



WHO-2010 Kriterlerine Göre Semen Parametreleri Neler Değişti?

Gülşen Aktan

İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı
Androloji Bilim Dalı

Dünya Sağlık Örgütü El Kitabı

- “The WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction” başlıklı el kitabı ilk kez 1980 yılında basılmıştır.
İkinci basım 1987
Üçüncü basım 1992
Dördüncü basım 1999
Beşinci basım 2010 “WHO laboratory manual for The Examination and processing of human semen”

İnsan Semeninin İncelenmesi ve İşlenmesi

Yeni kanıtlar ve veriler



WHO laboratory manual for
The Examination and processing of human semen



Teknisyen ve bilim adamları için
metotların detaylı açıklanması



Alternatif metotlar

Parametre	WHO 1999	WHO 2010
Semen hacmi (mL)	≥ 2	1,5
Toplam sperm (10^6 /ejakulate)	40	39 (33–46)
Sperm sayısı/ ml (10^6 / ml)	20	15 (12–16)
Total motilite (a+b) (%)	>50	40 (38–42)
Hızlı ileri hareketli,%	25	32 (31–34)
Vitalite (canlı spermatozoa, %)	75	58 (55–63)
Sperm morfoloji (normal form, %)		4 (3.0–4.0)
pH	≥ 7.2	≥ 7.2
Peroxidaz-pozitif lökosit (10^6 /ml)	<1.0	<1.0

Referans deęerlerin oluřturulması

- Üç kıta sekiz ÷lke
- Değerlendirilen semen sayısı 900
- Deęerlendirilmeye alınan erkekler
 - Eřleri 12 ay veya daha kısa sürede gebe kalmış
- Cinsel perhiz süresi 2-7 günlük perhiz
- Ejak÷lat volumu gravimetrik yöntem
- Motilite ileri hareketli,
yerde hareketli
hareketsiz
- Morfoloji kesin kriterlere göre deęerlendirilmiřtir

Cinsel Perhiz

Refleksojenik Ereksiyon + Visuel seksuel Stimulasyon

Semen

5 dakika

Sıvılaşıma için (37 °C)

İlk 30-60 dakika

Makroskopik analiz
Mikroskopik analiz

- sayı
- Motilite
- Vitalite
- Yuvarlak hücre
- Lökosit
- Morfoloji için yayma

Semen Santrifüjü
İmmunobead Test

İlk 3 saat

Mikrobiyolojik
incelemesi

İlk 4 saat

Morfoloji
boyanma-değerlendirme

Sonraki gün

Gerekli olduğunda
Dondurulan örnekte
Yardımcı bez işlevlerinin
değerlendirilmesi
indirekt immunobead

Semen Toplanması

Analiz için semen alma yeri

Laboratuvar yakınında (ideal olarak)
Özel bir odada

Alınış metodu
Cinsel Pehiz süresi

masturbasyon
2- 7gün

Toplama kabı

temiz, geniş ağızlı
cam veya plastikten yapılmış
sperm için toksik olmayan

Saklama koşulu

Numune kabı 37 C de sıvılaşıana kadar

Isı değişiklikleri olmamalıdır

Semenin tamamı örnek alma kabı içine toplanmalı

Örnek tam alınmadıysa 2-7 günlük cinsel pehiz periyodu ile ikinci örnek alınmalıdır.

Semen Analizi

Makroskopik Analiz

- Sıvılaşma süresi
- Viskozite
- Renk
- Hacim
- pH

Mikroskopik Analiz

- Sayı
- Motilite
- Canlılık
- Yuvarlak hücre →Lökosit
- Morfoloji

Makroskopik Analiz

- Sıvılaşma süresi
- Viskozite
- Renk
- Hacim
- pH

Sıvılaşma

Ortalama 15 dk (0-60 dk)

Koagülasyon



Semenogelin proteini
(seminal vezikül)

Likefaksiyon



Prostatik enzim

Sıvılaşma

Sıvılaşmayan rneklerde ;

Ejakülasyon sonrası 60 dk içinde Sıvılaşma (-)

Fizyolojik solusyonu

Eřit hacimde salinde
Dulbecco fosfat
tamponu ilavesi

Mekanik iřlem

Pipete veya enjektöre çekip
bırakma
6-10 kez 18 gauge veya 19
gauge iğneye

Enzimatik

1 g/l bromelin,
0.5 cu/ml plasmin
veya
10 IU/ml bromelain

Makroskopik Analiz

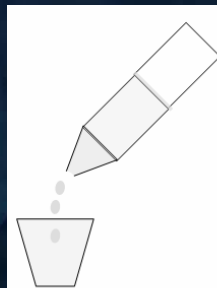
- Sıvılaşma süresi
- Viskozite
- Renk
- Hacim
- pH

viskozite

- Semen in yerçekimi etkisiye damla damla akması
 - Pipet (1,5 mm çapında)
 - Cam çubuk
- Değerlendirme
- Semen damlasındaki uzama

< 2cm normal

> 2cm anormal



Makroskopik Analiz

- Sıvılaşma süresi
- Viskozite
- Renk
- Hacim
- pH

Renk

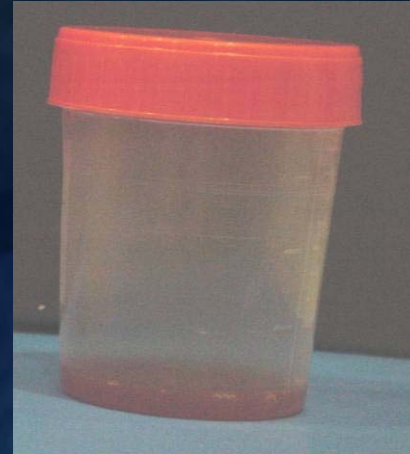
Normal semen

homojen, gri ve opak.



Eritrosit varlığı

kırmızı kahverengi



Makroskopik Analiz

- Sıvılaşma süresi
- Viskozite
- Renk
- Hacim
- pH

Semen volumu

Volum > 2 ml

- Volum $> 1,5$ ml

WHO 99

WHO 2010

Semen hacminin belirlenmesi

- Tavsiye edilen
 - gravimetrik yöntem
 - Örneğin dereceli geniş ağızlı kaba alınması
- Volümün aspire edilerek ölçülmesi tavsiye edilmemektedir
 - 0,3-0,9 ml kadar eksik ölçülmektedir.

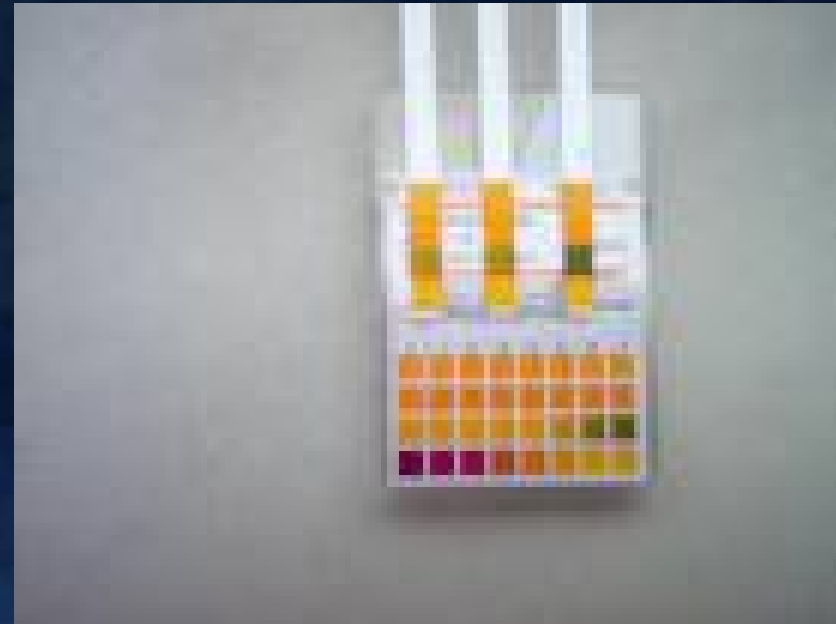


Makroskopik Analiz

- Sıvılaşma süresi
- Viskozite
- Renk
- Hacim
- pH

Semen pH

- Semen pH sı farklı yardımcı bez sekresyonları başlıca alkali seminal veziküler sekresyon ve asidik protatik sekresyonun ph değerleri arasındaki dengeyi gösterir.
- Likefaksiyon sonrası
 - Tercihen 30 dk
 - Mutlak 1 saat içinde
- Viskoz örnekler için pH metre
- referans değer pH > 7,2



Mikroskopik Analiz

- Sayı
- Motilite
- Canlılık
- Yuvarlak hücre → Lökosit
- Morfoloji

İlk mikroskopik inceleme

- Semen hacmi 10 μ l
- Lamel boyutu 22x22
- Derinlik 20 μ m
- Deęerlenirmeler 37°C



İlk Mikroskopik İnceleme

- Agregasyon veya aglütinasyon
- Sperm dışı hücrelerin varlığı
- Motilite
- Uygun dilusyon derecesi belirlenir.

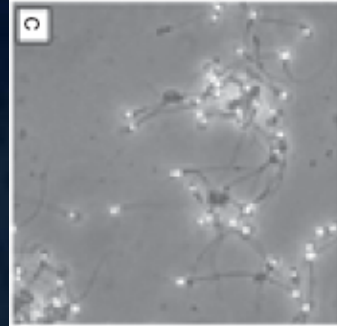
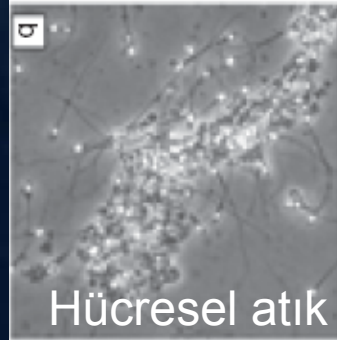
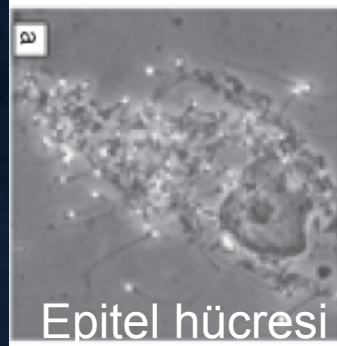
Agregasyon

Hareketli veya hareketsiz spermilerin

- Mukus iplikleri
- sperm dışı hücreler,
- hücresel atıklara bağlanma

WHO 99

WHO 2010



Sperm aglütinasyonu

Hareketli spermlerin birbirine yapışarak bir arada bulunması

Aglütinasyon (-)






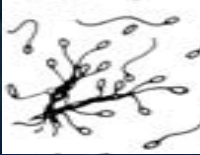


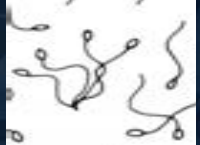






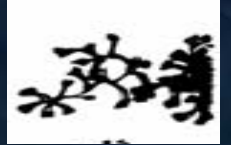






Aglütinasyon (+)

Aglütinasyon (++)

Aglütinasyon (+++)

grade 1: isolated (seyrek)	aglütinasyon başına ayrılmış sperm <10 spermatozoa, spermlerin çoğu serbesttir.
grade 2: orta	aglütinasyon başına 10-50 sperm, serbest sperm
grade 3: geniş	agglutinasyon >50 spermatozoa, bazı spermatozoalar serbest
grade 4: gross (bütün)	Bütün spermatozoalar aglutine olmuş ve bağlantılar arası aglutinasyon

Bölümlerin içeriği	grade 1: isolated (seyrek)aglutinasyon başına ayrılmış sperm <10 spermatozoa, çoğu spermatozoa	grade 2: orta aglutinasyonbaşına 10-50 sperm, serbest sperm	grade 3: geniş agglutinasyon >50 bazı Spermatozoalar Hala serbest spermatozoa	grade 4: gross (bütün) Bütün spermatozoalar aglutine olmuş vr bağlantılar arası aglutinasyon
A- Baş başa				
B- Kuyruk kuyruğa Başlar serbest görünür ve aglutinatların hareketi nettir)				
C. kuyruk ucu kuyruk ucuna				
D- karışık (baş-başa ve kuyruk kuyruğa aglutinasyonlar nettir.)				
E. Dolaşmış Baş ve kuyruk ağ gibi sarılmış . aglutinatlarda baş net değil çünkü kuyruk kuyf-ruğa aglutinasyon				

Mikroskopik Analiz

- Sayı
- Motilite
- Canlılık
- Yuvarlak hücre → Lökosit
- Morfoloji

Sperm Sayısı/ml

Spermatozoa sayısı/ml = 20×10^6

Spermatozoa/ml 15×10^6

Toplam sperm sayısı 39×10^6

Toplam sperm sayısı = 40×10^6

WHO 99

WHO 2010

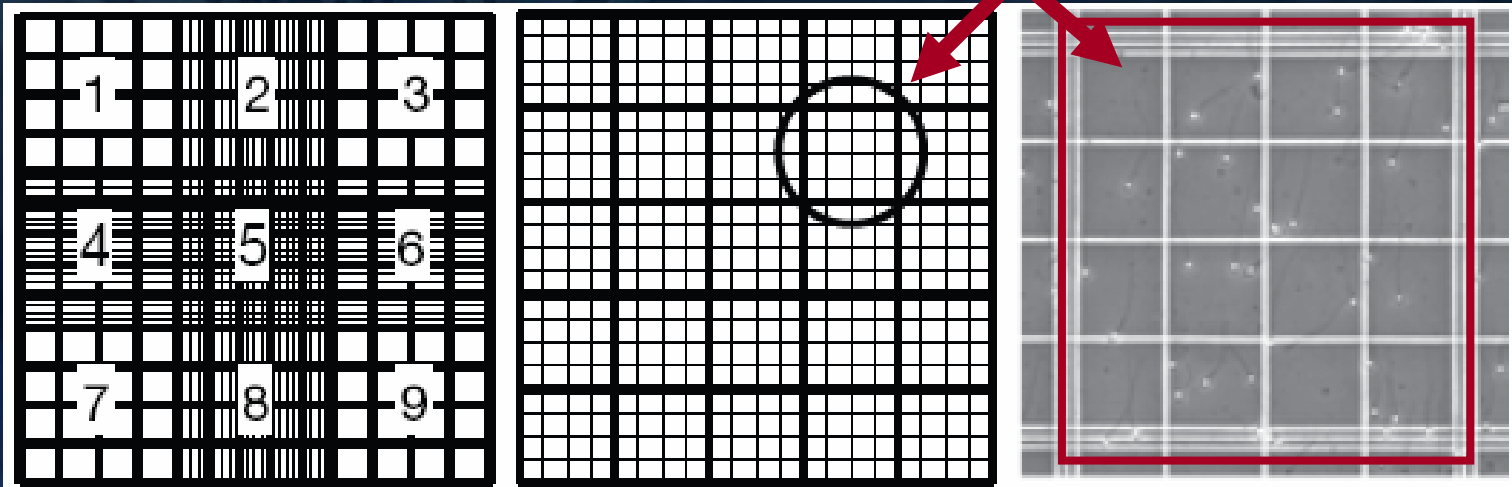
Sperm sayımı

- Sayım kamara tipi
- Kullanılacak Hemasitometrinin derinliği 100 μ m olmalıdır.
- Kullanılacak olan kamaranın hesabı için farklı faktörler gerekebilir.
- Alternatif kullanılacak sayım kamaralarının sonuçları Improved Neubauerden alınanlar ile kontrol edilmelidir.

Sperm sayımı

İmprover Neubauer kamara

- Toplam 9 kare
- Merkez kare 5x5 büyük kareden oluşur
- Her büyük kare 16 küçük kare içerir
- 9 karenin her biri 100 nl hacimdedir.

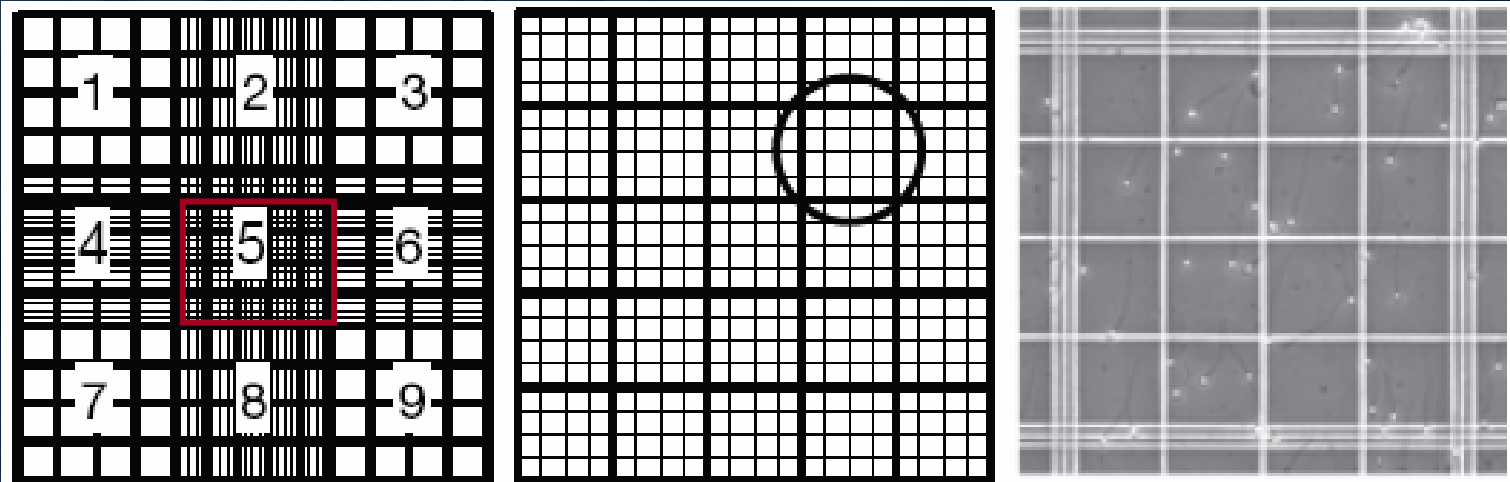


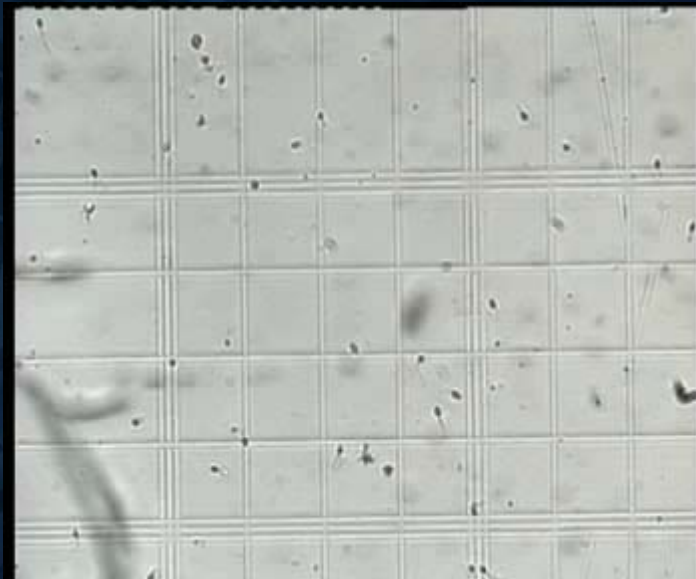
semen dilusyon oranları ve deęerlendirilecek potansiyel alanlar

400x alandaki sperm sayısı	200x alandaki sperm sayısı	Gerekli olan dilusyon	Semen μ l	Fikstatif μ l	Sayım kamarası	Deęerlendirilecek alanlar Karelerin numarası
>101	>404	1:20 (1+19)	50	950	Improved Neubauer	5, 4, 6
16–100	64–400	1:5 (1 + 4)	50	200	Improved Neubauer	5, 4, 6
2–15	8–60	1:2 (1 + 1)	50	50	Improved Neubauer	5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1 +1)	50	50	Improved Neubauer Veya fazla volüm	9 karenin hepsi Tüm mikroskop lamı

Sperm konsantrasyonu

- Sperm konsantrasyonunu belirlemek için uygun dilusyon yapıldıktan sonra en az 200 hücre sayılır.
- Öncelikle 5 numaralı merkez kare sayılır, hücre sayısı tamamlanmazsa 4 ve 6 sayılır.





- Sperm konsantrasyonu=

$$\frac{\text{toplam sayılan sperm}}{\text{değerlendirilen sıra sayısı}} \times \frac{1}{\text{bir sıranın hacmi}} \times \text{Dilusyon oranı}$$

- Her semen analizinde en az 2 kez dilue edilmiş semen hazırlanır ve sayım yapılır.
- İki sayımın toplamı ve farkı alınır
- Tablodan uygunluğu kontrol edilir
- Gerekirse tekrar dilue örnek sayılır

Toplam	Kabul edilebilir fark
144–156	24
157–169	25
170–182	26
183–196	27
197–211	28
212–226	29
227–242	30
243–258	31
259–274	32
275–292	33
293–309	34
310–328	35

Toplam	Kabul edilebilir fark
329–346	36
347–366	37
367–385	38
386–406	39
407–426	40
427–448	41
449–470	42
471–492	43
493–515	44
516–538	45
539–562	46
563–587	47

**Based on the rounded 95% confidence interval.*

Örnek

Sulandırma oranı:1/20

I. Sayım : 201 sperm

Sayılan sıra 7

II. Sayım 245

Sayılan sıra :7

201+245=446

245-201 =45

Toplam sıra 14

Tekrar sulandırma ve 2 sayım

Toplam	Kabul edilebilir fark
329-346	36
347-366	37
367-385	38
386-406	39
407-426	40
427-448	41
449-470	42
471-492	43
493-515	44
516-538	45
539-562	46
563-587	47

Örnek

Sulandırma oranı:1/20

I. Sayım : 220 sperm

Sayılan sıra 4

II. Sayım 218

Sayılan sıra =4

201+245=438

245-201 =2

Toplam sıra =8

Ml de sperm

$(438/8) \times (1/20) \times 20 = 55 /nl = 55 \times 10^6$

Toplam	Kabul edilebilir fark
329-346	36
347-366	37
367-385	38
386-406	39
407-426	40
427-448	41
449-470	42
471-492	43
493-515	44
516-538	45
539-562	46
563-587	47

Kriptozoospermi Değerlendirilmesi

- İlk mikroskopik incelemede spermatozoa (-)



3000 g 15 dk santrifuj

- Pellette spermatozoa (+) ⇒

Toplam sperm

sayısı

Motilite karakteri

Canlı sperm

sayısı

Mikroskopik Analiz

- Sayı
- Motilite
- Canlılık
- Yuvarlak hücre → Lökosit
- Morfoloji

Sperm Hareketi

Referans deęerler

- A. Hızlı ileri hareketli $\geq \%25$ } **%50**
- B. Yavaş ileri hareketli
- C. Yerinde hareketli
- D. Hareketsiz
- İleri hareketli } **%32**
- Yerinde hareketli
- Hareketsiz
- %40**

Sperm Hareketi

- Sıvılaşımdan sonra 60 dk içinde
 - Tercihen 30 dk içinde değerlendirilir.
- Oda sıcaklığında veya 37 C de
- 20 μm derinlikte ve 200X veya 400X büyütmeye
- Toplam 200 hücre sayılarak

Motilite

- A. Hızlı ileri hareketli (25 μ m/sn)
- B. Yavaş ileri hareketli
- C. Yerinde hareketli (5 μ m/sn)
- D. Hareketsiz

WHO 99

- **İleri hareketli**

- Hızı ne olursa olsun Spermin aktif olarak hareketi hem lineer hemde geniş dairesl.

- **Yerinde hareketli**

- İlerlemenin olmadığı motilitenin tüm modelleri
- küçük daire içinde yüzme,

- **Hareketsiz**

WHO 2010



Hızlı İleri Hareketli



Yavaş İleri Hareketli



Yerinde Hareketli

Mikroskopik Analiz

- Sayı
- Motilite
- Canlılık
- Yuvarlak hücre → Lökosit
- Morfoloji

Sperm canlılığı

- Sperm canlılığı hücrenin membran bütünlüğü ile tanımlanır
- Toplam 200 hücre sayılarak canlı sperm oranı belirlenir.

- Rutin olarak tüm semen örneklerine yapılmalı

Hareketsiz sperm oranı $> \%50$



canlılık testi

İleri hareketli sperm $\leq \%40$ ise



canlılık testi

WHO 99

WHO 2010



Eosin Y



Eosin-Nigrosin



HOS test

Sperm Canlılığı

•Referans değer

- Boyama testleri
 - Eosin > %75 canlı
 - Eosin-nigrosin > %75 canlı
- Hipoosmotik şişme testi
 - Canlılık oranı \geq %60 normal
 - Canlılık oranı < %50 anormal

WHO 1999

•Referans değer

- Boyama testleri
 - Eosin %58 canlı
 - Eosin-nigrosin %58
- Hipoosmotik şişme testi %58

WHO 2010

Mikroskopik Analiz

- Sayı
- Motilite
- Canlılık
- Yuvarlak hücre → Lökosit
- Morfoloji

Yuvarlak Hücre

- Sperm dışı hücreler
 - Epitel ve prostat hücreleri,
 - Spermatogenik hücreler
 - Lökosit
 -
 - Yuvarlak hücre sayısı $< 5 \times 10^6$
- } Yuvarlak hücre

Lökosit

- Ejakülattaki lökositler özellikle **nötrofillerden** oluşur.
- Lökositlerin fazlalığı;
 - Enfeksiyon
 - Ejakülat hacminin azalması
 - Oksidatif stress nedeni ile sperm fonksiyonunun bozulması
- Normal semende → Lökosit sayısı < 1 milyon/ml
- Yuvarlak hücre sayısı $> 1 \times 10^6$ ise lökosit tanıma testi yapılır

Lökosit

Lökosit sayısını belirlemede kullanılan teknikler:

1. İntrasellüler peroksidaz varlığı
2. Lökosit spesifik antijen

İntrasellüler peroksidaz varlığına dayalı testte ;

Lökositler (nötrofiller) ortama ilave edilen benzidin ve hidrojenperoksitle kahverengiye boyanır.

Endtz Test

Stok Solusyon

% 96 Etanol	25 ml
Benzidin	0.0625 g
Distile su	25 ml

Hazırlanan solusyon +4-6 C de 6 ay saklanır.

Çalışma solusyonu

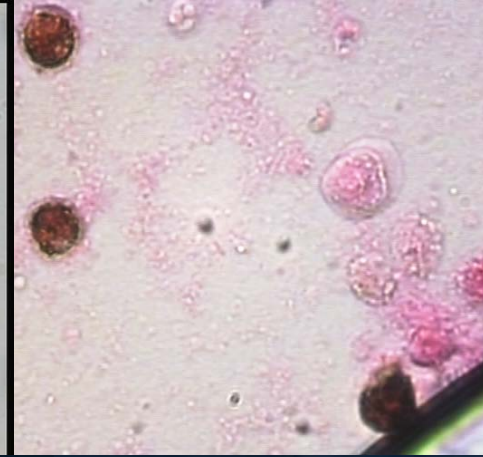
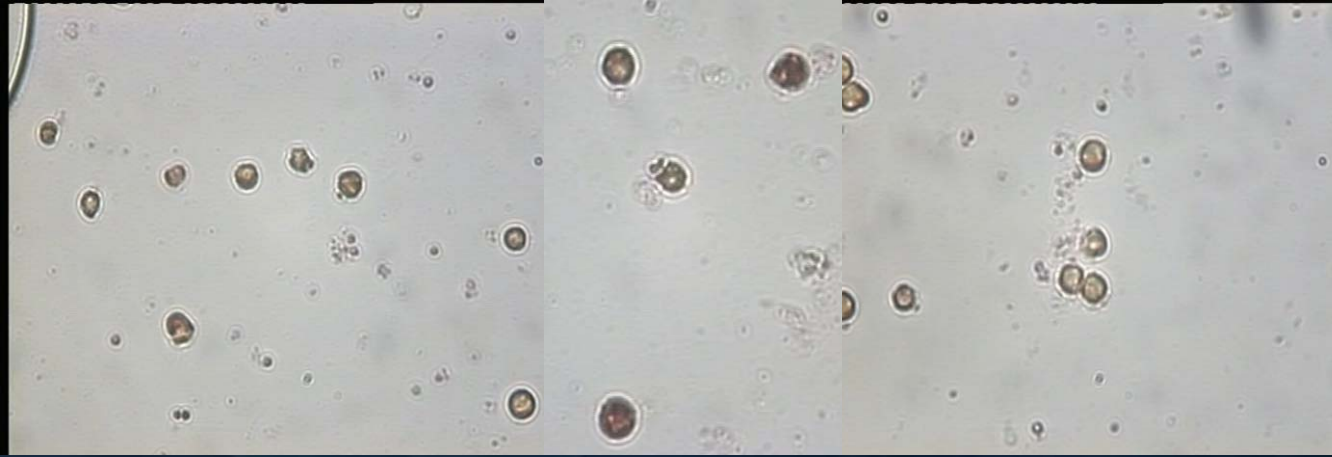
4 ml stok solusyon +50 µl % 3 H₂O₂

Çalışma

20 µl semen

20 µl yıkama solusyonu

40 µl çalışma solusyonu



Mikroskopik Analiz

- Sayı
- Motilite
- Canlılık
- Yuvarlak hücre → Lökosit
- Morfoloji

Morfoloji

- Normal $> \%30$
WHO 92

- Normal $\geq \%4$

WHO 2010

- Normal $< \%15$ ise
IVF de başarı
düşüktür

WHO 99



Parametreler	WHO 1999	WHO 2010
Baş		
Genişlik	2.5-3.5µm	2.8 µm
Uzunluk	4.0-5.0 µm	4.1 µm
boy/en	1,5-1,75	1,5
Akrozomal bölge	%40-70 kaplamalıdır	
Boyun ve orta parça		
Genişlik	< 1.0µm	0.6 µm
Uzunluk	Baş uzunluğunun 1,5 katı	4.0 µm
Sitoplazmik atıklar	normal baş alanı < 1/3	
Kuyruk		
Uzunluğu	~45 µm	
Genişliği	< orta parça	

•Papanicolaou boyama ve bilgisayar sistemi ile ortalama sperm ölçüleri

Morfoloji

Genişliği < orta parça
Düz

- Baş
- Oval
- Akrozomal bölge %40-70
- Vakuol sayısı < 2
- Vakuol başın kapldığı alanın %20 sinden az
- Postakrozomal bölgede vakuol olmamalıdır.
- Kuyruk kırık , kıvrık olmamalıdır
- Kuyruk 360° dönmemelidir.

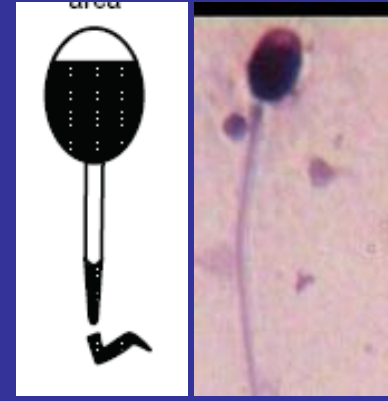
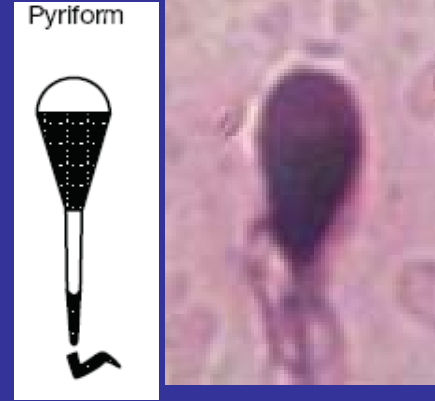
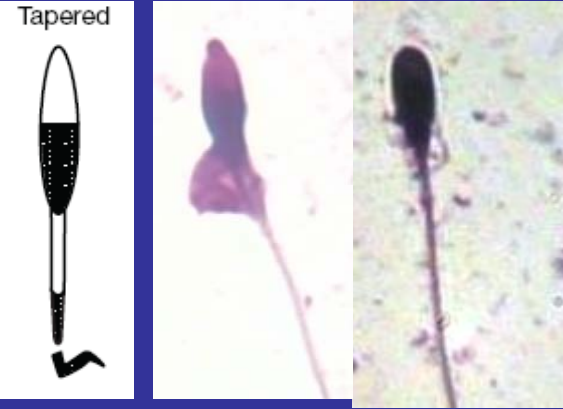


Normal Baş



Baş Defektleri

Küçük Akrozom



Yuvarlak Baş

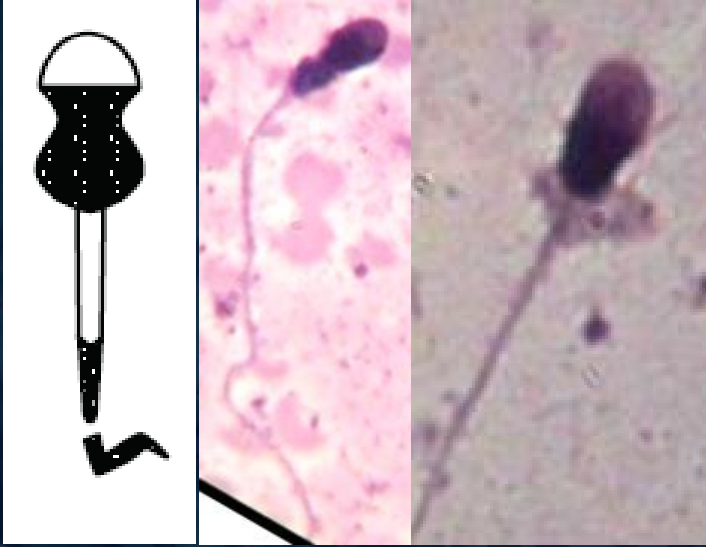
Akrozomsuz baş



Küçük Akrozom



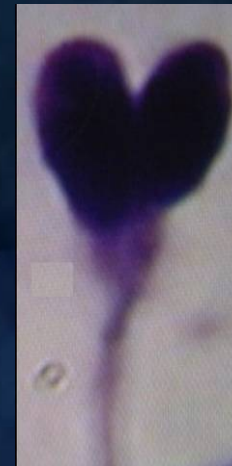
Amorf Baş



Vakuol

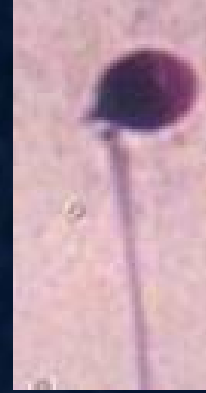
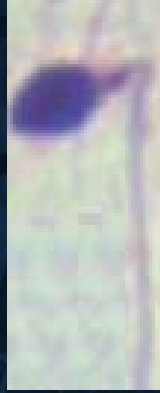
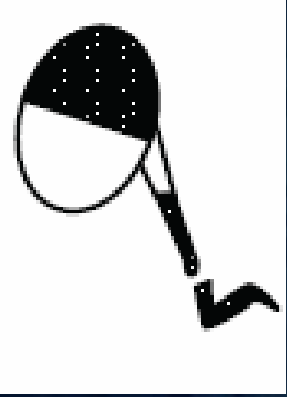


Çift Baş



Boyun ve Orta Para Defektleri

Kırık boyun

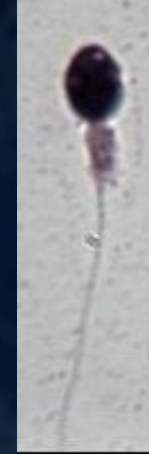
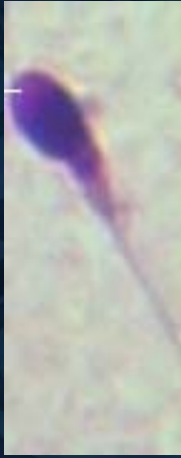
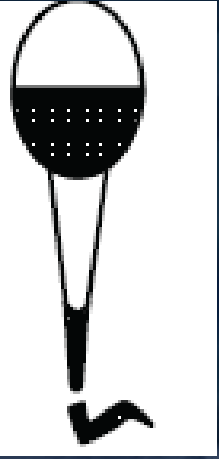


İnce boyun

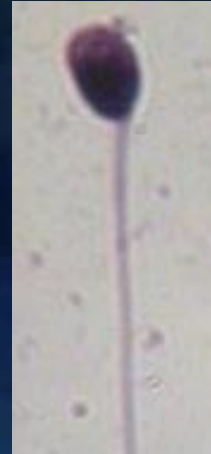
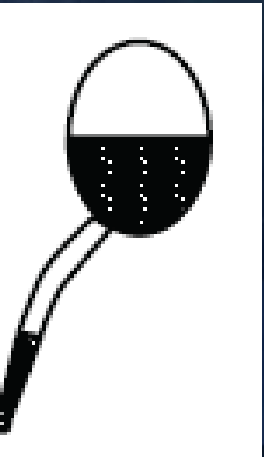


Boyun ve Orta Para Defektleri

Kalın boyun

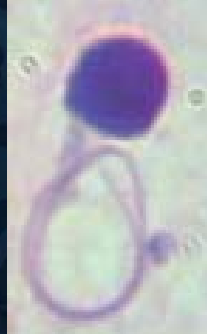


Asimetrik

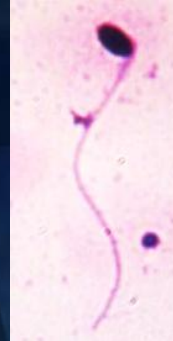
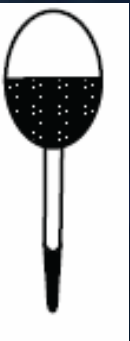


Kuyruk Defekti

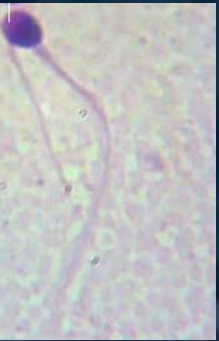
Halka (coiled) kuyruk



Kısa kuyruk



Kalın kuyruk



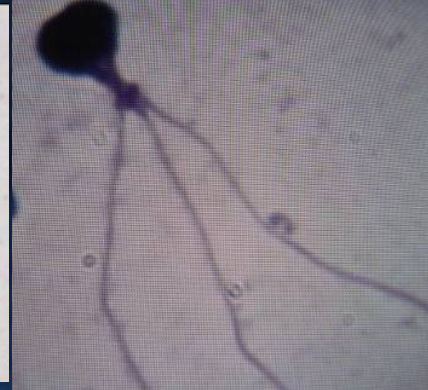
Kırık kuyruk



Sitoplazmik Damla



İki veya daha fazla kuyruk



Özel defektler



Başsız kuyruk
İğne baş



Kuyruksuz baş

- Sayı, motilite ve morfoloji belirlerken, baş ve kuyruğu bütünü içinde olan spermler değerlendirilir
- Bunlar anormal olarak değerlendirilmez
- Gerekli durumlarda sayıları rapor edilir.

Boyalı preparatta Lökosit



Bilgisayar yardımlı semen analizi

- Gelişen teknoloji ile beraber geliştirilen bilgisayar yardımlı semen analizi sistemleri sperm hareketliliği ve morfoloji tespitinde kullanılabilir.