11).

Domuz ve boğa spermeleri üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, nükleik asit boyaları propium iodide ve Hoechst 33258 ile eozin karşılaştırılmış ve anlamlı farklılık bulunmuştur. Propium iodide diğer boyalara göre daha fazla sayıda boyalı yani ölü hücre göstermiştir (12).

Canlılık testleri ejakülatta, epididimis ve testisten alınan dokularda ya da dondurulup çözülmüş örneklerde canlı spermi belirlemede önemli testlerdir. Ancak Eozin-Y spermi öldürdüğü için ICSI sikluslarında kullanımı uygun değildir (13).

Salam ve arkadaşlarının, erkek partnerlerde non-obstrüktif azospermi saptanan 79 çift üzerinde yaptıkları bir çalışmada 44 erkeğe modifiye HOS testi (%50 kültür mediumu + %50 distile su) uygulanmış, 35 erkeğe ise HOS testi uygulamadan sadece spermin morfolojisine bakılarak ICSI yapılmıştır. İmmotil testiküler spermler arasında canlı sperm seçimi ile modifiye HOS testi uygulanan grupta fertilizasyon, gebe kalma ve devam eden gebelik oranları daha yüksek bulunmuştur (14). Semen analizinde çok önemi olmayan, ancak, özellikle ICSI uygulanacak olgularda hücreye daha az zarar vermesi açısından modifiye HOS testinin tercih edilmesi söz konusudur.

Bizim çalışmamızda da, sperm canlılığını değerlendirmede HOS ve eozin testlerinin birbirine üstünlüğü saptanmamıştır.

Canlılık testleri olan eozin ve HOS testlerinin istatistiksel olarak paralel sonuçlar vermeleri özellikle daha ucuz ve daha güvenli olan HOS testinin tercihinin gündeme getirmelidir. Canlılık testlerinden ticari olarak satılan HOS testinin, eozin testinden çok farklı sonuçlar vermemesi, HOS testinin ekonomik olması açısından değer taşımaktadır.

Teşekkür

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

Makalenin istatistiksel değerlendirilmesinde katkıda bulunan Illinois State Üniversitesi'nden Doç. Olcay Akman'a ve

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi çalışanlarına teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. http://www.androloji.info/motilite_bozukluklari_disfaktorerler.php (son erişim tarihi: 03.06.2008)
2. www.androloji.org.tr/images/file/Infertil%20hastaya%20tanisal%20yaklasim.doc – (son erişim tarihi: 03.06.2008)
3. WHO Laboratory manuel for the examination on human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999;76:4-33.
4. Günalp S (Çev Ed). WHO laboratuvar el kitabı insan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. Ankara: Tıp Teknik Kitabevi; 2002;76:4-33.
5. Enginsu E. Erkek infertilitesinde tanıya yönelik testler ve sperm hazırlama protokolları. Delilbaşı L, editör. In vitro fertilizasyon laboratuvar yöntemleri. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri 2008;66-71.
6. Yıldırım A. İnfertil erkekte laboratuvar incelemeleri ve IVF ve ICSI için sperm hazırlığı. Hassa H, editör. İnfertil olgularda klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Basımevi 2003:155.
7. Vicdan K, Işık AZ. In vitro fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. Ankara: Çağdaş Medikal Kitabevi 1999.
8. <http://www.aksuvar.com/frameset.htm> (son erişim tarihi: 03.06.2008)
9. Günalp S, Orhon Esat, Özgür K, Seçkin B, Tarcan T. Türk Androloji Rehberi 2004.
10. Buckett WM. Predictive value of hypo-osmotic swelling test to identify viable non-motile sperm. Asian J Androl 2003;5(3):209-12.
11. Tartagni M, Schonauer MM, Cicinelli E et al. Subnormal hypo-osmotic swelling test scores as an important cause of cryptic infertility. Journal of Andrology 2002;23(4):498-502.
12. Pintado B, de la Fuente J, Roldan ERS. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eozin: accuracy in the assessment of cell viability. Journal of Reproduction and Fertility 2000;118:145-52.
13. Khalili MA, Mir-Rokni F, Kalantar SM. Application of vitality tests on asthenozoospermic semen from infertile men. Iran Biomed J 1999;3:77-81.
14. Salam HN, Farrag A, Agameya AF, El-Garem Y, Ezeldin F. The use of the modified hypo-osmotic swelling test for the selection of immotile testicular spermatozoa in patients treated with ICSI: a randomized controlled study. Hum Reprod 2005;20(12):3435-40.



**Online manuscript
submissions and
peer review
(JournalAgent)**

Available at
J Turkish German Gynecol Assoc
www.jtgga.org

www.journalagent.com