

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİLİ HASTALARDA
EJEKÜLATA VE TESE MATERYALİNDE BAKILAN PCNA
VE LİM-15 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN TESE'DE
SPERM BULMA KONUSUNDA PREDİKTİF DEĞERİ**

Dr. Muhammed Arif İBİŞ

**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

ANKARA – 2020

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**NON-OBSTRUKTİF AZOSPERMİLİ HASTALARDA
EJEKÜLATTA VE TESE MATERYALİNDE BAKILAN PCNA
VE LİM-15 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN TESE'DE
SPERM BULMA KONUSUNDA PREDİKTİF DEĞERİ**

Dr. Muhammed Arif İBİŞ

**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kaan AYDOS

**Etik Kurul No: 03-154-18
Etik Kurul Karar Tarihi: 12.02.2018**

ANKARA – 2020

KABUL VE ONAY

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı	: Dr. Muhammed Arif İBİŞ
Anabilim/Bilim Dalı	: Üroloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Kaan AYDOS
Sınav tarihi: ..25... / ..11... / 2019...	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Non-Obstruktif Azospermili Hastalarda Ejekülatta ve TESE Materyalinde Bakılan PCNA ve LİM-15 Gen Ekspresyon Düzeylerinin TESE’de Sperm Bulma Konusunda Prediktif Değeri	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin “Tıpta Uzmanlık Tezi” olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Kaan AYDOS (Üroloji Anabilim Dalı)

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Çağatay GÖĞÜŞ (Üroloji Anabilim Dalı)

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ahmet Hakan HALİLOĞLU (Ufuk Üniv. Tıp Fak.
Üroloji Anabilim Dalı)

TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda 5 yıllık uzmanlık eğitimim boyunca, mesleki deneyim ve tecrübelerini bizlerden esirgemeyen, kendisini örnek almaktan onur duyduğum, tez konusu seçiminden yazımın son aşamasına kadar destek ve emeğini eksik etmeyen tez danışmanım ve değerli anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Kaan AYDOS'a,

Eğitimim süresince bilgi ve becerilerinden her zaman istifade ettiğim, mesleki kariyerimin oluşmasında katkıları olan Prof. Dr. Mut ŞAFAK, Prof. Dr. Yaşar BEDÜK, Prof. Dr. Sümer BALTACI, Prof. Dr. Önder YAMAN, Prof. Dr. Kadir TÜRKÖLMEZ, Prof. Dr. Tarkan SOYGÜR, Prof. Dr. Çağatay GÖĞÜŞ, Prof. Dr. Berk BURGU, Doç. Dr. Eriz ÖZDEN, Doç. Dr. Ömer GÜLPINAR, Doç. Dr. Evren SÜER ve Doç. Dr. İlker GÖKÇE'ye,

Tezimin genetik anabilim dalı ile ilgili kısmının tasarlanmasında, testlerin yapılmasında ve sonuçların değerlendirilmesinde değerli katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Volkan BALTACI'ya,

Beraber çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma,

İhtisas sürem boyunca uyum içinde çalıştığımız poliklinik, klinik ve ameliyathane yardımcı sağlık personeline,

Sevgi ve güvenleri ile her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen annem ve babam başta olmak üzere tüm aileme,

Öğrencilik günlerimden bu yana hep yanımda olan, desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, hayata daha pozitif bakabilmemi sağlayan biricik eşim Ayşe Nur Özkaya İBİŞ'e

Sonsuz teşekkürlerimle...

Muhammed Arif İBİŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELEER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLÖLAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Erkek Genital Sistem Embriyolojisi	5
2.2. Erkek Genital Sistem Anatomisi	5
2.3. Erkek Üreme Fizyolojisi.....	7
2.4. Hastaların Değerlendirilmesinde Anamnez.....	8
2.5. Fizik Muayene	10
2.5.1. Genel Muayene.....	10
2.5.2. Genital Muayene.....	10
2.6. Erkek İnfertilitesinde Laboratuvar ve Görüntüleme Testleri	12
2.6.1. Semen Analizi.....	12
2.6.1.1. Tanısal Amaç İle Semen toplaması	13
2.6.1.2. Semen Makroskopik İncelenmesi	14
2.6.1.3. Semen Mikroskobik İncelenmesi	15
2.6.2. Sperm Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi.....	16
2.6.2.1. Postkoital Test	16
2.6.2.2. Sperm Penetrasyon Testleri / Sperm Zona Bağlanma Testleri.....	17
2.6.3. İleri Sperm Testleri	17
2.6.3.1. Antisperm Antikor Testleri.....	17
2.6.3.2. Elektron mikroskopisi	18
2.6.3.3. Biyokimyasal Testler.....	18
2.6.3.4. Reaktif Oksijen Türleri.....	19

2.6.3.5. Sperm DNA Hasarı.....	19
2.6.4. Endokrin Testler	20
2.6.5. Genetik Testler.....	21
2.6.6. Görüntüleme Yöntemleri	22
2.6.6.1. Skrotal Ultrasonografi	22
2.6.6.2. Venografi	22
2.6.6.3. Transrektal Ultrasonografi (TRUS).....	23
2.6.6.4. Bilgisayarlı Tomografi ve Manyetik Rezonans Görüntüleme	23
2.6.6.5. Vazografi	23
2.6.7. Testis Biyopsisi.....	23
2.7. En Sık İnfertilite Nedenleri, Tanı ve Tedavileri	26
2.7.1. Azospermi.....	26
2.7.2. Oligospermi	28
2.7.3. Varikosel.....	28
2.7.4. Kriptorşidizm.....	29
2.7.5. Endokrinopatiler	30
2.7.5.1. Hipogonadotropik Hipogonadizm	30
2.7.5.2. Androjen Fazlalığı	31
2.7.5.3. Hiperprolaktinemi.....	32
2.7.5.4. Östrojen Fazlalığı	32
2.7.6. Genetik Sendromlar	33
2.7.6.1. Klinefelter Sendromu	33
2.7.6.2. 46, XX Erkek Sendromu	34
2.7.6.3. 47, XYY Sendromu	34
2.7.6.4. Noonan Sendromu	34
2.7.6.5. Y Mikrodelesyonları.....	35
2.7.6.6. İnternal Duktus Gelişim Bozuklukları.....	35
2.7.6.7. Ultrastrüktürel Sperm Anomalileri.....	36
2.7.6.7.1. Primer Silyer Diskenezi	36
2.7.6.7.2. Globozoospermi	36
2.7.6.7.3. Fibröz Kılıf Displazisi	37

2.7.7. Ejekülatuar Disfonksiyon	37
2.7.8. İdiopatik İnfertilite.....	38
2.8. Yardımcı Üreme Teknikleri	38
2.8.1. Artifisyonel İnseminasyon (IUI).....	38
2.8.2. İn-Vitro Fertilizasyon/ICSI.....	39
2.9. Sperm Elde Etme Yöntemleri.....	40
2.9.1. PESA	40
2.9.2. MESA	40
2.9.3. TESA	41
2.9.4. TESE.....	41
2.10. TESE’de Sperm Elde Etme Olasılığını Öngörmeyi Sağlayan Faktörler	42
3. MATERYAL VE METOT	46
3.1. Hasta Seçimi ve Spermyogram	46
3.2. TESE Uygulaması	47
3.3. Semende ve TESE Dokusundan PCNA ve LİM-15 Genlerinin Araştırılması	48
3.3.1. RNA İzolasyonu	48
3.3.2. cDNA Sentezi	49
3.3.3. Real-Time PCR.....	49
3.4. İstatistiksel Yöntemler.....	49
4. BULGULAR.....	51
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ.....	69
ÖZET.....	71
SUMMARY	73
KAYNAKLAR	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ACTB	: Aktin beta
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
ASA	: Antisperm antikorlar
ASRM	: Amerikan üreme tıbbı topluluğu
cDNA	: Komplementer DNA
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran kondüktans regülatör
DHT	: Dihidrotestosteron
DMC1	: DNA meiotic recombinase 1
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
EM	: Elektron mikroskop
FSH	: Folikül stimülan hormon
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
hCG	: Human koryonik gonadotropin
HS	: Hipospermatogenezis
HH	: Hipogonadotropik hipogonadizm
HHG	: Hipotalamo-hipofizer-gonadal
hMG	: Human menapozal gonadotropine
ICMART	: Uluslararası yardımcı üreme teknolojileri izleme komitesi
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	: İn vitro fertilizasyon
IUI	: İntrauterin inseminasyon
KAH	: Konjenital adrenal hiperplazi
KBVDA	: Konjenital bilateral vaz deferens agenezisi
KS	: Klinefelter sendromu
LH	: Lüteinizan hormon
MA	: Matürasyon Arresti
MESA	: Mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu
MIS	: Müllarian-inhibiting substance
mRNA	: Mesenger RNA

mTESE	: Mikro TESE
NOA	: Non-obstrüktif azoospermi
OA	: Obstrüktif azoospermi
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
PESA	: Perkütan epididimal sperm aspirasyonu
PKT	: Postkoital test
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rt-PCR	: Real time PCR
SCO	: Sertoly cell only
SRY	: Sex Determining Region of Y
TESA	: Testiküler sperm aspirasyonu
TESE	: Testiküler sperm ekstraksiyonu
TRUS	: Transrektal ultrason
TSH	: Tiroid stimulan hormon
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri
yy	: Yüzyıl
ZP	: Zona pelusida

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1:	Semen Analizinde Düşük Referans Değerleri	13
Tablo 2:	Hastaların testis volümlerine göre sınıflandırılması	51
Tablo 3:	Testis volümleri ile TESE’de sperm elde etme ilişkisi	52
Tablo 4:	Hastaların yaş, total testosteron ve FSH değerleri	52
Tablo 5:	Yaş, total testosteron ve FSH değerleri ile TESE’de sperm elde etme ilişkisi	53
Tablo 6:	Non-obstrüktif azospermi hastalarına eşlik eden klinik patolojiler	53
Tablo 7:	Eşlik eden klinik patolojilere göre TESE’de sperm elde etme başarısı	54
Tablo 8:	TESE dokusunda ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri.....	54
Tablo 9:	TESE dokusunda ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin TESE’de sperm elde etme başarısı ile ilişkisi.....	55
Tablo 10:	Düzeyi ölçülen genlerin sensitivite, spesifite, cutoff ve eğri altında kalan alan (AUC) değerleri	55
Tablo 11:	Semende ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri	56
Tablo 12:	Semende ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin TESE’de sperm elde etme başarısı ile ilişkisi.....	57
Tablo 13:	Non-obstrüktif azospermi hastalarının testis patolojileri	58
Tablo 14:	Testis patolojilerine göre TESE’de sperm elde etme başarısı	59
Tablo 15:	Testis patolojilerinin TESE’de sperm elde etme başarısı ile ilişkisi.....	59
Tablo 16:	Testis patolojileri ile TESE dokusu ve semende bakılan PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1: TESE dokusunda ölçülen PCNA ve LİM-15 genlerinin ROC eğrisi analizi. (A) PCNA, (B) LİM-15.....	56
Şekil 2: Semende ölçülen LİM-15 geninin ROC eğrisi analizi.....	58



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fertilite, tüm tarih boyunca neslin sürdürülebilmesi amacıyla önemsenmiş olup, tarihte yazılı belgelerin çoğu bu konu ile ilgili olaylar ve nasihatler aktarmıştır. 34 paragrafa bölünmüş, 4000 yıllık Kahun Papirüsü bunların en eski örneklerinden biri olup, kısırlık, gebelik tanısı, kontrasepsiyon ve doğum ve komplikasyonları gibi doğurganlıkla ilişkili konulardan bahsetmiştir [1]. Eski Mısırlılar, erkeğin katkısının, kadındaki fertil alana yerleşmesi gereken tohumu vermek olduğuna inanıyorlardı. Bu uğurda tanrılara büyükbaş hayvan kurban eden rahipler, semenin spinal kord ve sakrumdan geldiğine inanıyor, bunun doğurganlık tanrısı Osiris'ten bir parça olan yaşam ruhunu taşıyan sıvıyı koruduğuna inanıyorlardı. Başka bir sava göre ise, semenin kalpten doğup testislere gittiği kabul edilirdi ve bu 'erkeğin kalbini kadına sermesi' olarak tanımlanırdı [1].

İnfertilite tanımına bakıldığında klinik, epidemiyolojik ya da demografik yaklaşımlara göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Bunların temel ayırım noktası gebelik, gebeliğin sürdürülmesi veya canlı doğum gibi fertilitede başarıyı gösteren sonuçlardır. Dünya sağlık örgütü (DSÖ)'nün tanımına göre infertilite, cinsel yönden aktif ve kontrasepsiyon uygulamayan bir çiftin bir yıl içerisinde gebelik elde edememesi durumudur [2]. Epidemiyologlara göre infertilite, gebelik riskine maruz kalan kadınların, gebe kalmak için sergilediği yaklaşımı (korunmasız ve düzenli ilişki) ve süreyi kriter alırken, demograflara göre ise infertilite cinsel yönden aktif ve gebeliği önleyici yöntem kullanmayan bir kadının canlı doğum yapmamış olmasıdır [3]. Aslında 2006'da Uluslararası Yardımcı Üreme Teknolojileri İzleme Komitesi (ICMART), 53 terim ve tanımı içeren bir sözlük yayımlamıştır. Sonrasında DSÖ ile birlikte ilk olarak 2009 yılında revize edilen bu sözlük, demografi, epidemiyoloji ve halk sağlığı alanlarındaki gelişmeler ve infertilite üzerinde erkek faktörünün etkisinin daha kapsamlı anlaşılabilir hale gelmesiyle kısıtlılıklar arz etmiş ve 2017 yılında tekrar revize edilmiştir. 2017 yılındaki revizyona göre infertilite, bir kişinin kendisinin veya eşiyle beraber üreme kapasitesinin bozulmasından dolayı, 12 aylık korunmasız düzenli cinsel ilişkiden sonra klinik bir gebelik elde etmedeki yetersizliği ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmıştır [4].

İnfertilite tüm dünyada bireylerin %15 ila 20'sini etkilemektedir [5] ve istemelerine rağmen çocuk sahibi olamayan infertil çiftlerin %50'sinde erkek faktörlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir [6]. Erkek faktörü bulunan vakaların ancak %50'sinde oligozoospermi, teratozoospermi veya azoospermi gibi anormal semen parametreleri görülür [7]. Azoospermi ise erkek kaynaklı infertilitenin en ağır şeklidir ve infertil çiftlerin yaklaşık %5'inde görülmektedir [8]. Azoospermik hastaların %13,3'ünde etiyolojik bir sebep bulunamadığı için bu hasta grubu idiopatik infertilite grubuna dahil edilir [9]. Obstrüktif azoospermi (OA) reproduktif yolun vaz deferens, epididim ve ejakülatuar kanal dâhil olmak üzere herhangi bir yerinde gerçekleşen mekanik bloğa bağlı olup, non-obstrüktif azoospermi (NOA) ise bu yollarda tıkanıklık olmamasına rağmen, semen analizinde hiç sperm saptanmamasıdır. NOA'lı hastaların bir kısmında, testisin heterojen yapıda olmasından dolayı bazı bölümlerinde fokal spermatogenez devam etmekte ve bu bölgelerden testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) veya mikro TESE (mTESE) yöntemleriyle sperm elde edilerek, yardımcı üreme teknikleri (YÜT)'de (in vitro fertilizasyon (IVF), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)) kullanılmakta ve bu hastaların kendi spermeleriyle çocuk sahibi olmasına yardımcı olunmaktadır. NOA hastalarında bu yöntemlerle sperm elde etme oranı %50 civarındadır ve testiküler histoloji ile sperm bulma arasında korelasyon mevcuttur [10, 11].

YÜT'nin yüksek maliyeti, ovaryan hiperstimülasyon sendromu gibi potansiyel komplikasyonları, TESE komplikasyonları ve TESE başarısızlığının yol açabileceği olumsuz psikolojik durumların önüne geçebilmek için TESE'de sperm saptanabilirliğinin önceden tespiti önemlidir. Endokrin testler ve testiküler biyopsi her ne kadar testiste sperm varlığını saptamak için kullanılsa da, bu testler yeterli bilgiyi sağlayamamaktadır. Bu nedenle daha güncel teknikler geliştirilmekte ve semende spermatogenezin farklı basamaklarında eksprese olan mesenger RNA (mRNA)'lar tespit edilmeye çalışılmaktadır [12]. Böylece testisin herhangi bir yerinde fokal spermatogenez varsa, bunun tespit edilmesi mümkün olabilmektedir. Ayrıca spermatogonyumlar testis içinde mayoz bölünmeye girerek spermatitleri oluşturmaktadırlar. Azoospermik erkeklerde mayoz bölünmenin testis dokusunda aktif olduğunun gösterilmesi sperm oluşumunun olup olmadığı ile ilgili önemli bir

belirteç olabilir. Bu anlamda mayoz bölünmede görev alan proteinlerin belirlenmesi sperm üretimi ile ilgili önemli bulgular vermektedir [13].

Diğer adı DNA meiotic recombinase 1 (DMC1) olan LİM-15, mayozu özgü bir rekombinazdır [14]. Rekombinaz, genetik rekombinasyonlarda doğal çeşitlenme tepkimelerini tetikleyen enzimlere verilen isimdir. DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynamaktadır ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev almaktadırlar. DNA tamir mekanizmasında görevli olan proteinlerden olan RecA proteini rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile hasarsız komplementer zincirde bulunan sekansı transfer eder. Ökaryotlarda biri LİM-15, diğeri Rad51 olmak üzere iki tip Rec A gibi rekombinaz yapan protein mevcuttur. Bunlardan Rad51 hem mayotik hem de somatik hücrelerde eksprese olur ve DNA tamir mekanizmasında fonksiyonu vardır. Lim15 ise mayoz aşamasında rekombinasyona dayalı DNA sentezinde görev alan bir proteindir. Ökaryotlarda yapılan çalışmalar Lim15 proteinin sadece mayoz bölünmeye spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiş ve Lim15 proteinin RAD51 proteini ile mayoz aşamasında işbirliği yaptığını ortaya çıkarmıştır. Bu iki proteinin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) geni tarafından kodlanan proteinler hücrede sadece çekirdekte bulunarak, DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak fonksiyon gösterirler. PCNA, proliferen olan hücrelerde özellikle S fazında çekirdekte bulunan ve immünohistokimyasal yöntemlerle düzeyi ölçülebilen bir proliferasyon belirleyicisidir [15]. Özellikle PCNA'nın hücre proliferasyonunda anahtar rol oynadığı ispatlandıktan sonra, ekspresyon düzeylerinin çeşitli kanser türlerinde prognozu predikte edip etmediğini araştıran çalışmalar yapılmıştır [16]. NOA'lı erkeklerde human koryonik gonadotropin (hCG) bazlı hormonal tedavinin etkisini araştıran bir çalışmada, spermatagonyal DNA sentezi, PCNA ekspresyon miktarının ölçümü ile değerlendirilmiştir [17].

Çalışmamıza NOA tanısı konulan, YÜT'ye yönlendirilecek ve bu nedenle TESE yapılması gereken hastalar dahil edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda sadece testise bakılarak, testiste sperm üretimini göstermede önemli bir belirteç olabileceği düşünülen PCNA ve LİM-15 olarak da bilinen DMC1 gen ekspresyon miktarları

hastalardan alınan ejakülatta ve TESE sırasında ek olarak alınan biyopsi dokusunda real time-PCR (rt-PCR) yöntemi ile ölçülmüştür. TESE işlemi yapılan hastalarda olgun spermatozoa varlığı araştırılmıştır. Ejakülatta ve testis biyopsi materyalinde ölçülen PCNA ve LİM15 gen ekspresyon düzeyleri ile TESE’de spermatozoa saptanma oranları karşılaştırılarak, ejakülatta ve TESE materyalinde ölçülen bu ürünlerin miktarının, TESE’de spermatozoa saptanma olasılığını predikte etmede ne ölçüde faydalı olacağı araştırılmıştır. Bu belirteçlerin testisten invaziv yolla elde edilmesindeki güçlüğü göz önüne alınarak, ejakülatta bakılmasının daha fazla hasta uyumu sağlayacağı kanısındayız.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM EMBRİYOLOJİSİ

Fertilizasyon sırasında oosit II'deki X kromozomuna spermden gelen bir Y kromozomu bağlandıktan sonra fenotipik özellikler 6.haftanın (ambiseksüel evre) sonuna kadar erkek ve dişi embriyolarında herhangi bir fark göstermezler. 7. haftada Y kromozomunun kısa kolundaki Sex Determining Region of Y (SRY) bölgesindeki genlerin ifadesi ile gonadın medullası testise farklılaşmaya, korteksi ise gerilemeye başlar. Sonrasında seks kord hücreleri Sertoli hücrelerine dönüşerek Müllerian-Inhibiting Substance (MIS) ve Androjen Bağlayıcı Proteini (ABP) sekrete etmeye başlarlar. Bu sayede mülleryan kanal regrese olur ve daha sonrasında leyding hücrelerine dönüşecek olan mezenkim hücrelerinin testise göçü sağlanır. Leyding hücrelerinin ürettiği testosteron, 5 α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülerek, üretra, prostat, penis, skrotum gelişmesini ve testislerin skrotuma inişini sağlar [18].

Yedinci ayda iç inguinal halkaya kadar ulaşan testisler, daha sonra prosesus vaginalis içerisinden gubernakulum kılavuzluğunda inguinal kanala girer ve 8. ayın sonunda tamamen skrotuma ulaşmış olurlar.

2.2. ERKEK GENİTAL SİSTEM ANATOMİSİ

Erkek üreme sistemi organları dış ve iç genital organlar olarak ikiye ayrılır. Penis ve skrotum dış genital organlar olarak kabul edilirken; testis, epididim, spermatik kord, seminal veziküller, ejakülatuar kanallar, prostat ve bulboüretral (Cowper) bezlerden oluşur.

Radiks penis ve korpus penis olmak üzere 2 yapıdan oluşan penisin yüzeyel perineal aralıkta kalan kısmına radiks penis denilmektedir. Radiks penisin 2 parçasından birisi olan bulbus penis korpus spongiosumun geniş arka kısmıdır. Diğer bir parça olan krus penis ise korpus kavernosumun arka tarafında bulunan iki erektile yapıdan oluşur. Korpus penis ise bir tane korpus spongiosum ve iki tane korpus

kavernosumdan oluşur. Bu yapılar içte tunica albugenia dışta ise Buck faciası ile kaplıdır. Korpus spongiosum penis önde genişleyerek glans penisi oluşturur.

Testisler, skrotum içinde funikulus spermatikusa asılı, 10-15 gr. ağırlığında 4x2,5x3 cm boyutunda bir çift organdır. Testosteron üretimini gerçekleştiren Leydig hücrelerini ve spermilerin beslenmelerini sağlayan, fagositoz yapan ve inhibin hormonunu salgılayan Sertoli hücrelerini içerir. Leydig hücreleri interstisyumda bulunurken, kan-testis bariyerinin oluşumunda Sertoli hücreleri görev alır [19].

Skrotum, iki uyluk arasında symphysis pubisten aşağıya doğru sarkan içinde testis, epididimis ve funikulus spermatikusun bir bölümünü içeren büyüklüğü ve şekli değişken bir yapıdır. Testisler gelişimi sırasında inguinal kanal içinden skrotuma taşındıkları için karın ön duvarını oluşturan tabakalar, skrotumun yapısında da çok ince lifler şeklinde yer alırlar. Skrotumu dış yüz üzerinde ikiye ayıran deri kabartısı raphe adını alır. Bu yapı, skrotumun iç yüzünde yer alan ve organın iki bölüme ayrılmasını sağlayan septum skrotinin oluşumuna da katılır.

Prostat, mesanenin altında ve rektumun önünde yer alır ve asidik salgıları ile semenin likefaksiyonunu sağlar. Ejekülatuar kanallar prostat bezinin parankim dokusu içerisinden geçerek kollikulus seminalislerde prostatik üretraya açılır.

Spermatik kord testisin arter ve venlerini, sinirlerini ve duktus deferensi içeren ve inguinal kanal ile testis arasında uzanan ince uzun bir yapıdır [20]. Duktus deferens inguinal kanaldan karın boşluğuna girer, veziküla seminalisin kanalı ile birleşerek ejakülatuar kanal adını alır ve prostatik üretraya açılır [21].

Epididim uzatıldığında yaklaşık altı metre uzunlukta olan, kıvrımlı tek bir kanal yapısında, testisin üst-arka kenarına yaslanmış yarımay şeklinde yaklaşık 4 cm uzunluğunda bir organdır. Caput, corpus ve cauda isimli 3 bölümden oluşur. Epididimler spermilerin membran yapısında disülfid bağları oluşturarak maturasyonuna katkıda bulunur, aynı zamanda güçlü hareket potansiyeli kazanmasını sağlar. Yani spermilerin motilite, morfoloji ve fertilite olgunlaşmasını sağlar [22].

Veziküla seminalis, mesanenin arka yüzü ile rektumun ön yüzü arasında, sağ ve solda birer tane olan ve 4-5 cm uzunluğundaki kıvrımlı küçük bir bezdir. Kıvrımları açılırsa 10-15 cm uzunluğa ulaşır. Alt ucu, salgısını akıttığı düz ve dar bir

kanal seklindedir ve duktus ekskretorius adını alır. Fruktoz ve kolinden zengin salgısı sperm hücrelerinin hareketliliğini ve yaşamaları için gerekli enerjiyi sağlar.

Cowper bezleri membranöz üretranın arka dış yanında ve penis kökünün üst tarafında bulunan 1 cm çapında bir çift bezdir. Mukoid ve alkali bir salgısı ejakülasyondan önce salgılanarak üretranın nötralizasyonunu sağlar.

2.3. ERKEK ÜREME FİZYOLOJİSİ

Hipotalamo-hipofizer-gonadal (HHG) aksın seks hormonlarının salınımı ve spermatogenik hücrelerin gelişimi olmak üzere 2 ana görevi vardır [23]. Hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), ön hipofizden gonadotropik hormonlar olarak adlandırılan lüteinizan hormon (LH) ve folikül stimülan hormon (FSH)'nın salınmasını uyarır. LH, testislerden testosteron salınmasını uyarırken, FSH spermatogenezi ve Sertoli hücrelerinden ABP, inhibin ve aktivin gibi pek çok molekülün salınmasını uyarır. GnRH'nın pulsatil salınımından dolayı, FSH ve özellikle LH salınımı da pulsatil bir şekilde olur [24].

Spermatogenez bir hücre farklılaşması olayıdır. Embriyo oluşumu sırasında, primordiyal hücreler testislere göç ederek seminifer tübüllerde spermatagonya olarak adlandırılan immatür germ hücreler haline gelirler. Spermatagonya puberteden itibaren ön hipofiz hormonlarının etkisi ile mitoz bölünmelere başlar ve spermi oluşturmak için devamlı büyür ve farklı evrelerden geçer. Mitoz bölünmelerin ürünü olarak ilk önce tip A sonrasında tip B spermatagonyumlar ve primer spermatositler oluşur. Primer spermatositler 46 kromozom (46,XY) içerirler ve birinci mayoz bölünmeye girerler. Profaz evresi sonunda mayoz bölünme tamamlanır ve 23 kromozom (23,X veya 23,Y) içeren sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler ise ikinci mayoz bölünmeyle spermatitleri meydana getirirler ve sitokinez tamamlanmış olur.

Sperm hücresinin üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, spermlere dönüştüğü olaylar dizisine spermiyogenez denir. 3 aşamada gerçekleşir. Akrozomal granüllerin oluşup flagellum oluşumunun başladığı faza golgi fazı, akrozom, flagellumun tamamen oluşup mitokondrilerin spermin orta kısmına toplandığı faza akrozomal faz ve fazla parçaların Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilip

hücrelerin seminifer tübül lümenlerine salındığı faza ise olgunlaşma fazı denilmektedir. Spermatogonyadan spermatozoaya uzanan bu yolculuğun toplam süresi 74 gündür [25].

Seminifer tübülde oluşan sperm hareketsiz olup tam olgunlaşması epididimde 18-24 saat kaldıktan sonra gerçekleşir. Testis başına günlük 45 milyon sperm üretirken bunların küçük bir kısmı epididimde, büyük bir kısmı ise vas deferenste olmak üzere 1 aya kadar fertilite potansiyellerini koruyarak depolanabilirler [26]. Ejakülasyon sonrası normal, hareketli, fertil spermin kadın genital yolunda beklenen ömrü 1 ila 5 gün kadardır.

2.4. HASTALARIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE ANAMNEZ

Azoospermik erkeklerde başarılı bir tedavinin olmazsa olmazı düzeltilebilir patolojilerin saptanmasıdır. Bunun için anamnez alırken yaşam tarzı değişiklikleri ve medikal tedaviler ile düzeltilebilecek patolojiler saptanmaya çalışılmalı, infertiliteye sebep olabilecek eş zamanlı hastalıklar sorgulanmalı ve kendinden sonraki nesilleri de etkileyebileceği için genetik hastalıklar araştırılmalıdır. İnfertilite ve seksüel fonksiyon bozukluğuna yol açan pek çok faktör bulunmaktadır ve anamnez bunları sorgulayacak şekilde geniş tutulup çiftlerden alınmalıdır. Çiftlerin önceki ve şimdiki fertilite durumunun, yaşlarının, seksüel ilişki öykülerinin ve özgeçmişlerinin öğrenilmesi güzel bir anamnez için gerekli en önemli unsurlardır.

Çiftin fertilite potansiyelini negatif yönde etkileyen faktörlerden olan kadın yaşının 35'in üzerinde olması, bilinen infertilite öyküsü, inmemiş testis, kemoterapi öyküsü, testis kanseri, enfeksiyöz ve genetik hastalıklar ve immünolojik faktörler sorgulanmalıdır. Ayrıca puberte başlangıcının gecikmesi endokrinolojik problemlerin işaret edebilir. Gecikmiş puberte, kallman sendromu veya primer hipogonadotropik hipogonadizme, erken puberte ise konjenital adrenal hiperplazi (KAH) 'ye sekonder olabilir.

Seksüel ilişki öyküsü ciddi öneme sahip olup, erkeğin mevcut veya önceki partneri ile bir konsepsiyon sağlayıp sağlamadığı, sağlamışsa eğer sonucunun ne olduğu, infertilitenin primer mi sekonder mi olduğu ile beraber infertilite süresi, ilişki sıklığı ve kontrasepsiyon öyküsü detaylı şekilde incelenmelidir. Primer infertilite

hastanın daha önce herhangi bir partneri ile konsepsiyon sağlayamamış olması iken, sekonder infertilite bir erkeğin, partnerine ya da gebeliğin sonucuna bakılmaksızın daha önce başarılı bir konsepsiyonunun olması, fakat şuan infertil olması durumudur. Bu ayrımın yapılması prognoz ve ayırıcı tanı açısından önem arz eder. Sekonder infertil erkeklerin gelecekteki fertilite şansı daha yüksek olup, üreme sisteminin ve genetik yapısının normal olması beklenir.

Cinsel öyküde ejakülasyonun olup olmadığı, spermisid etkisinden dolayı ilişkide kayganlaştırıcı kullanımı, ilişkinin sıklığı ve zamanlaması sorgulanmalıdır. Spermin uygun servikal mukus ortamında 2 ila 5 gün yaşayabildiği çalışmalarda gösterilmiştir [27]. Konsepsiyonun sağlanması için, sperm ovulasyon ve LH pikine uygun bir zamanda kadın genitalyasına ulaşmalıdır ki bu döneme fertilizasyon penceresi denmektedir [27, 28]. Önerilen zamanlama kadın adet düzeni ile ilgili olsa da ovulasyona yakın iki günde bir cinsel ilişkidir [29, 30].

Geçirilmiş skrotal, inguinal veya retroperitoneal cerrahi öyküsü duktal sistem obstrüksiyonuna veya ejakülasyon bozukluğuna yol açabilir. Transüretral prostat rezeksiyonu retrograd ejakülasyon kaynaklı infertilite sebebidir. Diyabetes mellitus, spinal kord hasarları ve multiple skleroz ise hem ejakülatuar hem de erektile fonksiyonu bozabilmektedir [31]. Bu hastalıklar için kullanılan ilaçlarda yine dikkatli bir şekilde sorgulanmalıdır.

Hipotroidi ve hipertroidinin steroid metabolizmasını ve sperm kalitesini etkileyerek subfertiliteye yol açabildiği belirtilmektedir [31]. Tiroit kanseri tedavisinde kullanılan radyoaktif iyot semen parametrelerini bozarak erkek infertilitesine yol açabilir [32]. Kemoterapi ve radyoterapi gibi tedaviler de germ hücreleri üzerine direk toksik etki yapmakta ve spermatogenezi bozmaktadır [33].

Fertilite potansiyeline tehdit oluşturacak çevresel toksinler veya medikasyonlar da sorgulanmalıdır. Bunlardan bazıları direk testise toksik etkileri ile etki gösterirken bazıları ise HHG aksını, ereksiyonu, ejakülasyonu veya libidoyu bozarak etki gösterir. Sigara kullanmak sperm hareketliliği, sayısı ve morfolojisini bozarak infertiliteye sebep olur. Bu etki doza bağlı olup, çocuk sahibi olmak isteyen çiftlere partnerleri ile beraber sigarayı bırakmaları tavsiye edilmiştir [34]. Organik

solventler, pestisidler ve kurşun maruziyeti de gonadotoksisite ve infertilite ile yakından ilişkilidir [35, 36].

Aile infertilite hikâyesi olan hastada kistik fibrozis öyküsü ve konjenital bilateral vaz deferens agenezisi (KBVDA) ile birlikte kistik fibrozis öncelikle düşünülmesi gereken patolojilerdendir. İnterseks aile öyküsü olanlarda androjen reseptör anormallikleri araştırılmalıdır.

İnfertilitede kadın faktörü, dikkatle sorgulanması gereken bir başka etkidir. İleri yaş, düzensiz menstruasyon, endometriozis, pelvik enfeksiyon gibi risk faktörleri kadın fertilite potansiyelini düşürmektedir.

2.5. FİZİK MUAYENE

2.5.1. Genel Muayene

Fertilite genel sağlık durumunun göstergelerinden birisi olup, muayene genital bölge öncelikli olmak üzere, tüm vücudu kapsamalıdır. Yaşa bağlı olarak temporal tip kelliğin olmaması, azalmış vücut kıllanması, önikoid yapı, virilizasyonun yeterli olmaması ve jinekomasti gibi bulgular androjen eksikliğini düşündüren muayene bulgularıdır. Bu anormallikler düşük serum testosteronu olabileceğini, östrojen/testosteron oranı bozukluğunu, hiperprolaktinemi, adrenal fonksiyon bozukluğu gibi endokrinolojik problemleri ve klinefelter sendromu (KS) gibi genetik sendromları akla getirmelidir. Androjen düzeylerinin puberte sırasında düşük olması, o dönemde epifiz plaklarının geç kapanması nedeniyle orantısız uzun ekstremitelerle kendini gösterebilir. Troit fonksiyon bozuklarının bir fertilite sebebi olduğu düşünülerek tiroit bezi muayenesi yapılmalı, vasküler hastalık olasılığında femoral pulsasyon varlığı, nörolojik bir patoloji olasılığında genital ve perineal duyu incelenmelidir.

2.5.2. Genital Muayene

Genital muayene genel bir inspeksiyon ile başlamalıdır. Penil kurvatür, kordi veya hipospadias ilk bakışta tespit edilebilir ve bu patolojiler vajene sperm transferini bozabilirler. Muayenenin en önemli parçası skrotal içeriğin dikkatli bir şekilde

incelenmesidir. Skrotal muayene hem ayakta hem de yatarak yapılmalı, kramasterik kasların gevşemesini kolaylaştırmak amacıyla sıcak bir oda tercih edilmelidir. İnfertilite testis kanseri için bir risk faktörü olduğundan, tüm testis yüzeyi dikkatlice palpe edilerek kitle ekarte edilmeli, kıvamı değerlendirilmelidir [37, 38]. Testis boyutları orşidometre veya ultrasonografi kullanılarak ölçülmelidir. Testis volmünün %88'i sperm üretiminden sorumlu olduğundan, azalmış testis hacminin saptanması bozulmuş spermatogenik potansiyeli gösterdiği için önem arz etmektedir [39]. Epididimler endurasyon ve genişlemeyi tespit etmek için dikkatli muayene edilmeli, endurasyon enflamasyonu, dilatasyon obstrüksiyonu düşündürmelidir. Küçük kistik lezyonların varlığı sıklıkla görülmekle birlikte, bunlar genellikle herhangi bir patolojiye yol açmayan basit spermatosellerdir.

Varikoselin tespiti için spermatik kord supin ve özellikle ayakta muayene edilmeli, kıvrımlı damar yapılarının palpasyonu için hastaya valsalva manevrası yaptırılmalıdır. İnfertil erkeklerin %14.8'inde, azospermik erkeklerin %10.9'unda varikosel infertilite sebebi olarak düşünülür [40]. Grade 1 varikoseller sadece valsalva manevrası ile saptanırken, grade 2 varikoseller valsalva olmadan normal muayene ile palpe edilebilirler. Grade 3 varikosel ise en ileri evre olup, tipik olarak solucan torbası şeklinde skrotal ciltten varikoselin görülmesi durumudur. Sol gonadal venin sol renal vene dik açılması sebebiyle varikoseller %90 oranında sol tarafta görülürler. Sağ tarafta tek taraflı varikosel varlığı retroperitoneal bir patolojiyi düşündürür ve bu bölge ile ilgili bir görüntüleme yapılmalıdır. Varikoseli saptamak için en sık kullanılan görüntüleme yöntemi skrotal renkli doppler ultrasonografidir. Venografi, sintigrafi ve termografi tanıyı desteklemek için kullanılabilse de, çok yaygın kullanılan yöntemler değildir. Varikosel tanısı bazı özel durumlar dışında klinik muayene ile konulur. Klinik muayene semptomları olmadığında, yalnızca bu yöntemler ile saptanmış varikoseller subklinik varikosel olarak adlandırılırlar ve önem arz etmezler.

Spermatik kord muayenesinde varikosel dışında bir diğer dikkat edilmesi gereken yapı vaz deferensdir. Vaz deferensin unilateral veya bilateral palpe edilememesi, bu yapının agenezisini ve bununla ilişkili kistik fibrozis gibi genetik hastalıkları düşündürmelidir. Kalınlaşmış vaz deferens, daha önce geçirilmiş operasyonlara veya obstrüksiyona sekonder olabilir.

Parmakla rektal muayene yapılarak, obstrüksiyona yol açabilecek prostat orta hat kistleri ve prostat anatomisi değerlendirilebilir. Normal koşullarda palpe edilemeyen seminal veziküller ejakülatuar kanal obstrüksiyonlarında belirginleşebilir.

2.6. ERKEK İNFERTİLİTESİNDE LABORATUVAR VE GÖRÜNTÜLEME TESTLERİ

2.6.1. Semen Analizi

Erkek üreme hücreleri ilk kez 17. yüzyıl (yy) 'da Anton van Leewenhoek tarafından yapılan mikroskopta görülmüş ve 'spermatick worms' olarak adlandırılmışlardır [41]. Bu hücreler ilk zamanlar parazit olarak düşünülse de 1841 yılında Albert von Kolliker tarafından spermatozoanın histogenez süreci ile testislerde gelişen hareketli otolog hücreler olduğu belirtilmiştir [41]. Macomber ve Saunders 1929 yılında ilk kez insan semenini incelemişler ve gebelik için gereken sperm sayısının en az 60 milyon/ml olduğunu söylemişlerdir. Semen analizlerinin standardize edilmesi için DSÖ ise ilk kez 1980 yılında bu konu ile ilgili bir el kitabı yayınlamıştır. O günden itibaren günümüze kadar 4 kez güncellenen kitabın son güncellemesi 2010 yılında olmuştur. DSÖ, 2010 kılavuzunda daha çok kuzey yarım kürede yerleşik sekiz ülkeden son 12 ayda veya daha kısa sürede eşi gebe kalan fertil erkeklerin semen bulguları kaynak gösterilerek hazırlanmıştır [42].

İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde öykü ve fizik muayeneden sonra ilk istenecek laboratuvar testi semen analizidir. DSÖ 2010 yılı semen parametreleri referans değerleri tablo 1'de gösterilmiştir. İlk semen analizi normal ise yeni bir semen analizine gerek yoktur, anormal ise bir ay sonra ikinci bir semen analizi yapılır [43]. Semen kalitesi bozulmasıyla birlikte, konsepsiyon şansı azalır, ancak sıfıra inmez. Semen analizinde, spermatozoa, seminal plazma ve sperm dışı hücreler değerlendirilir. Eğer idiyopatik infertilite mevcutsa, spesifik sebepleri saptamak üzere ileri testler yapılabilir.

Tablo 1: Semen Analizinde Düşük Referans Değerleri

PARAMETRELER	
Semen Volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total Sperm Sayısı (10^6 /ejakülat)	39 (33-46)
Sperm Konsantrasyonu (10^6 /ml)	15 (12-16)
Total Motilite	40 (38-42)
İleri Hızlı	32 (31-34)
Vitalite	58 (55-63)
Sperm Morfolojisi	4 (3.0-4.0)
Ph	> 7.2
Peroksidaz-positif lökosit (10^6 /ml)	< 1.0
Seminal Çinko (μ mol/ejakülat)	≥ 2.4
Seminal Früktoz (μ mol/ejakülat)	≥ 13
Seminal Nötral Glukozidaz (mU/ejakülat)	≤ 20

2.6.1.1. Tanısal Amaç İle Semen Toplanması

Seminal sıvı, testis, epididim, prostat ve seminal veziküllerin sekresyonlarından oluşmaktadır. Semen toplama işlemi standart kılavuzlar eşliğinde yapılmalı, toplama öncesinde 3 günlük (72 saat) cinsel perhiz süresi olmalıdır [42, 44]. Her geçen günde sperm konsantrasyonunun %25'e kadar artabilmesi nedeniyle perhiz süresinin uzun olması önerilmektedir [45].

Semenin klinikte mastürbasyon ile alınması en kaliteli sperm toplama işlemidir. Ejakülasyon sırasında atılan ilk fraksiyon spermden zengin prostat sıvısı olduğu için [46], ilişki sırasında geri çekme yöntemi ile alınan semen örneğinde bu ilk fraksiyonun elde edilememe olasılığının yüksekliği nedeniyle geri çekme yöntemi semen toplama işlemi için önerilmemektedir. Mastürbasyon öncesi hasta idrarını yapmalı, mikroorganizma kontaminasyon olasılığını en aza indirmek için elini ve

penisini sabunla yıkayıp iyice durulmalıdır. Alınan ejakülatın tümü temiz, geniş ağızlı, cam veya sperm için toksik olmayan plastik bir kap içine konmalıdır [46]. Örnek kabı ısı değişikliği olmadan 37 °C’de sıvılaşıncaya kadar saklanmalıdır. Örneğin incelenme süresi 1 saati geçmemelidir. İzotonik lumbrikanlar ve erotik materyaller örneğin kalitesini etkilememekle birlikte, sabun gibi kayganlaştırıcılar toplama işlemi esnasında kullanılmamalıdır [47, 48].

Gerektiği zaman ereksiyon ve ejakülasyon problemi yaşayan erkekler için işlemden 1 saat önce fosfodiesteraz 5 inhibitörleri verilebilir. Daha az kullanılsa da intrakavernozal alprostatil veya vakum ereksiyon cihazları diğer seçenekler olabilir. Spinal kord hasarı T8 ve üzerinde olan hastalarda, vibrasyonla stimülasyon kullanılabilir [49].

2.6.1.2. Semen Makroskopik İncelenmesi

Semen analizinin ilk makroskopik değerlendirilmesinde seminal sıvının hacmi, likefaksiyon süresi, semenin pH’sı, viskozitesi ve aglütinasyon derecesine bakılır.

Semen volümü gravimetrik yöntemlerle ölçülmekte olup, alt referans değeri 1.5 ml’dir [42]. Semen volümünün düşük olması örneğin usulüne uygun verilememesinden, ejakülatör kanal tıkanıklıklarından, retrograd ejakülasyondan veya bilateral vaz deferens yokluğundan kaynaklanabilir. Özellikle ejakülatör kanal tıkanıklıklarında ve vaz deferens agenezisinde seminal sıvıda spermatozoa hiç görülmemekte ve seminal sıvı pH’sı asidik düzeydedir.

Ejakülasyonla alınan semen genellikle yarı katı koagüle kitle şeklindedir. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde likefiye olmaya başlar. Numunenin tümü genellikle oda sıcaklığında 15 dakika sonra likefiye olur, bu süre nadiren 60 dakikayı geçebilir [42]. Likefaksiyonun uzaması yardımcı seks bezlerindeki enfeksiyona sekonder olabilir.

Likefaksiyondan sonra semen, geniş kalibreli ek kullanımlık plastik pipet içinden aspire edilerek, yer çekiminin etkisi ile damlamaya bırakılır. Oluşan iplikçik

gözlenerek semenin viskozitesi tahmin edilir. Damlaların uzunluğunun 2 cm'den uzun olmaması gerekir. Artmış viskozite sperm motilitesini önemli oranda etkiler.

Semen pH'sını etkileyen şeyler, asidik prostat salgısı ile alkali seminal vezikül salgılarıdır. Semen pH'sı tercihen 30 dakika sonra ölçülmelidir. DSÖ kılavuzunda pH değeri 7.2'nin üzerinde olarak belirlenmiştir [42]. Düşük volümlü semen örneğinde asidik pH söz konusu ise ejakülatör kanal tıkanıklıkları akla getirilmelidir.

Sperm aglütinasyonu motil spermatozoaların birbirine baş-başa, kuyruk-kuyruğa veya karışık şekilde yapışması demektir. DSÖ kılavuzunda aglütinasyon 1 (seyrek) ve 4 (gross) arasında değerlendirilmiştir [42]. Aglütinasyonun görülmesi immünolojik bir patoloji olduğunu kanıtlamasa da, anti-sperm antikorlarının varlığını düşündürdüğü için ileri tetkik yapılmasını gerektirir.

2.6.1.3. Semen Mikroskopik İncelenmesi

Mikroskopik değerlendirmede spermelerin sayısına, morfolojisine, vitalitesine ve motilitesine ayrıca sperm hücreleri dışındaki hücrelerin varlığına bakılır.

Sperm konsantrasyonuna göre olgular normozoospermi (>15milyon/ml), oligozoospermi (0 ila 15milyon/ml arası) ve azoospermi (sperm yok) şeklinde sınıflandırılırlar [42]. Azoospermi tanısı semenin 15 dakika süre ile 3000 devirde santrifüj edilerek pelletin gözlenmesi ile konur. Pellette sperm yok ise pellet negatif azoospermi, hücre var ise pellet pozitif azoospermi veya kriptozoospermi adı verilir. Sperm sayısının veya konsantrasyonun alt referans değerlerinin altında olup olmadığına karar vermeden önce en az 2 semen örneği değerlendirilmelidir [50]. Sperm konsantrasyonun veya sayısının düşük limitlerinin subfertiliteyi yansıtmadığı bilinmemektedir. DSÖ kılavuzunda en düşük sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml ve en düşük sayı 39 milyon olarak kabul edilmiştir [42]. Epidemiyolojik çalışmalar tartışmalı olsa da çevresel faktörlere bağlı olarak ülkeler arasında sperm konsantrasyonu açısından farklılıkların olduğu kabul edilmektedir [51, 52]. İnfertilite ile ilişkisi olmayan endokrin, dolaşım ve dermatolojik komorbiditeli hastalarda sperm konsantrasyonu bozuk çıkabileceği gibi, obezite de sperm konsantrasyonunu ve fertiliteyi azaltmaktadır [53-55]. DSÖ 2010 kılavuzuna göre belirlenmiş sperm

konsantrasyonu ve total sperm sayısına nazaran total motil sperm sayısının motilite üzerinde daha etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur [56, 57].

Sperm motilitesi mikroskop altında görsel değerlendirme ile yapılır ve total motil, progresif motil, yerinde motil ve hareketsiz spermatozoa oranları % olarak belirlenir. Bilgisayar yardımlı semen analizi yöntemlerinde de motilite ölçümü yapılmakla beraber tam standardizasyon sağlanamaması nedeniyle bu yöntem rutin kullanılmamaktadır. DSÖ 2010 kılavuzuna göre total motilite için alt referans değeri %40, progresif motilite için %32'dir [42]. Total immotil sperm izlenen olgularda santrifüj sonrası motil spermatozoa izlenen durumlara 'virtual astenozoospermi' buna karşın görülemediği durumlara 'mutlak astenozoospermi' denilmektedir.

Sperm vitalitesinin değerlendirilmesi sperm hücre membran bütünlüğünün incelenmesine dayalı bir ölçümdür ve progresif motil hücre sayısı <%40 olduğunda mutlaka yapılmalıdır. DSÖ 2010 kılavuzuna göre vitalite için alt referans değer %58'dir [42]. Hareketsiz gözlenen tüm spermilerin canlı olmadığı durum %0.2-0.5 oranında nadir izlenen olay olup, 'nekrozoospermi' adı verilmektedir.

Sperm morfolojisini değerlendirmek için farklı boyama tipleri olsa da DSÖ kılavuzuna göre en ideal yöntem papanicolaou boyama yöntemidir [42]. Bunun dışında da başka boyama teknikleri tanımlanmıştır. Bu boyama ile akrozomal alan, post-akrozomal alan, orta parça, rezidüel sitoplazma ve kuyruk ortaya konulmaktadır. DSÖ kılavuzuna göre en düşük değer %4 olarak kabul edilmiştir [42]. Çalışmalar normal sperm morfolojisinin hamile kalma süresinin önemli bir belirleyicisi olduğunu göstermiş, doğurganlık oranı ile önemli ölçüde ilişkili bulmuştur [58].

2.6.2. Sperm Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

2.6.2.1. Postkoital Test

Spermin fertilizasyon sahasına ulaşabilmesi için, serviksi ve servikal mukusu geçmesi gerekir. Spermatozoanın servikal mukusa in vitro penetrasyonu, in vivo penetrasyonuna benzerlik gösterir. Spermatozoanın servikal mukusu geçebilme kapasitesi, servikal mukus migrasyon tetkiki ile değerlendirilebilir. Migrasyonun

değerlendirilebileceği testler arasında postkoital test (PKT) de yer almaktadır. Bu test ile serviks ortamının fertiliteye uygun olup olmadığı değerlendirilir. Testte, servikal mukus normal ilişkiden 2 ila 8 saat arasında değerlendirilerek bir büyüme alanında 10 ila 20'den fazla ileri hareketli sperm olması normal olarak kabul edilir. Amerikan Üreme Tıbbı Topluluğu (ASRM), hipervisköz semen, idiopatik infertilite ve normal sperm sayısına rağmen düşük semen volümü durumlarında PKT yapılmasını önermektedir [59]. Semen kalitesi iyi olduğu halde PKT'nin bozuk çıkması kötü servikal mukus kalitesinin olduğuna işaret eder. Servikal mukusun kaliteli olmasına rağmen, hareketsiz veya yerinde hareketli sperm saptanması durumunda her iki partnerde anti-sperm antikorların araştırılmasını gerekli kılar. PKT gözden düşmüş bir test olmasına rağmen ejakülat veremeyen hastalarda kullanışlı olabilir.

2.6.2.2. Sperm Penetrasyon Testleri / Sperm Zona Bağlanma Testleri

Sperm penetrasyon testi veya hamster yumurtası penetrasyon testi, spermatozoanın, oositi fertilize etmesi için gerekli fonksiyonel kapasitesini ortaya koyar. Prensibi sperm ve oosit füzyonu için bir ön şart olan normal spermatozoanın oosit membranına bağlanabilmesi ve penetre edebilmesine dayansa da, insan oositi gerektirmesi, testin kullanımında bir kısıtlama olarak karşımıza çıkmaktadır. Düşük prediktif değerine rağmen sperm penetrasyon testinin spontan gebelik sonuçları ile korele olduğu gösterilmiştir [60].

2.6.3. İleri Sperm Testleri

2.6.3.1. Antisperm Antikor Testleri

Sertoli hücrelerinin birbirleri ile birleşerek oluşturdukları “kan-testis bariyeri” sayesinde immün sistemin mayoz sonrası germ hücreleri ile temas etmesi engellenir. Ancak testis patolojilerinde bu bariyer bozulabilir ve sperme karşı anti-sperm antikorlar (ASA) ortaya çıkar. Bu antisperm antikorlar, sperm aglutine edici, sperm immobilize edici ve spermatotoksik olabilirler. Sperm aglutine edici tipi, sperm aglütinasyonuna yol açarak motil spermatozoanın servikal mukusu penetre edebilme kapasitesini azaltırken, sperm immobilize edici antikorlar spermdeki

hareket kaybını artırır. Bu durum, postkoital testte tipik “sallanma” hareketi ile tanınabilir. Spermatotoksik tip ASA ise, kompleman bağımlı bir yolla sperm canlılığının kaybına yol açar.

ASA, fertil erkeklerin %2'sinde görülürken, infertil erkeklerde bu oran %10'a kadar çıkmaktadır [61]. ASA olan erkeklerde sperm parametreleri genel olarak normal olduğu için infertilite araştırılması yapılan tüm erkeklerde bu testin yapılması önerilmektedir [62, 63]. Özellikle artmış sperm aglütinasyonu veya bozuk PKT varlığında ASA var olabileceği akıldan çıkarılmamalıdır.

Vazektomi yapılan erkeklerin %34 ila 74'ünde ASA pozitif ve vazektomi geri dönüşü sonrasında da bu oran %38 ila 60 arasında değişmektedir [64]. Vazektomili hastalarda rutin ASA testi önerilmemektedir.

İmmünolojik infertilitede IUI yerine ICSI uygulama kararını vermede, zona pelusida (ZP) testi kullanılabilir. Sperm, ZP bağlanmasını gerçekleştiriyorsa ICSI tercih edilmelidir. Günümüzde, her spermdeki ASA miktarını ayrı ayrı ölçmek üzere akım sitometri teknikleri geliştirilmektedir [65]. Ayrıca, olası immün kontraseptif yöntemler geliştirmek için de bu teknikler kullanılarak sperm yüzey antijenleri araştırılmaktadır.

2.6.3.2. Elektron mikroskopisi

Spermatozoada, ultrastrüktürel bozukluklar olsa da viabilite testleri pozitif olabilmektedir. Spermin ultrastrüktürel detayları, elektron mikroskop (EM) altında görülebilmektedir. Düşük sperm motilitesi (<%5 ila %10) ve yüksek viabilitesi (HOST veya Eozin- Nigrosin boyamayla saptanmış) ve dansitesi olan hastalar EM değerlendirmesi için uygun adaylardır.

2.6.3.3. Biyokimyasal Testler

Akrozin, ZP glikoproteinlerine karşı lektin benzeri karbonhidrat bağlayıcı etki gösteren bir proteaz-benzeri enzimdir. Düşük akrozin aktivitesi, düşük sperm dansitesi, motilitesi ve normal morfolojinin az olması ile ilişkilidir [66].

Çinko kromatin stabilitesi ve dekonpensasyonu için ve fertilite sırasında başkuyruk ayrılması için gereklidir. Kolorimetrik metodlarla ölçülür ve ejakülat başına 13 mmol olması gerekir [42].

Seminal veziküller, sperm için taşıma ortamı olan seminal sıvı oluşumuna ve früktoz üretimi yaparak spermlerin beslenmesine katkıda bulunmaktadır. Semende früktoz düzeyleri ve sperm motilitesi arasında doğru orantı olduğu gösterilmiştir [67]. Hipofonksiyone seminal vezikül şüphesi olan durumlarda, semen früktoz testi yapılabilir. Günümüzde önerilen test ise transrektal ultrason (TRUS) ile seminal veziküllerin morfolometrik analizidir.

Karnitin düzeyleri, duktal sistemdeki tıkanıklığın yerini saptamada belirteç olarak kullanılabilir. Epididimden sonraki kısımlarda obstrüksiyon olan azospermik erkeklerde, çok düşük L-karnitin düzeyleri saptanırken, intratestiküler obstrüksiyonu olan azospermik erkeklerde, L-karnitin düzeyleri normaldir.

2.6.3.4. Reaktif Oksijen Türleri

Çalışmalar, artmış reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin, anormal semen parametreleri ve sperm DNA hasarı ile ilişkisini giderek artan düzeyde ortaya koymuştur. Bir oksidatif stres testi, fertil ve infertil erkekleri ayırabilir ve hangilerinin belli bir süre takip edildiğinde gebelik sağlayabileceğini öngörebilir. Ayrıca, bu testlerle, infertilite hastalarının hangilerinde oksidatif stresin önemli bir faktör olduğu ortaya konulabilir ve antioksidan tedaviden hangilerinin fayda görebileceği saptanabilir. Antioksidan tedavilerin artmış oksidatif stres olan erkeklerde kullanımları konusunda gerekçe ve kanıtlar bulunmaktadır [68].

2.6.3.5. Sperm DNA Hasarı

DNA fragmentasyonu ilk olarak 1993'te tanımlanmıştır ve bu test o zamandan beri subfertil erkeklerde fertilite tespitine yardımcı test olarak kullanılmaktadır. DNA hasarı multifaktöriyeldir ve etiyolojisi hakkında birçok teori mevcuttur. Bunlar arasında, protamin defekti, DNA paketlenmesini veya kompaktlaşmasını etkileyen mutasyonlar gibi teoriler mevcuttur. Sigara, kemoterapi,

testiküler karsinom ve diğer sistemik kanserler gibi birçok faktörün artmış DNA hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Günümüze kadar yapılan birçok çalışma ve geliştirilen tanı testlerinden elde edilen veriler, sperm DNA hasarı ile spermin reproduktif potansiyeli ve fonksiyonel yeterliliği arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Günümüzde sperm DNA hasarını tespiti yönelik birçok test mevcuttur. YÜT'ün artan kullanımı ve erkek genomunun bütünlüğünün IVF'de önemli bir rol oynadığının anlaşılması ile birlikte, bu testlerin kullanımı artmıştır.

Sperm DNA'sındaki fragmentasyonu saptamaya yönelik olarak kullanılan testler farklı moleküler ve biyokimyasal prensiplere göre çalışır. Bu testler genellikle fragmente DNA ile intakt DNA arasındaki farklar göz önüne alınarak geliştirilmiştir. Acridine orange test, sperm chromatin structure assay, anilin blue boyama testi, chromomycine A3 boyama, toluidin blue, in situ nick translation, terminal deoxy nucleotidyl transferase mediated D-UTP nick end labeling assay (TUNEL), sperm chromatin dispersion ve single cell gel electrophoresis veya comet assay gibi sperm DNA hasarını ölçen testler mevcuttur [69].

2.6.4. Endokrin Testler

Erkek subfertilitesinin sık bir sebebi olmamakla birlikte, infertil erkeklerin yaklaşık %3'ünde altta yatan bir endokrin neden mevcuttur [70]. Bazı yazarlar, tüm hastalarda endokrin incelemenin rutin incelenmesini önerirler de, genel görüş, endokrin değerlendirmenin anormal düşük sperm konsantrasyonu, bozulmuş seksüel fonksiyon veya testis hacminin anlamlı derecede düşük olduğu veya jinekomasti gibi endokrinopati düşündüren durumlarda yapılması yönündedir.

Başlangıç endokrin değerlendirmeleri, serum FSH ve testosteron düzeylerini içermelidir. Testosteron düzeyleri, gün içinde, normal fizyolojik bir düşüş gösterir. Bu nedenle sabah örnekleri tercih edilmektedir. Normal şartlarda, FSH sekresyonu, Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen inhibin B tarafından negatif geribildirimle kontrol altında tutulmaktadır. Serum FSH düzeyindeki artış, primer testiküler yetmezlik gibi spermatogenez bozukluklarına işaret ederken, normal FSH düzeyleri, spermatogenez bozukluğunu tamamen ekarte ettirmez. OA'de genellikle normal

gonadotropin ve testosteron düzeyleri ile karşılaştırılır. Düşük testosteron düzeyleri, hipofiz veya hipotalamus kaynaklı hipogonadizm veya primer testiküler yetmezlik ile ilişkili olabilir. Başlangıç testleri anormal ise, serbest ve total testosteron düzeylerini içerecek şekilde testosteron ölçüm tekrarı, serum LH ve prolaktin ölçümü gibi testler yapılmalıdır. Düşük FSH ve LH düzeyleri, Kallman sendromu gibi hipogonadotropik hipogonadizm sebeplerini düşündürür. Bu durumda, tiroid stimulan hormon (TSH), adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve büyüme hormonu ölçümlerini de içerecek şekilde tam bir hipofiz değerlendirmesi gerektirir.

Hiperprolaktinemide, genellikle LH düzeylerinde yükselme olmaksızın düşük serum testosteronu mevcuttur ve bu da artmış serum prolaktin düzeylerinde HHG aksın rolü olmadığını düşündürmektedir. Serum prolaktin düzeylerinde fizyolojik değişimler olabileceği için, prolaktin testleri tekrarlanmalıdır. Orta dereceli prolaktin yükselmeleri (<50 ng/ml), ilaçlara, strese ve böbrek yetmezliğine bağlı veya idiopatik olarak görülebilir. Ancak, prolaktin düzeyi persistan olarak yükseliyorsa, görme alanı testi ve hipofizer fossanın manyetik rezonans görüntülemesi gibi yöntemlerle prolaktinoma gibi bir hipofiz tümörü olup olmadığı ortaya konulmalıdır.

Östrojen fazlalığı, klinik olarak jinekomasti, azalmış libido, erektil disfonksiyon ve düşük testosteron düzeyleri ile ortaya çıkabilir.

Nadiren de, adrenal veya tiroid fonksiyonlarını bozan endokrinopatiler, erkek subfertilitesi ile karşımıza çıkabilir. Hem hiperfonksiyon hem de hipofonksiyon olmak üzere tiroid hastalıkları, bazen erkek faktör infertilitesi ile ilişkili olabilir, ancak, subklinik hipotiroidizm semen parametrelerini etkilemez [71]. İnfertil erkeklerde tiroid fonksiyon testlerinin rutin taranmasına gerek yoktur ve tiroid disfonksiyonunun klinik semptomları olan hastalar için kullanılmalıdır.

2.6.5. Genetik Testler

Genetik testler, infertilite etiyolojisinin saptanması, hastayı gelecekte bekleyen potansiyel sorunların belirlenmesi, fertilite girişimlerinden sağlanacak terapötik faydanın tahmin edilmesi ve çiftlere çocuklarına genetik geçiş konusunda danışmanlık verilebilmesi için önemlidir. İnfertil erkeklerde klinikte kullanılan genetik testlerden bazıları, hem NOA hem de ağır oligozoospermi

değerlendirmesinde kullanılan karyotip ve Y mikrodelsyonu testi ve KBVDA'ye bağlı OA değerlendirmesinde kullanılan kistik fibrozis transmembran kondüktans regülatör (CFTR) gen mutasyonu testleridir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %7'sinde, yapısal veya sayısal kromozom anomalisi mevcut olup, karyotip anomalisi insidansı, sperm konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Karyotip anomalisinin azoospermide prevalansı %10 ila %15 iken, oligozoospermide %5, normal sperm sayıları olan hastalarda ise, %1'den azdır [72].

2.6.6. Görüntüleme Yöntemleri

2.6.6.1. Skrotal Ultrasonografi

Testis patolojilerini değerlendirmek ve testis volümünü ölçmek için kullanılan ucuz ve pratik bir yöntemdir. Ultrasonografi ile konulan varikozel tanıları sıklıkla hatalı pozitif sonuç verebilmekle birlikte ven çapının 2.5 mm'den fazla olması ve reflü varlığı varikozel teşhisini doğrulayabilir. Varikozel tanısı için elle muayene altın standarttır. Operasyon kararı için testis hacimleri arasında 2 ml'den fazla fark olması yönlendirici olmaktadır. Ayrıca infertil erkeklerde artan malignensi riskinden dolayı hastalara yıllık ultrasonografi takipleri önerilebilir.

2.6.6.2. Venografi

Varikozel tanı ve tedavisinde kullanılan bu test en sensitif görüntüleme yöntemi olmakla birlikte, spesifitesinin düşük olması halen bir kısıtlama olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüksek basınçla kontrast kullanılması ve kataterin uç kısmının internal spermatik venin proksimalinde bir valvin içinden geçmesi gibi teknik nedenlerden dolayı yanlış pozitif sonuçlar meydana gelebilir. Gerek yanlış pozitif sonuçlarının fazla olması ve gerek invaziv olması nedeniyle subfertil erkeklerin tanısı değerlendirilmesinde rutin olarak kullanılmamaktadır. Varikosektomi sonrası rekürrens düşünülen hastalarda, tanının doğrulanması ve damarların embolizasyonu amacıyla kullanılabilir.

Perkütan varikozel embolizasyonu, cerrahi tedaviye göre daha yüksek rekürrens ve daha düşük başarı oranları olması sebebiyle varikozel tedavisinde ilk basamak tedavi olarak kullanılmamaktadır.

2.6.6.3. Transrektal Ultrasonografi (TRUS)

OA düşünüldüğünde TRUS yapılarak prostat, seminal veziküller, vaz deferens ampullası ve ejakülatuar kanallar hakkında bilgi sağlanır. Prostat orta hat kistlerinin tespiti ve genişlemiş seminal vezikül görünümü ilave girişimsel tetkikler gerektirebilir. TRUS eşliğinde kist aspirasyonu ve sperm varlığında TUR-ED uygulanabilir.

2.6.6.4. Bilgisayarlı Tomografi ve Manyetik Rezonans Görüntüleme

İnfertil hastalarda prolaktinoma, boş sella sendromu gibi kafa içi patolojileri ekarte etmek için kullanılabilir.

2.6.6.5. Vazografi

Erkek duktus sisteminin potensinin değerlendirilmesinde altın standart testtir. Testis biyopsisinde normal spermatogenez saptanan azospermik hastalarda veya geçirilmiş inguinal cerrahi öyküsü olan ağır oligozoospermik hastalarda tıkanıklığı tespit etmek için vazografi uygulanabilir.

2.6.7. Testis Biyopsisi

Testis biyopsisinin, erkek infertilitesinde obstrüksiyon ile non-obstrüktif testiküler patoloji ayrımı yapılması ve sperm elde edilmesi olmak üzere 2 ana rolü vardır.

Testis biyopsisinin normal testis boyutları ve kıvamı olan, serum FSH düzeyleri normal olan, azospermik, klinik olarak obstrüksiyon düşünülen hastalarda endikasyonu vardır. Orta dereceli oligozoospermik hastalarda da testis biyopsisi yapılabileceği gibi, küçük volümlü testis ve yüksek FSH gibi testiküler yetmezlik

için klinik kanıtları olan hastalarda da yapılabilir. Bu durumlarda biyopsi alınırken, aynı zamanda kriyoprezervasyon yapmak için de ayrı bir materyal alınmalıdır. Bilinen obstrüktif patolojisi olan hastalarda biyopsi endikasyonu yoktur, şüpheli olgularda obstrüksiyon değerlendirilmesinde tek taraflı testis biyopsisi yeterlidir. Kriptorşidizm veya daha önceki inguinal cerrahi sırasında vaz hasarı olduğu düşünülen hastalarda bilateral biyopsi alınabilir.

Testis dokusunun frozen incelemesinin normal spermatogenezi saptamadaki güvenilirliği, kalıcı kesitlere göre daha düşüktür. Normal formol doku koruyucusu, artefakt oluşturup histolojik analizin güvenilirliğini azaltacağı için, örnekler, Bouin, Zenker veya tamponlanmış gluteraldehit gibi özel solüsyonlara konulmalıdır.

Testis biyopsilerinin yorumlanmasında tanımlayıcı analiz gerektiği için bu konuda deneyimi olan patoloğların örnekleri incelemesi daha uygundur. Germinal epitelin elektron mikroskobunda incelenmesi daha fazla klinik fayda sağlamaktadır. Testis biyopsisinde birçok objektif histolojik skora sistemi geliştirilmişse de analizin zaman alması ve valide edilmiş çalışmaların olmamasından dolayı kullanımı sınırlı kalmıştır [73].

Testis biyopsisinde patoloji değerlendirmesinde kullanılan güncel sınıflandırma, normal, hipospermatogenezis (HS), matürasyon arresti (MA), germinal aplazi ve son dönem testis olarak düşünülebilir.

Normal: Testis hacminin %85'ten fazlasını, seminifer tübüller ve destekleyici Sertoli hücreleri oluşturmaktadır. Geri kalan %15'lik kısım ise kan damarları ve Leydig hücrelerinden oluşur. Spermatogenez, bazal membranda spermatogonya ile başlayan, spermatosit ile devam eden ve tübül lümene gelindiğinde, spermatozoa ile sonlanan kademeli bir süreçtir. Tip A spermatogonya, kök hücre bileşenini temsil eder ve diploid (2N) kromozoma sahiptir. Bu hücreler mitoz bölünmeyle kök hücreden farklılaşır ve tip B spermatogonyayı oluşturur. Tip B spermatogonya da aynı şekilde diploid kromozoma sahiptir. Sonrasında tip B spermatogonyada DNA sentezlenir ve tetraploid (4N) kromozoma sahip spermatositler oluşur. Art arda geçirilen iki mayoz bölünme ile haploid (N) kromozomlu spermatidler ortaya çıkar. Sonrasında matürasyonla önce yuvarlak, devamında elonge spermatidler ve son olarak da matür spermatozoa oluşur. Diğer memeli testislerinden farklı olarak, insan

testisinde, bir tübüler bölgede spermatogenezin farklı evreleri izlenebilir. Azoospermide biyopsinin normal olması duktus obstrüksiyonu için patognomoniktir. Fokal olarak MA ve HS görülse de bunlar obstrüksiyon için klasik bulgular değildir [74]. Obstrüksiyon durumunda ayrıca intraluminal debris olan dilate tübüller de görülebilir.

Hipospermatogenezis: HS'de, histolojik kesitte spermatogenezin bütün basamakları mevcuttur fakat tüm germ hücrelerinin sayıları orantısal olarak azalmıştır. Azalmanın derecesi hastanın oligozoospermik ya da azoospermik olmasını etkiler. Ejekülatta sperm saptanması için, belirli seviyenin üzerinde sperm üretimi gerekli olduğu için azoospermik hastalarda HS sık bir bulgudur.

Matürasyon Arresti: Sperm matürasyonunun, spermatogenezin belli bir basamağında durmasıdır. Genellikle primer spermatosit veya geç spermatid düzeylerinde olmaktadır. Geç MA, normal biyopsiden ayırt etmek güçtür fakat testis preparatlarında matür sperm olması, normal spermatogenez tanısını destekler. Tam MA'nde azoospermi olurken, parsiyel MA'nde ağır oligozoospermi görülebilir. Sertoli ve Leydig hücreleri ile bazal membranı da içerecek şekilde, geri kalan testiküler yapılar genellikle normaldir. MA'da, hipotalamus-hipofiz-gonad sisteminin intakt olduğu için, FSH ve inhibin düzeyleri gibi endokrin testler normal olabilir. MA ve duktus obstrüksiyonu, normal testis volümü ve benzer endokrin profille ortaya çıktığından dolayı, klinik bulguları aynı olabilmektedir.

Germinal Aplazi: Sertoli cell only (SCO) sendromu olarak da bilinen germinal aplazide, germ hücrelerinden yoksun k  k seminifer tübüller vardır. Sertoli hücreleri ve bazal membranlar dâhil olmak üzere diğer interstisyel bileşenler normaldir. K  k volümlü testisi olan ve FSH düzeyleri yüksek, primer testiküler yetmezlik ile uyumlu azoospermik hastalarda, germinal aplazi düşünülmelidir. Testisin diğer alanlarında düşük düzeyde spermatogenez görülebildiği için, bu durum hastaların bazılarında mTESE yapılmasına dayanak sağlar.

Son Dönem Testis: Kalın bazal membranlar, tübüler ve peritübüler sklerozun olması fakat germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinin olmaması, son dönem testis için karakteristiktir. Bu hastalarda, 2-3 ml civarında k  k, yumuşak testisler ile birlikte

azoospermi görülür. Bu hastaların bazılarında halen küçük odaklar halinde spermatogenezis olabilir ve mTESE ile saptanabilir.

2.7. EN SIK İNFERTİLİTE NEDENLERİ, TANI VE TEDAVİLERİ

İnfertilite tanı ve tedavisinin amacı, güvenli, doğal, çabuk ve maliyet fayda oranı iyi bir şekilde başarılı bir gebelik elde etmektir. İnfertilite tedavisinde, ICSI gibi YÜT teknolojileri yardımcı araçlar olsa da, bu tedavilere geçilmeden önce, altta yatan erkek faktörden kaynaklanan patolojileri ortadan kaldırmak üzere tüm girişimler yapılmalıdır. Bu teknolojilerin yüksek maliyetinin olması, erkek faktörüne bağlı tedavi yükünün kadın partner üzerine yüklenmesi ve ICSI ile ilgili güvenlik problemleri, ICSI denenmeden önce düzeltilebilir erkek faktörlerinin tamamıyla araştırılmasını gerektirmektedir.

2.7.1. Azoospermi

Azoospermi, ejakülatta sperm olmaması olarak tanımlanır ve infertil erkeklerin %10 ila 15'inde görülmektedir [75]. Başka tanı testlerine geçilmeden önce, en az iki ayrı santrifüj edilmiş semen örneğiyle, azoospermi doğrulanmalıdır. Santrifüj edilmiş spesmen içinde bir sperm olması bile, KBVDA gibi komplet duktal obstrüksiyon nedenlerini ekarte ettirebilir ve ICSI için kriyoprezervasyona uygun olabilir.

Azoospermide etiyolojik sebepler pretestiküler, testiküler ve posttestiküler olmak üzere üç kategoriye ayrılabilir.

Primer testiküler yetmezlik testiküler patolojilere bağlı oraya çıkar ve sebep intrinsek spermatogenez bozukluklarıdır. Y kromozomu mikrodelsiyonu veya kromozomal anormallikler gibi genetik nedenlerle, varikosele bağlı olarak veya ilaçlar ve gonadotoksik ajanlarla testiküler yetmezlik gelişebilir. İdiopatik infertiliteden ayrımı için ise testiküler biyopsi gereklidir. Azoospermi ile birlikte primer testiküler yetmezlik, genellikle NOA olarak adlandırılır ve ICSI uygulamak üzere testiküler sperm ekstraksiyonu en iyi tedavidir.

Sekonder testiküler yetmezlik olarak adlandırılan pretestiküler sebepler genellikle endokrin sebeplerle ortaya çıkarlar. Konjenital veya kazanılmış hipogonadotropik hipogonadizme bağlı olarak görülebirlirler.

Ejekülatuar disfonksiyon ve genital trakt obstrüksiyonları nedeniyle ortaya çıkan post-testiküler patolojiler azoospermi vakalarının %40'ını oluşturmaktadır. (Amerikan Üreme Tıbbı Topluluğu [ASRM] Uygulama Komiteleri, 2008) Pre-testiküler ve post-testiküler patolojiler tedaviden daha fazla yarar sağlarken, testiküler patolojisi olan hastaların tedavide başarı oranları o kadar fazla değildir. Testis boyutu normal, vaz deferensi palpable ve serum FSH düzeyleri normal olan hastalarda, obstrüksiyonu spermatogenez bozukluklarından ayırt etmek için testis biyopsisi gereklidir. Testis biyopsisinin normal olması, obstrüksiyon için patognomoniktir. Bu hastalar, patens sağlamak isterlerse, rekonstrüksiyon planlanan zamanda skrotal eksplorasyon ve vazografi yapılarak tıkanıklık noktası belirlenmelidir. Epididim veya vaz deferens noktasındaki obstrüksiyonlar, epididimal obstrüksiyon için vazoepididimostomi, vazal obstrüksiyon için vazovazostomi yapılabilir. OA ve buna bağlı infertilitenin en sık sebebi vazektomidir. Eğer vaz deferense vazektomi yapılmamış veya herni onarımı sırasında iatrojenik olarak yaralanmamışsa, idiopatik duktus obstrüksiyonu olan birçok erkekte obstrüksiyon epididim düzeyinde görülür. Vazovazostomide rekonstrüksiyon başarısı, obstrüksiyon süresi, cerrahi sırasında proksimal vazdaki sıvının kalitesi ve cerrahın deneyimi gibi bir takım faktörlere bağlıdır [76].

Hem primer hem de sekonder testiküler yetmezlikte testis hacmi ileri derecede küçük olduğu için ayırımında FSH, LH, testosteron ve prolaktin düzeyi gibi endokrin testler kullanılır. Normalin iki katından fazla FSH düzeyi olan hastaların etiyolojileri genellikle primer testiküler yetmezlikle ilişkili olup bu hastalara obstrüktif etiyolojileri ekarte etmek için testis biyopsisi yapılması gereksizdir.

Düşük semen volümü ve palpable vaz ile birlikte azoospermi durumu, genellikle obstrüksiyon ile ilişkilidir, ancak küçük bir kısmında ejekülatuar disfonksiyon da bulunabilir. Düşük volümlü, asidik pH'lı ve fruktozu olmayan ejakülatlı hastalarda obstrüksiyon düşünülmelidir. Bu hastalarda, TRUS'ta genellikle

orta hat prostat kistleri, dilate ejakülatuar duktuslar veya dilate seminal veziküller görülür ve seminal vezikül aspirasyonunda, yüksek düzeylerde sperm saptanır.

2.7.2. Oligozoospermi

Oligozoospermi sperm dansitesinin 15 milyon/ml altında olmasıdır. Azoosperminin aksine oligozoospermi yapan neden çok daha fazladır. Sperm konsantrasyonu 10 milyon/ml'nin üzerinde olan olgularda endokrinolojik bozukluklar nadiren görüldüğü için testosteron ve FSH gibi rutin endokrinolojik tetkikler bu sayının altındaki sperm sayısına sahip hastalarda bakılmalıdır [77]. Hafif ve orta dereceli oligozoospermisi olan hastalarda biyopsi endikasyonu olmasa da, sperm konsantrasyonu 1 milyon/ml'nin altında ve öykü ve muayene bulgusu obstrüksiyonu düşündüren hastalara biyopsi uygulanabilir.

2.7.3. Varikosel

Testiküler venöz drenajı sağlayan pleksus pampiniformisin dilatasyonu olan varikosel, yaşla birlikte progresif testiküler hasara yol açan ve cerrahi olarak düzeltilebilen bir hastalıktır. Fertilite üzerine etkileri sperm sayısı, morfolojisi ve motilitesi gibi semen parametre anomalileri, testis volmünde azalma ve leyding hücre disfonksiyonu ile ilişkilidir. Bazı meta-analizlerde varikosel tedavisi gören gruplarda tedavi edilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek spontan gebelik oranlarının saptanması varikosel mevcudiyetinin fertilite üzerine olumsuz etkisini ortaya koymaktadır [78].

Varikoselin, sol testiküler venin, sol renal vene dik açılı girişine bağlı türbülant akımdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Varikoselin sol tarafta daha fazla görülmesi bu düşünceyi desteklemektedir. Ayrıca, gonadal venlerde yetersiz valv mekanizması olması veya olmaması da, ayakta dururken skrotuma retrograd kan reflüsüne izin vermektedir [79].

Varikoselin spermatogenezi nasıl bozduğuna dair ana teori, varikosele bağlı venöz göllenmenin intraskrotal sıcaklığı artırması ve Leydig hücrelerinde testosteron sentezinin bozulmasıdır. Sonuçta, germinal hücre membranları

hasarlanmakta, protein metabolizması değiştirmekte ve Sertoli hücre fonksiyonu azalmaktadır [80]. Varikoselektominin intraskrotal sıcaklığı azalttığı gösterilmiştir [81]. Sol renal venden renal ve adrenal metabolitlerin reflüsünün de direk gonadotoksik etkisi olduğu ve seminal oksidatif stres düzeyinin varikosel derecesi ile orantılı olduğu ve varikosel tedavisi ile gerilediği bildirilmiştir [82, 83].

Varikoselli bir infertil erkekte tedavi endikasyonları, kadın partnerin normal veya düzeltilebilir bir fertilitate problemi olduğu takdirde erkekte palpable varikosel varlığı, artmış DNA hasarı ve semen parametrelerinde bozulmadır [84, 85].

Klinik varikoseli olan ve semen parametreleri bozuk hastalarda varikosel tedavisine yönelik anlamlı derecede kanıt bulunmaktadır. Varikosel tedavisi sonrası spontan gebelik oranları, %30 ila %50 arasında bildirilmiştir [86, 87] ve gebelikler, tedavi sonrası ortalama 8 ayda oluşmuştur [88].

YÜT'deki gelişmeler varikoselin cerrahi tedavisindeki etkisini azaltmayıp aksine son yıllarda varikosel tedavisinin YÜT üzerine olumlu etkisi olduğu yönündedir. Dört retrospektif çalışmanın derlendiği bir meta-analizde varikoselli erkeklerde varikosel tedavisi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, varikoselektominin gebelik oranını 1.59 kat ve canlı doğum oranını 2.17 kat arttırdığı bildirilmiştir [89].

2.7.4. Kriptorşidizm

İnmemiş testis, yeni doğanların %2,7'sinde, 1 yaşındakilerin ise %0.8'inde görülür [90]. Testis boyutunda ve sperm sayısında azalma, serum inhibin düzeyinde düşüklük ve serum FSH düzeylerinde yükseklik ile beraber giden bir infertilite kaynağıdır [91]. Fertilitate inmemiş testis tedavisindeki temel hedeftir. Kriptorşid testisi, retraktil testisten ayırmak gereklidir. Retraktil testis baskılanmış spermatogeneze yol açtığı bilinse de, kriptorşid hastalarda, semen kalitesinde çok daha fazla bozulma saptanmıştır [91]. Kriptorşidizm, testiküler disgenezi, bozulmuş endokrin aks, immünolojik hasar ve obstrüksiyon gibi mekanizmalar ile infertiliteye yol açar. İnguinal testislerde %20-40 germinal aplazi saptanırken, abdominal testislerde bu oran %90'lara kadar çıkmaktadır [92].

2.7.5. Endokrinopatiler

Testosteron düzeyinin 300 ng/dl altında olması hipogonadizm olarak tanımlanmaktadır ve NOA, oligozoospermik ve normal semen parametreleri olan hastalarda sırasıyla %45, %43 ve %35 oranında görülmektedir [93]. Primer testiküler yetmezlikte düşük testosteron ve artmış gonadotropin seviyeleri görülürken hipogonadotropik hipogonadizm olarak da bilinen sekonder hipogonadizmde, hem düşük gonadotropin düzeyleri hem de düşük testosteron saptanır.

Hipogonadizm kliniği, başlangıç zamanına göre değişkenlik gösterir. Pubertede olması gereken testosteron pikinin olmaması, puberte gecikmesine veya puberte olmamasına, gelişme geriliğine, küçük, yumuşak testise yol açar. Pubertede sonrası ortaya çıkan hipogonadizimli hastalarda, sekonder seks karakterleri ve vücut yapısı normal olarak izlenirken, küçük, sert testis saptanır.

2.7.5.1. Hipogonadotropik Hipogonadizm

Hipogonadotropik hipogonadizm (HH) veya sekonder hipogonadizm, hipofizer gonadotropin hormonlarının yeterli salgılanmamasından kaynaklanan gonadal yetersizlik sonucu oluşan klinik tablo olarak tanımlanmaktadır. İzole gonadotropin yetmezliği veya HH, subfertilite hastalarının %1'den azında görülür ve konjenital ya da kazanılmış olabilir [70]. Kazanılmış hipogonadizm etiyolojisinde, geçirilmiş cerrahi, infarkt, tümörler veya enfeksiyonlara bağlı hipofiz bozuklukları ve metabolik hastalıklar yer alır.

Konjenital HH'nin değişik formları mevcut olmakla birlikte, en sık 1/10000-1/60000 doğumda bir görülen Kallman sendromudur. Kallman sendromu, hipotalamusun GnRH salgılamasında yetersizliğe bağlı olarak düşük gonadotropin düzeyleri olmasına ve bundan dolayı prepubertal testisin postpubertal fonksiyonel döneme geçememesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Kallman sendromunda azoospermiye ek olarak anozmi, orta hat yüz defektleri, jinekomasti, nörolojik patolojiler, tek taraflı renal agenezi, kriptorşidizm ve mikropenis eşlik edebilir. Konjenital HH'nin diğer formları olan Prader Willi ve Laurence Moon Biedl sendromunda şişmanlık ve hipogonadotropik hipogonadizm, boy kısalığı birlikteliği vardır [94].

Hipotalamik yetmezliğe bağlı idiopatik hipogonadotropik hipogonadizmde pulsatil GnRH tedavisi fertilitenin sağlanmasında etkilidir. Cilt altına yerleştirilen, ritmik olarak GnRH enjeksiyonu yapan bir pompa aracılığı ile tedavi uygulanır. Seçilmiş vakalarda oldukça başarılı sonuçlar alınabilmektedir [95] fakat hipofizer kaynaklı hipogonadizmde ve GnRH reseptör rezistansında etkili değildir.

Konvansiyonel gonadotropin tedavisi, insan idrarından elde edilen hCG ve hMG (human menopozal gonadotropine) kullanılarak yapılır. hCG, LH ile benzer yapıdadır Leydig hücrelerine bağlanarak testosteron salgısına neden olduğu gibi az da olsa tübül hücrelerine bağlanıp intrensek olarak FSH benzeri etki gösterdiğini bildiren çalışmalarda vardır [96]. hMG ise FSH ile benzer yapıdadır ve spermatogenezi uyarabilir. hMG'in kısmi LH benzeri etkisi olsa da, spermatogenezi sağlamak için kullanılan doz Leydig hücrelerini uyarmaya yeterli olmamaktadır. Bu yüzden yeterli testosteron üretimi için hCG kullanılmalıdır. Konvansiyonel gonadotropin tedavisine önce hCG tedavisi ile başlanır. hCG intramusküler veya subkütan enjeksiyon ile uygulanır. Genellikle haftada 2- 3 kez 1000-2500 IU verilir. Doz testosteron düzeyini normal aralıkta tutacak şekilde ayarlanır. Tedaviye bu şekilde en az 8-12 hafta devam edilir. Daha sonra tedaviye intramusküler veya subkütan yolla uygulanabilen hMG veya rekombinant FSH eklenir. Haftada 2-3 kez 75-150 IU uygulaması önerilir [97]. Konvansiyonel olmayan gonadotropin tedavisi, ileri derecede saflaştırılmış idrar FSH'sı ve rekombinant insan FSH'sı ile yapılmaktadır. Testosteron replasman tedavisi, spermatogenez sağlandıktan sonra IHH'in idame tedavisinde kullanılmaktadır. Serum testosteron düzeyinin fizyolojik sınırlar içerisinde tutulması, sekonder seks karakterlerinin ve seksüel fonksiyonların devamını sağlanması replasman tedavisinin ana hedefidir.

2.7.5.2. Androjen Fazlalığı

Androjen fazlalığı, endojen veya ekzojen olarak ortaya çıkabilir. Endojen artış, KAH veya testisin ya da adrenal bezin androjen üreten tümörlerine sekonder olabilir. Endojen olarak en sık görülen etiyoloji olan KAH, kortizol ve aldosteron sentezinde görev alan bazı enzimlerin eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkar. KAH hastalarının incelendiği küçük bir seride, erkeklerin %60'ı tedavi altında veya

tedaviye gerek kalmadan gebelik elde etmişlerdir [98]. Ekzojen olarak anabolik steroidler de spermatogenezi bozarak erkek infertilitesine bir yatkınlık oluşturlar.

Sonuç olarak androjen fazlalığı, gonadotropin salınımının hipotalamus ve hipofiz aksını bozarak spermatogenez inhibisyonuna yol açabilir. Bunun sonucunda oluşan düşük intratestiküler testosteron, spermatogenezin sürdürülmesi için yeterli değildir. Bu bakımdan ekzojen testosteronun kontraseptif rolüne yönelik çalışmalar giderek artmaktadır.

2.7.5.3. Hiperprolaktinemi

Prolaktin, polipeptid yapıda bir hormondur. Sentezi ve salınımı hipotalamustan salgılanan PRL salgılatıcı ve inhibe edici faktörlerin etkisi ile hipofizdeki laktotrof hücrelerden gerçekleşir. Hipotalamik dopamin prolaktin salınımını inhibe eder. Başlıca kadında laktasyondan sorumlu olan prolaktin hormonu ayrıca nörotransmitter, büyüme faktörü veya immünregülatör olarak da rol oynayabilir [99].

İnfertil erkekte erektil disfonksiyon, azalmış libido veya düşük testosteron seviyesi olmadığı müddetçe serum prolaktin ölçümüne gerek yoktur. Hiperprolaktinemi, genellikle uykudan kalktıktan en az 2 saat sonra veya günün herhangi bir saatinde bakılan prolaktin düzeyinin erkeklerde 20 ng/mL üzerinde bulunmasıdır [99]. Fizyolojik, farmakolojik ve patolojik olarak hipotalamo–hipofizer yolaktaki dopamin inhibisyonunun ortadan kalkmasına bağlı olarak gelişebileceği gibi idiopatik de olabilir. Serum prolaktin düzeyleri dalgalanma gösterdiğinden, yüksek serum prolaktin düzeyi ölçümü, en az bir test daha yapılarak doğrulanmalıdır. Sonrasında gadolinyum içeren kontrast madde kullanılarak yapılan MR görüntüleme yapılabilir ve mikroadenomlara medikal, makroadenomlara cerrahi tedavi önerilebilir.

2.7.5.4. Östrojen Fazlalığı

Erkeklerde hiperöstrojenemi, hepatik hastalıklara, östrojen üreten tümörlere veya obeziteye bağlı olabilir. Sertoli - leydig hücreli testis tümörleri ve adrenal

kortikal tümörler östrojen düzeylerini yükseltebilirler. Obez hastalarda serum östrojen seviyesindeki artış, bir aromataz enziminin, periferde testosteronu östrojene aromatize etmesinden kaynaklanır. Serum androjen düzeyi ile obezite derecesi ters orantılıdır [100].

Hiperöstrojenemi, hipotalamustan GnRH ve hipofizden gonadotropin salınımını baskılayıcı etkisi vardır. Buna ek olarak, spermatogenez üzerinde direk zararlı etkileri de bulunmaktadır. İnfertil hastada hormonal değerlendirmede, düşük serum FSH, LH ve testosteronu, yüksek serum östron ve östradiolü saptanır.

2.7.6. Genetik Sendromlar

2.7.6.1. Klinefelter Sendromu

Klinefelter sendromu veya 47,XXY erkek sendromu karyotip bozukluklarına bağlı genetik sebepler arasında NOA'nın en sık sebebidir ve canlı erkek doğumların 1/500 ila 1/1000'inde görülmektedir [101-103]. KS, fenotipik olarak erkek bireylerde tespit edilmektedir ve bu erkeklerde germ hücrelerinden yoksun küçük sert testisler (<8-10 ml testis hacmi) bulunur. Fenotipleri normal erkek fenotipinden farklılıklar gösterebilir. Dişi saç dağılımı, azalmış vücut kılı, geç epifiz kapanmasına bağlı uzun kol ve bacaklar, dar omuzlar, kısa gövde ve jinekomasti ile beraber önükoid bir vücut yapısına sahiptirler.

KS erkekte Leydig hücre fonksiyonu genellikle bozulmuştur [104]. Testosteron düzeyleri normal veya düşük, östrojen seviyeleri normal veya yüksek olabilir. Artmış gonadotropin düzeyleri ve azospermi görülme olasılığı çok yüksek iken, libido azalması genellikle görülmez.

Klinefelter mozaizmi (46, XY/47,XXY) bulunan erkeklerin testislerinde germ hücre varlığı ve sperm üretimi değişkendir. Bu hastalarda semende sperm saptanabilir. Mozaizm bulunan erkeklerin spermalarında %0.9-%2.1 oranında KS hastalarının spermalarında %1.36-%25 oranında 24, XY genotipi olabilir [104-106].

Klinefelter sendromlu hastalarda 47, XXY spermatozoa üretim olasılığı yüksektir. YÜT uygulandığında, pre-implantasyon tanısısal uygulamalar yapılmalıdır, eğer yapılamıyorsa, amniyosentez ve fetal karyotip analizi yapılması uygundur.

Analiz sonucunda Klinefelter karyotipi tespit edilen embriyolar implante edilmemelidir. Klinefelter sendromlu erkeklerde yaşlandıkça androjen eksikliğine bağlı hormon replasmanı gerekebilir. Sperm elde edilmesi amacı ile opere edilen KS tüm erkekler endokrin açıdan izleme alınmalıdır.

2.7.6.2. 46, XX Erkek Sendromu

1/20000 canlı doğumda bir görülen 46,XX erkek sendromu, seks reversal sendromu olarak da bilinmektedir. Bu sendrom kromozomların yapısı ve sayısı ile ilgili bir hastalıktır. KS'nin bir çeşidi olup pubertede jinekomasti ve azoospermi ile kendini gösterir. Hipospadias insidansı artmış fakat kongnitif fonksiyonlar korunmuştur. KS hastalarının aksine, bu erkeklerde, AZFa, AZFb ve AZFc bölgeleri bulunmamakta ve spermatogenez gerçekleşmemektedir. Bu hastalardan başarılı sperm elde edilmesine dair bir veri olmadığı için biyopsi önerilmemektedir.

2.7.6.3. 47, XYY Sendromu

Erkek doğumların %0.01'inde görülen 47, XYY erkekler uzun boylu olup %2'si saldırgan ve antisosyal davranışlar gösterir. FSH yükselmiş, LH ve testosteron seviyeleri normaldir. Semen tahlilinde genellikle oligozoospermi veya azoospermi tespit edilir. Oligozoospermi veya azoospermi ile başvururlar. Bu hastalara sperm ekstraksiyonu veya YÜT öncesinde genetik danışmanlık gerekmektedir.

2.7.6.4. Noonan Sendromu

Erkek Turner sendromu olarak adlandırılan Noonan sendromu pek çok özellik bakımında Turner sendromuna benzerlik gösterirken, Turner sendromunun aksine normal bir 46, XY karyotipi ve otozomal dominant bir kalıtım gösterir. Fenotip olarak, kısa yapı, yele boyun, kubitus valgus, pulmoner stenoz, hipertrofik kardiyomyopati, düşük ense çizgisi ve pitozis görülebilir. Fertil olabilmelerine karşın, %77'sinde kriptorşidizm ve buna bağlı spermatogenez bozuklukları ile beraber artmış gonadotropin düzeyleri bulunur [107].

2.7.6.5. Y Mikrodelesyonları

Fertil popülasyonda da görülebilen mikrodelesyonlar, infertil popülasyonda daha sıktır [108]. Mikrodelesyonlar Y kromozomunda, üç adet üst üste çakışmayan AZF a-b-c bölgelerinde bulunmaktadır. Bu bölgelerin mutasyon veya delesyonu, spermatogenezin ileri derecede bozulmasıyla sonuçlanabilir.

RMB, DAZ, DFFRY, DBY ve XXX'i içeren bir çok gen tanımlanmış olsa da DAZ genini içeren AZFc bölgesindeki mikrodelesyon en sık gözlenen anomalidir. Fakat DAZ delesyonu ile spermatogenezin varlığı ve yokluğu arasında tam bir ilişki yoktur. AZFa bölgesinde delesyon NOA olan erkeklerin %1'inde bildirilmiştir. AZFa mikrodelesyonu, germinal hücre aplazisi ile ilişkilidir ve başarı şansı çok düşük olduğu için TESE endikasyonu yoktur [109]. AZFa gibi, AZFb mikrodelesyonları da çok sık görülmezler ve düşük cerrahi sperm ekstraksiyonu başarısı ile ilişkilidirler.

Eğer mikrodelesyonu olan bir erkek ve partneri ICSI ile devam etmek isterse, mikrodelesyonların erkek çocuklarına geçeceği ama kız çocuklarına geçmeyeceği hakkında bilgi verilmelidir. Erkek çocuklara geçecek delesyonun babalarınınkinden daha geniş olabileceğine ait bulgular mevcut olduğu için çiftlere bu bilgi verilmelidir. Ayrıca çiftlere mikrodelesyonların başka bir sağlık problemi yaratmayacağı söylenmelidir.

2.7.6.6. İnternal Duktus Gelişim Bozuklukları

Konjenital bilateral vas deferens agenezisi: CFTR disfonksiyonunun en ağır formu kistik fibrozisken, en hafif formu KBVDA'dır [110]. Kistik fibrozis beyaz ırkta en sık rastlanan ölümcül otozomal resesif hastalıktır. CFTR, 7. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiştir. Bu gen iyon kanalı olarak fonksiyon gören bir membran proteinini kodlarken bununla birlikte ejakülatuar kanal, seminal vezikül, vaz deferens ve epididimin distal 2/3'ün formasyonunu da etkiler.

OA'lı erkeklerin yaklaşık %2'sinde CFTR mutasyonu saptanmıştır [111]. Ancak OA insidansı farklı ülkelerde farklılık göstermektedir. Agenetik vaz deferensin klinik tanısının atlanmaması için, özellikle semen hacmi $\leq 1.5\text{ml}$ ve

pH $\leq$ 7.0 olan tüm azoospermik erkekler, KBVDA ekartasyonu için dikkatlice muayene edilmelidir.

Spermatogenez bu hastalarda genellikle normal olduğundan kaput epididim veya testisten yapılan sperm elde etme teknikleri ile ICSI için sperm ekstraksiyonu genellikle başarılı olur ve elde edilen sperm kalitesi iyidir. Bu hastalardan alınıp, kriyoprezervasyon ile belirli bir süre saklanan spermler ile yapılan ICSI ile elde edilen gebelik oranlarıyla taze spesmenler ile yapılan ICSI gebelik oranları eşittir [112].

2.7.6.7. Ultrastrüktürel Sperm Anomalileri

2.7.6.7.1. Primer Silyer Diskenezi

İmmotil silia sendromu olarak da bilinen Primer Silyer Diskinezi, flagellumun, sperm motilitesinin yanı sıra tüm respiratuar yolların ve sinüs yüzeyini etkileyen ultrastrüktürel anomalilerini içeren bir spektrumdur. Hastalar ilk şikâyet olarak çocukluk döneminde mukusun üst solunum yollarına ve sinüslere doğru olan hareketinin bozulması ile gelişen sinüzit ve kronik bronşiektazi infertilite ile başvururlar. Ultrastrüktürel defektin tedavisi olmasa da, ICSI uygulanarak normal doğum elde edilebilir [113]. Bu hastalarda genetik danışmanlık çok önemlidir.

2.7.6.7.2. Globozoospermi

Yuvarlak başlı sperm sendromu olarak da adlandırılan globozoospermi, infertil erkeklerin %0.1'inden daha azında görülür. Sperm konsantrasyonu ve motilitesi normal olmakla beraber, akrozomal başlığın ve akrozin enzim paketinin olmaması nedeniyle, spermatozoalar yuvarlak başlı görülürler. Bu defekt, spermin oosite penetrasyonunu ve fertilizasyonu engeller. Bu hastalarda ICSI'nin başarılı olduğu bilinmektedir.

2.7.6.7.3. Fibröz Kılıf Displazisi

Kısa kuyruk sendromu olarak da bilinen fibröz kılıf displazisi, sperm kuyruğunun yapısal ve fonksiyonel bozuklukla sonuçlanan malformasyonu olarak bilinir. Genetik temeli henüz belirlenememiş olmasına rağmen ICSI başarılıdır ve genetik danışmanlık önerilir.

2.7.7. Ejekülatuar Disfonksiyon

Erkek infertilitesinin nadir bir nedeni olmasına rağmen ejakülasyon bozukluğu hastaların çoğunda fertilité de iyileşme sağlayan tedavilere iyi cevap verebilir. Ejakülasyon semenin üretradan dışarı atılması için hem periferik hem de merkezi sinir sisteminin koordinasyonlu çalışmasını gerektiren karmaşık bir durumdur. Semen üretiminin üç farklı aşaması vardır: Emisyon, mesane boynu kapanması ve ejakülasyon.

Ejakülasyon bozukluğu için çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Kaynağına göre ejakülasyon bozukluğu fonksiyonel, nörojenik veya anatomik (retrograd ejakülasyon) olabilir. Fonksiyonel bozukluklar prematüre ve gecikmiş ejakülasyonu içerir. 18-60 yaş arasındaki erkeklerin %30 undan fazlasında görülen erken boşalma erkek cinsel işlev bozukluğunun yaygın bir şeklidir. Nörojenik ejakülasyon kaybı genellikle spinal kord yaralanmasının bir sonucudur. Bu hastalarda ejakülatuar disfonksiyona ek olarak erektil disfonksiyon da vardır. Testislerin ısı düzensizliğine bağlı spermatogenez yetmezliği, spermatozoa stazı ve kronik genital sistem enfeksiyonları görülür. Bu hastalarda oral terapinin yeri kısıtlıdır ve ejakülasyon problemini çözmek için penil vibrostimülasyon, elektro-ejakülasyon veya sperm elde etme teknikleri uygulanabilir. Retrograd ejakülasyon mesane boynu kapanmasında yetersizlik olmasına bağlı seminal sıvının normal antegrad akışı yerinde mesaneye doğru akmasıdır. Ejakülasyon sonrası santrifüj edilmiş idrarda her mikroskop alanında 10-15 adet sperm görülmesi ile tanı konur. Sebepleri arasında alfa blokör ve antidepresan kullanımı, transüretal prostat rezeksiyonu, multiple skleroz ve diyabet gibi nörolojik patolojilere bağlı gelişen mesane boynu yetersizliği gösterilebilir.

2.7.8. İdiopatik İnfertilite

Erkek infertilitesinde gerek tanı gerek de tedavi seçeneklerinin ilerlemesine rağmen hala bir kısım hastanın etiyolojisi aydınlatılamamıştır. Anormal sperm parametresi olan hastaların %30'undan fazlasında açıklanabilir bir neden bulunamamıştır [114]. İlerleyen tanısal çalışmaların, gelecekte bu hastaların subfertilite etiyolojilerini ortaya koyacağı düşünülmekle beraber günümüzde bu hastalar spesifik tedaviye cevap vermeyen idiyopatik bozukluklar olarak tanımlanmaktadır. Hastalara ampirik medikal tedavi veya YÜT önerilmektedir. Ampirik farmakolojik tedaviler endokrin ajanları ve halen deneysel olan birçok ajanı kapsamaktadır. Ampirik tedavilerin kullanımını destekleyen küçük serili çalışmalar olsa da bu popülasyonda bu alanda geniş serili plasebo kontrollü çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

2.8. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

İngiltere'de 1978 yılında Louis Brown'ın in vitro fertilizasyon yöntemi ile dünyaya gelmesi, üreme tıbbı ve infertilite alanında büyük yankı uyandırmıştır. Bu olay normal yollarla çocuk sahibi olamayan pek çok çift için umut veren bir gelişme olmuştur. İlk zamanlarda bu yöntem tubal tıkanıklığa bağlı obstrüksiyonu bypass etmek için kullanılsa da, sonralarda idiyopatik erkek infertilitesinde, açıklanamayan infertilitede ve hatta azoospermik erkeklerde testis dokusundan sperm elde edildiğinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Teknikler, gebelik şansını artırmak amacıyla, sperm ve ovumun veya her ikisinin birden manipülasyonunu içerir. Kadınlarda çok sayıda ovumun gelişimini uyarmak amacıyla oral klomifen sitrat veya parenteral gonadotropinler kullanılarak kontrollü ovaryan hiperstimülasyon yapılır.

2.8.1. Artifisyonel İnseminasyon (IUI)

İntrauterin inseminasyon (IUI), seçilmiş çiftlerde normal yolla fertilizasyon şansını arttırmak amacıyla gametlerin sayı ve kalitesini artırılmasını sağlar. Diğer YÜT'lere göre daha az invaziv ve daha ucuzdur. Uzun zamandır kullanılan ilk ve

orijinal teknik orijinal teknik, işlenmemiş semen örneğinin, vajenin üst kısmına yerleştirildiği, intravajinal inseminasyondur. Sonrasında servikal başlıklar geliştirilmiş ve başarılı şekilde uygulanmıştır. Direkt olarak servikal kanül yardımıyla yıkanmış yüksek konsantrasyondaki spermelerin uterusu bırakılması (intrservikal inseminasyon) ile vaginal yola göre daha yüksek gebelik oranları bildirilmiştir. Maliyeti az olduğundan hafif veya orta şiddetli erkek faktörüne bağlı infertil çiftlerde uygun bir tedavi seçeneği olup, gametlere herhangi bir manipülasyon yapılmadığı için doğal yola en yakın yöntemdir [115, 116].

2.8.2. İn-Vitro Fertilizasyon/ICSI

IVF’de kadın partnere gonadotropin tedavisi verilerek kontrollü şekilde over hiperstimülasyonu sağlanır. Sonucunda bir siklusa birden çok oosit elde edilir ve bu oositler ultrason eşliğinde iğne aspirasyonu ile toplanır. Yıkama işleminden geçirilmiş semen ile karıştırılarak in-vitro fertilizasyon için 2-3 gün beklenir. İnkübasyon sonucunda iyi kalite embriyolar uterus içine yerleştirilir. Genel olarak, bu yolla embriyo transferi yapılanlarda gebelik oranları %20 ila %30’dur.

IVF’in başarılı sonuçlarına rağmen, fertilizasyonun olmadığı yani doğal olarak embriyo gelişiminin olmadığı olgularda ICSI uygulanabilir. Bu yöntem ilk zamanlarda IVF ile fertilizasyon başarısızlığı olan olgularda kullanılsa da, fertilizasyon başarısının sperm kalitesinden bağımsız olduğunun anlaşılmasıyla kullanım alanı genişlemiştir. Çok az sayıda sperm olan vakalarda faydalı olmakla birlikte, zona pellucida ve vitelin membran seviyesindeki gamet etkileşim aşamasını atlattığı için spermin hem niteliksel hem de niceliksel bozukluklarında başarılı şekilde uygulanabilir.

Aynı şekilde partnerlerden birinin HIV(+) olduğu durumlarda oositin çok sayıda sperme maruz kalmamasını engellemek amacıyla, kemoterapi veya radyoterapi alacak onkoloji hastalarında tedavi öncesi spermin kriyoprezervasyonu yapıldıktan sonra veya pre-implantasyon genetik tanı uygulanacak çiftlerde ICSI rahatlıkla uygulanabilir.

Tüm hasta grupları ele alındığında ICSI ile fertilizasyon başarısı %70-80 arasında olup, gebelik olasılığı %45 dolaylarındadır. Bu sonuçlar, her türlü infertilitede tek çarenin evlat edinme veya donör sperm olmasını durumunu değiştirmiştir [117].

2.9. SPERM ELDE ETME YÖNTEMLERİ

Bu yöntemlerin başlıcaları, perkütan epididimal sperm aspirasyonu (PESA), mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu (MESA), testiküler sperm aspirasyonu (TESA) ve TESE'dir.

2.9.1. PESA

PESA ilk defa Craft ve arkadaşları tarafından ICSI uygulanacak hasta grubu için 1994 yılında tanımlanmıştır [118]. Minimal invaziv, hızlı, kolay olması ve ucuz olması yöntemin avantajları iken, bazı durumlarda yeterli materyal aspire edilememesi dezavantaj olarak görülmektedir [119]. Yeterli aspirasyonun yapılamadığı durumlarda testiküler ya da açık epididimal biyopsi alınabilir. PESA'nin dezavantajlarından birisi de testiküler sperme göre daha az kaliteli sperm elde edilmesidir. Fakat yapılan çalışmalarda epididimal ya da testiküler spermin fertilizasyon ve gebelik oranları açısından bir farkının olmadığı gösterilmiştir [120].

2.9.2. MESA

MESA ilk olarak Temple-Smith tarafından 1986 yılında tanımlanmıştır [121]. MESA için en uygun hasta grubu rekonstrüksiyona uygun olmayan OA saptanan hasta grubudur. Teknik olarak mikroskop altında 16x ila 25x büyütme ile epididimden sperm aspire edilir. Mikrocerrahi olması, komplikasyon düzeylerinin düşük olmasını sağlar. MESA kullanılarak elde edilen spermelerin kullanımıyla, %60'a varan gebelik veya doğum oranları bildirilmiştir [122].

2.9.3. TESA

Belker ve arkadaşları tarafından tanımlanan TESA lokal anestezi altında, spermatogenezin normal olduğu her iki grup azospermi hastalarında uygulanabilen sperm elde yöntemidir [123, 124]. Fakat mTESE uygulamasından sonra sadece OA olan hastalarda tercih edilmektedir. Skrotal ciltten iğnenin testis içine batırılıp aspirasyonu yöntemine dayanır. Genellikle 20G veya 23G iğne ile testisin üst polünün anterior kısmından aspirasyon yapılır. Bu kısım testisin en avasküler olduğu alandır. Bazı girişimlerde sperm dondurma için alınan materyal yetersiz olabilirken, genellikle IVF/ICSI için yeterli sperm elde edilir [123]. TESA ile OA hastalarda %100, NOA olan hastalarda ise %27 oranında sperm elde edilse de NOA olan hastalarda tekrarlayan girişimlerle bu oran artırılabilir [125]. Yeterli sperm elde edilememesi ve hematoma ve damar yaralanma riski nedeniyle çok tercih edilmeyen bir yöntemdir.

2.9.4. TESE

TESE, NOA olan erkeklerde sperm elde etmek için kullanılan en iyi yöntemdir. Amaç, testisin eksplorasyonu ve tunica albugineanın açılarak, sperm elde edilmesi için en elverişli sahanın bulunmasıdır. mTESE yapıldığı takdirde, komplikasyon oranları daha düşük ve sperm elde etme oranları daha yüksektir. Bu yöntemde, öncelikle mikroskop yardımıyla tunica albugineanın kan damarı içermeyen bir alanı bulunup, testisin kanlanması bozulmadan ve elde edilen örneğe kan bulaşmadan materyalin eldesi sağlanır [126].

NOA hastalarında bazı tübüllerin diğerlerine göre daha büyük olduğu, 1999 yılında Schlegel tarafından gösterilmiştir [127]. Bu tübüllerden sperm elde edilme olasılığı daha yüksektir. mTESE'nin konvansiyonel TESE'ye göre uzun öğrenme eğrisi, operasyon süresinin uzun olması ve mikroskop kullanma yeteneği gerektirmesi gibi farklılıkları vardır.

Teknik olarak, genel veya rejyonel anestezi altında, skrotuma bir adet median raphe veya iki adet transvers insizyon yapılarak testisler doğurtulup, tunika vajinalis açılır ve mikroskop yaklaştırılır. Tunika albugineanın anterior yüzeyi üzerinde avasküler bir alan bulmak için, 10 kat büyütme kullanılarak bistüri ile avasküler bir

hattan tunika albuginea insizyonu yapılır. Daha sonra 15x veya 25x büyütme altında testis parankimi incelenerek daha geniş, opak ve beyaz olarak görülen tübüller mikroskop altında küçük parçalar halinde (5-10 mg) alınır. Anatomik olarak proksimal epididimden sperm alınması tercih edilmelidir. Proksimal epididimden alınan spermin daha kaliteli olduğu ve gebelik oranının daha yüksek olduğu bildirilmektedir [128]. Örneklerde sperm bulunamazsa ayrıntılı arama işlemi her iki testiste yapılmalıdır. Mikroskop ile yapılan işlemin diğer bir avantajı da gereksiz testis dokusu alınmazken damarlar korunarak kanamaya bağlı komplikasyonlar önlenmesidir. Başarılı bir mTESE işlemi için en az bir spermatozoa elde edilmelidir [129].

Sonuç olarak mTESE uygulanan erkeklerin %50'sinde sperm bulunmakta ve bunların da %50 sinde IVF/ICSI ile gebelik elde edilmektedir. Spontan abortus oranı %19 civarındadır ve bunun NOA'nın sebep olduğu artmış DNA hasarı ve kromozom bozukluklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu yöntemle, SCO sendromu, postkemoterapi azoospermi ve non-mozaiik KS gibi ağır konjenital veya kazanılmış testiküler yetmezlik durumlarında bile sperm elde edilip, gebelik ve canlı doğum sağlanabilir.

2.10. TESE'DE SPERM ELDE ETME OLASILIĞINI ÖNGÖRMEYİ SAĞLAYAN FAKTÖRLER

NOA hastalarında, uzun süredir TESE öncesinde sperm bulma olasılığını predikte edecek çalışmalar yapılmaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda testis hacmi, serum FSH düzeyi, serum inhibin B düzeyi, hastanın yaşı ile sperm bulma oranları arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır [130, 131]. Yaş, her ne kadar tüm hastalarda prediktif faktör olarak saptanmasa da, KS olanlarda sperm elde etmede prediktif olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Yaşın 32'nin altında olmasının KS'lu erkeklerde sperm bulma olasılığını anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir [132].

FSH düzeyi: FSH düzeyi tüm testiküler doku için bir gösterge olsa da, tek başına TESE başarısını predikte etmekte yeterli değildir. Diğer parametrelerle birlikte değerlendirildiğinde anlamlı olabileceği belirtilse de [133], yapılan

metaanalizlerde FSH düzeyinin sperm elde etmeyi öngörmeye tanı değeri düşük bulunmuştur [134].

Serum İnhibin B Düzeyi: İnhibin B düzeyi de tek başına bir prediktif faktör olmayıp [131], diğer parametrelerle birlikte kullanılması fayda sağlayabilir [135].

Testis histopatolojisi: NOA erkeklerde sperm elde etmede en önemli prediktif faktör testis histolojisi ve histolojik olarak SCO saptanan hastalarda mTESE ile %22,5 oranında sperm bulunurken, konvansiyonel TESE ile %13, HS saptanan hastalarda ise sırasıyla %90 üzerinde ve %76,9 oranında sperm elde edilmiştir [136]. Başka bir çalışmada ise testis patolojisi HS, MA ve SCO saptanan hastalarda mTESE ile sırasıyla %100, %75 ve %33,9 olarak sperm bulma oranları elde edilmişken, konvansiyonel TESE ile MA ve SCO saptanan hastalarda bu oran ciddi oranda düşerek, sırasıyla %37,5 ve %6,3 başarı elde edilmiştir [137].

Testis hacmi: Testis volümünün TESE başarısını öngörme başarısına ait veriler iyi bir belirteç olmadığını düşündürmektedir [138].

Genetik: Özellikle Y mikrolelesyonları olmak üzere bazı genetik patolojilerin varlığı TESE başarısını predikte etmede önemli bir belirteçtir. AZF bölgelerinde meydana gelen delesyonlar fertilitiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Y kromozom mikrolelesyonlarının azoospermik grupta %8-12 oranında görülür iken oligozoospermik erkeklerde %3-7 düzeyinde görülmektedir. AZF gen delesyonu, sperm konsantrasyonu 5 milyon/ml üstünde olan hastalarda oldukça nadir rastlanır. AZFc delesyonu en sık görülen tip iken (%65-70) sonrasında sırasıyla AZFb ve AZFb+c ya da AZFa+b+c delesyonları görülmektedir. AZFa delesyonu ise oldukça nadirdir (%5). Genel olarak AZFa delesyonu, SCO sendromu ile AZFb delesyonu MA ile AZFc delesyonu ise HS ile ilişkilendirilebilir.

Klinefelter Sendromu: KS olan erkeklerde, NOA olan diğer erkeklerle kıyasla daha yüksek sperm elde oranları mevcuttur. Bu sebeple, KS, tek başına iyi prognostik bir faktör olarak tanımlanabilir [138, 139].

Yaş: İleri baba yaşı, gebelik oranlarında azalma ile ilişkili olduğu düşünülse de, TESE sırasında sperm bulma için prediktif bir rolünün olmadığı düşünülmektedir [140]. Fakat KS olanlarda sperm elde etmede prediktif olduğuna dair çalışmalar

mevcuttur. Yaşın 32'nin altında olmasının KS'lu erkeklerde sperm bulma olasılığını anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir [132].

Varikozel: NOA ile birlikte klinik varikozeli olan ve TESE öncesi varikoselektomi yapılan hastalarda, diğer NOA hastalarına oranla daha yüksek sperm elde etme oranları olması, varikozel onarımının bu hastalarda pozitif bir prognostik faktör olduğunu düşündürmektedir [141].

Biyopsi çalışmaları: Hastalardan TESE işlemi sırasında veya işlem öncesinde ince iğne aspirasyon biyopsisi ile alınan örneklerde, spermatogeneze spesifik gen ürünlerinin aranmasına yönelik çalışmalardır. Örneğin, DDX3Yt1/DDX3Y'ün bozulmuş spermatogeneze down-regüle olduğu, VASA mRNA ekspresyonunun pozitif olmasının da pozitif prognostik faktör olduğu bilinmektedir [142]. CDY1 ve BOULE ekspresyonunun kalitatif RT-PCR ile incelenmesinin, testis dokusunda sperm hücreleri varlığının predikte edilmesinde duyarlı bir test olduğu da gösterilmiştir [143].

Semen çalışmaları: Biyopside spermatogeneze spesifik gen ürünlerinin saptanmasındansa, TESE'de sperm saptanmasını predikte edecek genomik, proteomik veya metabolomik markerların genomik, proteomik, metabolomik yöntemlerle aranması çok daha az invaziv bir yöntemdir. Bununla ilgili yapılan çalışmaların birinde NOA hastalarında ejakülatta DAZ, AKAP4, PRM1 ve PRM2 gen ürünlerinin varlığı RT-PCR ile araştırılmış ve DAZ ve PRM2'nin prediktif bir faktör olduğu saptanmış [144]. Başka bir çalışmada ise ECM1 ve TEX101 proteomiklerinin OA ve NOA'yı birbirinden ayırdığı ve hatta NOA alt tipleri hakkında prediktif etkisi olduğu gösterilmiştir [145].

LİM-15/DMC1 geni: DNA tamir sisteminde kodladığı proteinlerle tamir mekanizmalarında görev alan 100'den fazla gen vardır [146]. DNA tamir mekanizmasında görevli olan proteinlerden biri olan RecA proteini rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile hasarsız komplementer zincirde bulunan sekansı transfer eder. Ökaryotlarda iki tip Rec A gibi rekombinaz yapan protein mevcuttur. Bunlar Lim15 ve Rad51 proteinleridir. Rad51 hem mayotik hem de somatik hücrelerde eksprese olurken Lim15 ise sadece mayoz aşamasında rekombinasyona dayalı DNA sentezinde görev alan bir proteindir. Ökaryotlarda yapılan çalışmalar Lim15

proteinin sadece mayoz bölünmeye spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiş ve RAD51 proteini ile beraber çalıştığı gösterilmiştir. Bu iki proteinin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir [13, 147, 148].



3. MATERYAL VE METOT

3.1. HASTA SEÇİMİ VE SPERMYOGRAM

Çalışmaya Şubat 2018-Temmuz 2019 tarihleri arasında tarafımıza başvuran, NOA saptanan ve fertilité için mTESE ameliyat endikasyonu konulan 143 hasta prospektif olarak dahil edilmiştir. Çalışma öncesi tüm hastalara ayrıntılı açıklama yapılarak onamları alınmıştır.

Çalışmaya 172 hasta ile başlansa da, ejakülat hacmi 1,5 ml'nin altında olan, bilateral vaz agenezis tanısı olan veya TESE biyopsisi normal spermatogenez gelen 23 hasta, etiyolojik olarak OA'yı düşündürdüğü için dışlanmıştır. 5 ay önce akut koroner sendrom öyküsü ile perkütan koroner girişim uygulanan 1 hasta, kullandığı asetilsalisilik asit ve klopidoğrelín kesilememesi ve artmış anestezi riski nedeniyle opere edilemediği için çalışmaya dahil edilememiştir. Genetik değerlendirmede AZFa, AZFb ve AZFc delesyonu saptanan 2 hasta ve fizik muayenede kriptorşidizm tanısı alan 3 hasta çalışmaya dâhil edilmezken, daha önce kriptorşidizm tanısı alıp bu nedenle geçmişte cerrahi geçiren ve mevcut durumda testis veya testisleri skrotumda palpe edilebilen 19 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Hastalardan ayrıntılı bir anamnez alındıktan sonra fizik muayeneleri yapılmış, 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası sperm tahlili istenmiştir. 3000 g ile en az 15 dakika santrifüj edilen semende, spermyogram sonucu azoospermi gelen hastaların, ilk spermyogram ölçümünden en az bir hafta sonra ikinci sperm tahlilleri değerlendirilerek azoospermi tanıları konfirme edilmiştir. Spermyogram sonuçları DSÖ 2010 yılı rehberi esas alınarak değerlendirilmiştir.

Azoospermi tanısı alan hastaların testis volümleri, serum FSH ve total testosteron değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Testis volümü, testisin ultrasonografik görüntülerle elde edilen boy ve genişlik ölçüm değerlerinin birbiri ile çarpıktan sonra çıkan değerin de 0.71 ile çarpılması ile bulunmuştur[149]. Serum FSH ve serum total testosteron değerleri kemilüminesan immunoassay yöntemi kullanılarak Beckman Coulter cihazında (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ölçülmüştür.

3.2. TESE UYGULAMASI

Hastalara rutin mTESE işlemi yapılırken hiçbir hastaya konvansiyonel TESE uygulanmamıştır. İntraoperatif alınan 3 TESE materyalinden birinde olgun sperm hücresi araştırılırken, diğerinden Lim 15 ve PCNA gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüş, diğer materyal ise testis biyopsisi için patolojik incelemeye gönderilmiştir. Gen ekspresyon düzeylerini ölçmek için alınan numune, 2 saat içerisinde uygun koşullarda Mikrogen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'nin laboratuvarına teslim edilmiştir.

mTESE işlemi sırasında hastaların ek hastalıkları, anestezi riskleri ve tercihi esas alınarak 89 hastaya (%62.2) genel anestezi, 54 hastaya (%37.8) ise rejyonel anestezi uygulanmıştır.

mTESE işlemi daha önce kliniğimizde yaptığımız bir çalışmada tarif edildiği gibi yapılmıştır[150]. İşleme bir adet median raphe veya iki adet transvers insizyon yapılarak başlanmış, testisler doğurtulduktan sonra tunika vaginalis açılarak operasyon sahasına mikroskop yaklaştırılmıştır. 8'lik büyütme kullanılarak tunica albugenia avasküler bir hattan açılarak, daha yüksek büyütmede (x20) daha dolgun, opak ve büküntülü görülen tübüllerden incelenmek üzere örnekleme yapılmıştır. İşleme daha büyük olan testisten başlanılmış, olgun sperm çıkmaması durumunda diğer tarafa geçilmiştir. İstenilen özellikte tübül görülememesi durumunda randomize biyopsi örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler uzman bir embriyolog tarafından incelenmiş, işlem olgun spermatozoa bulunana kadar devam etmiştir. 2 saat sonunda spermatozoa bulunamaması halinde işlem son verilmiş, kanama kontrolü sağlanıp, katlar anatomik planda kapatılmıştır.

İşlem sırasında en az 1 adet olgun spermatozoa bulunması işlemin başarısı olarak kabul edilmiştir.

İşlem sırasında alınan parçalardan testis patolojisi araştırılmak üzere alınan materyal bovin solüsyonuna, sperm araştırılmak üzere alınan materyal ringer laktat solüsyonuna ve genetik inceleme yapılmak üzere alınan materyal ise sperm yıkama solüsyonu (sperm washing) (G-IVF, Vitrolife, Gothenburg, Sweden))' na konularak transferleri sağlanmıştır.

3.3. SEMENDE VE TESE DOKUSUNDAN PCNA VE LİM-15 GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

3.3.1. RNA İzolasyonu

Alınan dokular -80 °C bekletilip, işlem sırası geldiğinde RNA izolasyonu yapıldı. Yöntem dokuların lizis solüsyonu ile parçalanıp daha sonra fenol yardımıyla RNA'nın ekstrakte edilmesine dayanır. RNA izolasyonu aşamaları aşağıda gösterildiği gibi uygulanmıştır.

- 1- Yaklaşık 50 mg donmuş doku sıvı azot ile soğutulmuş havanda iyice dövüldü. Üzerine 600 µl Lysis Buffer (içinde 1:100 2-mercaptoethanol olmalı) eklenip homojenize edildi. (Lysis bufferda homojenize edilmiş dokular dondurulabilir.)
- 2- Lysis bufferda olan örneğe 300 µl (%95-100) etanol eklenerek karıştırıldı.
- 3- Karışım kolona aktarıldı ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. 400 µl RNA Wash Buffer kolona eklendi ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpteki sıvı boşaltıldı.
- 4- Hazırlanmış 80 µl Dnase karışımı (5 µl DNase 1, 8 µl 10x Buffer, 3 µl Dnasefree su, 64 µl RNA Wash Buffer) kolonun tam ortasına eklendikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkube edildi. 13000 rpm'de 1 dakika çevrildi. Tüpteki sıvı boşaltıldı.
- 5- Kolona sırasıyla 400 µl RNA PrepBuffer, 700 µl RNA Wash Buffer, 400 µl RNA Wash Buffer eklendi, eklemelerden sonra sırasıyla 1 dakika, 1 dakika ve 2 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi ve tüplerdeki sıvılar boşaltıldı.
- 6- Kolon yeni bir 1.5 ml tüpe aktarıldı ve kolonun tam ortasına 30 µl Dnase/ Rnase free su eklendi. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, RNA -20 °C de saklandı. Komplementer DNA (cDNA) sentezi öncesinde Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA) ile RNA miktarı ölçüldü. cDNA sentezinde yaklaşık olarak 500 ng RNA kullanıldı.

3.3.2. cDNA Sentezi

cDNA, mRNA'dan sentezlenen DNA kopyasıdır. mRNA'lar tek iplikli yapıya sahip olduklarından dolayı RNaz enzimlerince çok çabuk parçalanırlar. Bu da laboratuvar ortamında bu moleküllerle çalışmayı zorlaştırır. Bu yüzden RNA'larının PCR yardımıyla çoğaltılması için cDNA'ya çevrilmesi gerekti. Bu reaksiyonda RNA bağımlı DNA polimeraz (bir RNA kalıbı olmadan sentezlemeye başlayamayan) olan 'ters transkriptaz enzimi' kullanıldı. Kalıp RNA tek iplikli mRNA dizisine bağlanarak, polimeraz enziminin sentezlemeye başlaması için gerekli olan çift iplikli diziyi oluşturdu. RT-PCR yönteminde kalıp olarak kullanılan RNA, ters transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrildi. Reaksiyon içeriğinde DEPC-treatedwater, oligodt, dNTP 10mm, 5x RT Buffer, RibosafeRNaseInhibitor, TetroReverseTranscriptase (200u/μl) ve RNA bileşenleri mevcuttu.

3.3.3. Real-Time PCR

RT-PCR teknolojisi DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve çoğaltım ürünlerinin miktarının tek bir tüpte tespit edilebilmesini sağlayan bir yöntemdir. RT-PCR'da kullanılan bileşenler ise 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix, 10 μm Forward Primer, cDNA ve H₂O idi. Reaksiyon sonucunda her bir gen (LİM 15 ve PCNA) için 3x mix hazırlandı. Uygulanan testte kontrol olarak bir house-keeping gen olan aktin beta (ACTB) geni kullanılmıştır. Bu yolla hem testin güvenilirliği tespit edilmiş hem de PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin seviyesi bu kontrol genle kıyaslanarak belirlenmiştir.

3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Tanımlayıcı istatistik olarak sürekli verilerde ortalama, standart sapma, ortanca ve min-max değerleri verilmiştir. Kesikli veriler yüzde değerleri ile tanımlanmıştır. Çalışmadan elde edilen verilerin normal dağılım gösterme durumu Kolmogorov-Simirnov testi ile yapılmıştır. TESE+ ve TESE- hastaların gen ekspresyon miktarları, total testosteron ve FSH miktarları karşılaştırılırken Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. TESE sonuçlarının yaş ile arasındaki ilişkiyi

araştırmak için T-test uygulanırken, testis volümü ile arasındaki ilişkiyi karşılaştırmak için Ki-Kare testi uygulanmıştır. Gen ekspresyon miktarları ile testis patolojileri arasındaki ilişkiyi saptamak adına ise Kruskal-Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır.



4. BULGULAR

Çalışmaya 22-45 yaş aralığında dâhil edilen 143 hastanın ortalama yaşı 34,3 ($\pm 4,2$) iken, ortanca yaş ise 34 olarak saptanmıştır.

Hastaların 73'ünde TESE'de sperm saptanırken (%51), kalan 70'inde (%49) sperm gözlenmemiştir. TESE'de en az 1 tane olgun kuyruklu spermatozoa saptanan olgular TESE (+), spermatozoa görülmeyen olgular TESE (-) olarak kabul edilmiştir.

Tablo 2: Hastaların testis volümlerine göre sınıflandırılması

TESE	Testis Volümü			Total
	≤ 5 ml	6-15 ml	>15 ml	
TESE (-)	16 (22,9)	15 (21,4)	39 (55,7)	70 (100)
TESE (+)	5 (6,8)	11 (15,1)	57 (78,1)	73 (100)
Total	21 (14,7)	26 (18,2)	96 (67,1)	143 (100)

Hastaların ultrasonografik olarak ölçülen sağ ve sol testis volüm ortalamaları sırasıyla 15,45 ($\pm 6,5$) ml ve 15,55 ($\pm 6,2$) ml idi. Hastaların 21'inin (%14,7) testis volümü 5 ml veya daha az iken, 26'sının (%18,2) testis volümü 6-15 ml arasında, 96'sının (%67,1) ise 15 ml'nin üzerinde bulunmuştur. Testis volümü 15 ml'nin üzerinde olan hasta grubunda 96 hastanın 57'sinde (%59,3) TESE sırasında olgun sperm hücresi bulunurken, testis volümü 6-15 ml olan 26 hastanın 11'inde (%42,3) ve 5 ml ve daha az olan 21 hastanın 5'inde (%23,8) TESE sırasında olgun sperm hücresi bulunmuştur (Tablo 2). Üç grup, sperm bulma açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında testis volümü 15 ml'den yüksek olan grupta istatistiksel olarak daha fazla sperm bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır ($p=0,008$). Aynı şekilde testis volümü 6-15 ml olan hastalarda sperm bulma şansının, testis volümü 5 ml'den küçük olgularinkinden istatistiksel olarak daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3: Testis volümleri ile TESE’de sperm elde etme ilişkisi

Testis Volümleri	p değeri
≤ 5 ml vs. 6-15 ml	$p<0,05$
≤ 5 ml vs. >15 ml	$p<0,05$
6-15 ml vs. >15 ml	$p<0,05$

TESE (-) ve TESE (+) hastaların yaşları kıyaslandığında, TESE (-) grupta yaş ortalamasının 34,27 ($\pm 4,23$) ve TESE (+) grupta ise 34,29 ($\pm 4,24$) olduğu (Tablo 4), yaş açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ($p=0,982$) (Tablo 5).

Tablo 4: Hastaların yaş, total testosteron ve FSH değerleri

	Ortalama	Ortanca	(min-max)
Yaş	34,28 $\pm 4,22$	34	22-45
Tot. Test. (ng/dl)	431,02 $\pm 161,2$	410	116-821
FSH (mIU/ml)	6,19 $\pm 5,8$	3,90	1,1-28

Hastaların total testosteron değerinin 116-821 ng/dl arasında değiştiği ve ortalama total testosteron değerinin 431,02 ($\pm 161,2$) ng/dl olduğu görülmüştür. Ortalama total testosteron değeri, TESE (-) olgularda 411,81 ($\pm 162,5$) ng/dl iken TESE (+) olgularda 449,44 ($\pm 158,84$) ng/dl olarak ölçülmüştür (Tablo 4). Bu sonuçlara göre serum total testosteron düzeylerinin, TESE’de sperm elde etme oranları üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır ($p=0,120$) (Tablo 5).

Hastaların FSH düzeylerinin 1,1-28 arasında değiştiği ve ortalama FSH değerinin 6,19 ($\pm 5,8$) mIU/ml olduğu görülmüştür. Ortalama FSH değeri, TESE (-) olgularda 6,15 ($\pm 6,5$) mIU/ml iken TESE (+) olgularda 6,23 ($\pm 5,17$) mIU/ml olarak ölçülmüştür (Tablo 4). Bu sonuçlara göre serum FSH düzeylerinin, TESE’de sperm

elde etme oranları üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır (p=0,362) (Tablo 5).

Tablo 5: Yaş, total testosteron ve FSH değerleri ile TESE’de sperm elde etme ilişkisi

	TESE (-)	TESE (+)	p değeri
	Ortalama	Ortalama	
	Ortanca (min-max)	Ortanca (min-max)	
Yaş	34,27 ±4,23 34 (22-45)	34,29 ±4,24 34 (27-45)	p=0,982
Tot. Test. (ng/dl)	411,81 ±162,53 397 (116-726)	449,44 ±158,84 425 (142-821)	p=0,120
FSH (mIU/ml)	6,15 ±6,5 3,7 (1,1-28)	6,23 ±5,17 4 (2-25)	p=0,362

Tablo 6: Non-obstrüktif azospermi hastalarına eşlik eden klinik patolojiler

Etiyoloji	Hastalar, n (%) (N=143)
Varikozel	33 (23,1)
Kriptorşidizm	19 (13,3)
Endokrin/Genetik	14 (9,8)
RT/KT	5 (3,5)
Diğer (orşit,sist. Hastalık)	8 (5,6)
İdiopatik	64 (44,8)

Hastalar eşlik eden klinik patolojileri bakımından incelendiğinde, 33 (%23,1) hastanın varikoselektomi, 19 (%13,3) hastanın ise orşiopeksi operasyonu geçirdiği öğrenilmiştir. 14 (%9,8) hastada endokrin/genetik bir patoloji saptanırken, herhangi bir kanser tedavisine bağlı RT/KT alan hasta sayısı 5 (%3,5) idi. Orşit veya sistemik hastalıklara bağlı infertilite düşünülen hasta sayısı 8 (%5,6) olarak hesaplanmıştır.

Hastaların 64'ünde (%44.8) ise infertiliteyi açıklayacak herhangi bir sebep bulunamayarak, hastalar idiyopatik hasta grubunda sınıflandırılmıştır (Tablo 6). 33 varikoselektomili hastanın 20'si (%60,6) TESE (+) iken, orşiopeksi yapılmış 19 hastanın 12'si (%63,2) TESE (+) idi. TESE sırasında olgun sperm bulunan hasta sayısı endokrin/genetik bozukluğu mevcut hastalarda 6 (%42,9) iken, RT/KT almış hasta grubunda 2 (%40), orşit veya sistemik hastalık öyküsü bulunan grupta ise 6 (%75) idi. İnfertiliteyi açıklayacak bir sebep bulunamayan 64 hastanın 27'sinde de (%42,2) aynı şekilde TESE sırasında olgun spermatozoa bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7: Eşlik eden klinik patolojilere göre TESE'de sperm elde etme başarısı

Etiyoloji	TESE (-) n (%)	TESE (+) n (%)
Varikosel	13 (39,4)	20 (60,6)
Kriptorşidizm	7 (36,8)	12 (63,2)
Endokrin/Genetik	8 (57,1)	6 (42,9)
RT/KT	3 (60)	2 (40)
Diğer (orşit,sist. Hastalık)	2 (25)	6 (75)
İdiyopatik	37 (57,8)	27 (42,2)

Tablo 8: TESE dokusunda ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri

	Ortalama	Ortanca	(min-max)
TESE PCNA	76,18 ±53,47	75,78	5,4-357
TESE LİM-15	39,79 ±41,80	25,60	0-237

Hastaların TESE dokusundan alınan örneklerde ölçülen ortalama PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon miktarları sırasıyla 76,18 (±53,47) ve 39,79 (±41,80) idi. En düşük PCNA değeri 5,4 iken, en yüksek PCNA değeri 357 olarak ölçülmüştür. LİM-15 geninin en düşük ve en yüksek ekspresyon miktarları ise sırasıyla 0 ve 237 olarak saptanmıştır (Tablo 8).

Tablo 9: TESE dokusunda ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin TESE’de sperm elde etme başarısı ile ilişkisi

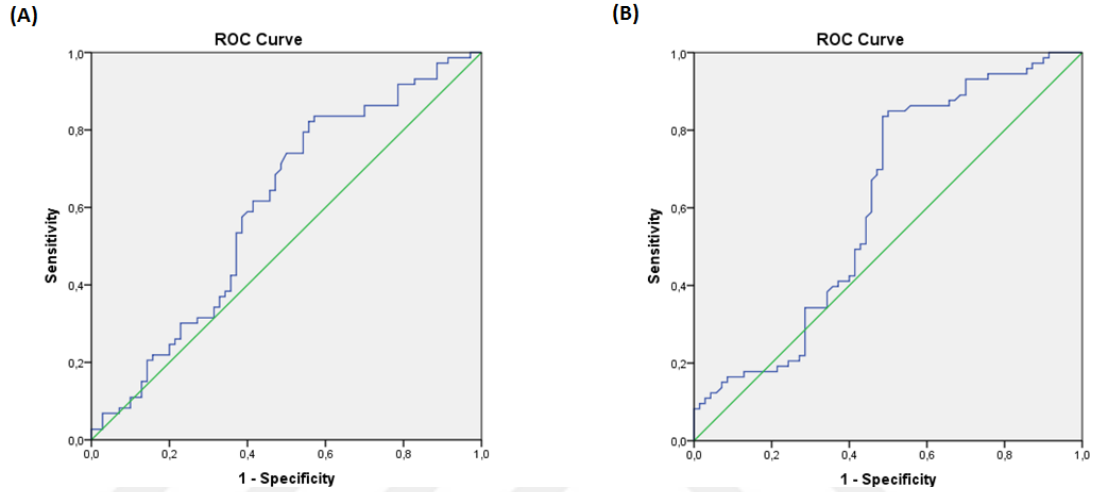
	TESE (-)	TESE (+)	p değeri
	Ortalama	Ortalama	
	Ortanca (min-max)	Ortanca (min-max)	
TESE PCNA	67,96 ±50,62	84,08 ±55,27	p=0,038
	64,72 (5,4-239)	78 (7,6-357)	
TESE LİM-15	33,93 ±33,13	45,41 ±48,27	p=0,022
	18,84 (0-122)	27,00 (1,88-237)	

TESE (-) ve TESE (+) hastaların TESE dokusundaki PCNA gen ekspresyon miktarları kıyaslandığında; TESE (-) grupta PCNA gen ekspresyon miktarı ortalamasının 67,96 (±50,62) ve TESE (+) grupta ise 84,08 (±55,27) olduğu ve PCNA gen ekspresyon miktarı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır (p=0,038) (Tablo 9). Aynı şekilde iki grup arasında LİM-15 gen ekspresyon miktarlarına bakıldığında; TESE (-) grupta LİM-15 gen ekspresyon miktarı ortalamasının 33,93 (±33,13) ve TESE (+) grupta ise 45,41 (±48,27) olduğu ve LİM-15 gen ekspresyon miktarı açısından da iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır (p=0,022) (Tablo 9).

Tablo 10: Düzeyi ölçülen genlerin sensitivite, spesifite, cutoff ve eğri altında kalan alan (AUC) değerleri

Gen	Cutoff	Sensitivite	Spesifite	AUC
TESE PCNA	45,65	0,83	0,43	0,60
TESE LİM-15	18,82	0,85	0,50	0,61
SEMEN LİM-15	5,37	0,59	0,73	0,64

TESE dokusunda ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri baz alınarak çıkarılan ROC eğrisine (Şekil 1) göre; PCNA geni için maksimum sensitivite (%83) ve spesifitede (%43) cutoff değeri 45,65, AUC değeri ise 0,60 olarak hesaplanırken, LİM-15 geni için maksimum sensitivite (%85) ve spesifitede (%50) cutoff değeri 18,82, AUC değeri 0,61 hesaplandı (Tablo 10).



Şekil 1: TESE dokusunda ölçülen PCNA ve LİM-15 genlerinin ROC eğrisi analizi. (A) PCNA, (B) LİM-15

Hastaların semen dokusundan alınan örneklerde ölçülen ortalama PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon miktarları sırasıyla 25,13 ($\pm 44,47$) ve 5,87 ($\pm 6,41$) idi. En düşük PCNA değeri 0 iken, en yüksek PCNA değeri 423 olarak ölçülmüştür. LİM-15 geninin en düşük ve en yüksek ekspresyon miktarları ise sırasıyla 0 ve 50,7 olarak saptanmıştır (Tablo 11).

Tablo 11: Semende ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri

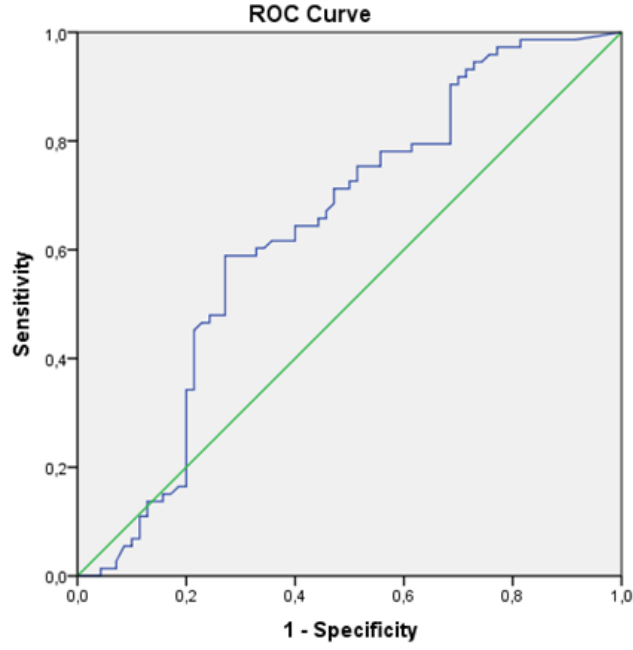
	Ortalama	Ortanca	(min-max)
Semen PCNA	25,13 $\pm 44,47$	13	0-423
Semen LİM-15	5,87 $\pm 6,41$	4,70	0-50,7

TESE (-) ve TESE (+) hastaların semendeki PCNA gen ekspresyon miktarları kıyaslandığında; TESE (-) grupta semen PCNA gen ekspresyon miktarı ortalamasının 24,62 ($\pm 51,90$) ve TESE (+) grupta ise 25,61 ($\pm 36,32$) olduğu ve PCNA gen ekspresyon miktarı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ($p=0,061$). Aynı şekilde iki grup arasında LİM-15 gen ekspresyon miktarlarına bakıldığında; TESE (-) grupta LİM-15 gen ekspresyon miktarı ortalamasının 5,62 ($\pm 8,07$) ve TESE (+) grupta ise 6,10 ($\pm 4,31$) olduğu ve LİM-15 gen ekspresyon miktarı açısından da iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır ($p=0,004$).

Tablo 12: Semende ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin TESE’de sperm elde etme başarısı ile ilişkisi

	TESE (-)	TESE (+)	p değeri
	Ortalama	Ortalama	
	Ortanca (min-max)	Ortanca (min-max)	
Semen PCNA	24,62 $\pm$ 51,90 11,09 (0-423)	25,61 $\pm$ 36,32 13,40 (0,98-284)	$p=0,061$
Semen LİM-15	5,62 $\pm$ 8,07 3,45 (0-50,70)	6,10 $\pm$ 4,31 5,78 (0-26,97)	$p=0,004$

Semende ölçülen LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri baz alınarak çıkarılan ROC eğrisine (Şekil 2) göre; LİM-15 geni için maksimum sensitivite (%59) ve spesifitede (%73) cutoff değeri 5,37 ve AUC değeri ise 0,64 olarak hesaplanmıştır (Tablo 10). Semende ölçülen PCNA gen ekspresyon düzeyi iki grup arasında farklılık göstermediği için bu grupta ROC eğrisi çizilmemiştir.



Şekil 2: Semende ölçülen LİM-15 geninin ROC eğrisi analizi

Hastaların testis patolojilerine bakıldığında; testis patolojisi SCO gelen hasta sayısı 72 iken, patolojisi MA olan hasta sayısı 45 ve HS olan hasta sayısı ise 26 olarak hesaplanmıştır (Tablo 13).

Tablo 13: Non-obstrüktif azospermi hastalarının testis patolojileri

Histopatoloji	Hastalar, n (%) (N=143)
Sertoly Cell Only	72 (50,3)
Matürasyon Arresti	45 (31,5)
Hipospermatogenezis	26 (18,2)

Yapılan TESE işleminde testis patolojisi SCO olan hastaların 17'sinde (%23,6) sperm saptanırken, patolojisi MA olan hastaların 31'inde (%68,9) ve patolojisi HS olan hastaların ise 25'inde (%96,2) sperm saptanmıştır (Tablo14).

Tablo 14: Testis patolojilerine göre TESE’de sperm elde etme başarısı

Histopatoloji	TESE (-) n (%)	TESE (+) n (%)
Sertoly Cell Only	55 (76,4)	17 (23,6)
Matürasyon Arresti	14 (31,1)	31 (68,9)
Hipospermatogenezis	1 (3,8)	25 (96,2)

3 grup kendi arasında sperm elde etme başarısı açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında; patolojisi MA ve HS gelen hasta gruplarında, patolojisi SCO gelen hasta grubuna göre sperm elde etme şansının istatistiksel olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 15). Aynı şekilde patolojisi HS olan grupta sperm elde etme yüzdesi, MA olan gruptakinden daha yüksek çıkmış, bu farkın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 15).

Tablo 15: Testis patolojilerinin TESE’de sperm elde etme başarısı ile ilişkisi

Testis Patolojileri	p değeri
Sertoly cell only vs. Matürasyon arresti	$p<0,05$
Sertoly cell only vs. Hipospermatogenezis	$p<0,05$
Matürasyon arresti vs. Hipospermatogenezis	$p<0,05$

Gen ekspresyon düzeyleri tüm testis patolojilerinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Tablo 16: Testis patolojileri ile TESE dokusu ve semende bakılan PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki

	p değeri
TESE PCNA	p=0,358
TESE LİM-15	p=0,337
SEMEN PCNA	p=0,424
SEMEN LİM-15	p<0,05

Gruplar arasındaki TESE PCNA ve TESE LİM-15 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0,358 ve p=0,337) (Tablo 16).

Gruplar arasındaki SEMEN PCNA değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,424) (Tablo 16). Testis patolojilerine göre SEMEN LİM-15 gen ekspresyon değerlerine bakıldığında; 3 grup arasında SEMEN LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p<0,05).

5. TARTIŞMA

Normal popülasyonda %1 oranında görülen azospermi, kliniğe infertilite şikayeti ile başvuran erkeklerin yaklaşık %10-15'inde görülmektedir. Azospermi tanısı konulan hastaların %60'ında NOA saptanırken geriye kalan %40'ında ise OA görülmektedir [124]. NOA tanısı ile gelen hastalarda en etkili tedavi yöntemi mTESE ile sperm elde edilmesi ve elde edilen spermelerin ICSI veya IVF gibi yardımcı üreme tekniklerinde kullanılmasıdır. NOA hastalarına uygulanan mTESE işleminde %45-63 arasında sperm elde etme oranları bildirilmiştir [151]. Yaptığımız bu çalışmada ise sperm elde etme oranımız %51 olarak bulunmuştur.

TESE'nin tekrarlanması planlandığında germinal epitelin yenilenmesi, tübülüslerin şekillenmesi ve sperm elde etme başarısının artırılması için 6 ay kadar beklenmelidir [152]. Başarısız konvansiyonel TESE sonrasında yapılan mTESE'de sperm bulma olasılığı %25-44 arasında iken, başarısız mTESE sonrası yapılan mTESE'de bu oran %10'lara kadar düşmektedir. mTESE ve sperm bulunması halinde sonrasında uygulanacak olan yardımcı üreme teknikleri infertil çiftler için invaziv bir yöntem olmakla birlikte maliyetli de bir prosedürdür. Konvansiyonel TESE veya mTESE işlemi uygulanan fakat işlem sonucunda sperm bulunamayan hastalar, kendi biyolojik çocuklarına sahip olma umuduyla ikinci bir mTESE işlemini tercih edebilirler. Hastaların yaklaşık %40-50'sini ilgilendiren bu durumda, yapılacak ikinci mTESE işleminin başarısının tahmin edilebilmesi, hastalara daha iyi bir danışmanlık hizmeti verilmesi ve gereksiz maliyetten kaçınılması için gereklidir. 68 NOA'lı hasta ile yapılan bir çalışmada, mTESE'de sperm bulunamayan hastalara 4 kez daha mTESE işlemi uygulanmış ve olgun spermatozoa bulunmuştur. mTESE'nin NOA'lı hastalarda tekrar tekrar uygulanabilir bir seçenek olduğu gösterilmiş, yüksek sperm elde etme oranlarının olduğu bildirilmiştir [150]. Geçmişte TESE işlemi sırasında sperm bulmayı predikte edecek pek çok faktör üzerinde çalışılmış olursa da, bu konuda tartışmalar halen sürmektedir.

Yaşın TESE'de sperm elde etmeyi öngörebilecek bir faktör olmadığı gösterilmiştir [140]. Fakat yapılan bazı çalışmalar KS olan hastalarda, hasta yaşının sperm elde etmede prediktif olduğunu göstermiştir. Yaşı 32'nin altında olan KS'lu

hastalarda sperm bulma oranının anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir [153]. Çalışmamızda da, literatüre paralel şekilde, yaşın sperm elde etmeyi predikte edebilecek bir faktör olmadığı görülmektedir.

FSH düzeyi seminifer tübüllerdeki spermatogonyum miktarını yansıtsa da, NOA hastalarında FSH ile spermatogenez arasında ilişki çok açık değildir. Yapılan bir çalışmada FSH>15 IU/ml olan hastalarda, FSH<15 IU/ml olanlara göre daha yüksek sperm bulma oranları gösterilse de [154], FSH üzerine yapılmış derleme ve meta-analizlerde FSH'nın sperm elde etmeyi öngörmeye tanı değeri düşük bulunmuştur [155]. Yakın zamanlı yapılan bir çalışmada da FSH düzeyi ile sperm elde etme arasında bir ilişki gösterilememiştir [156]. Kalsi J. ve arkadaşlarının 2012'de yayınladıkları ve 100 NOA hastasıyla yaptıkları çalışmada FSH seviyesi ile sperm bulma arasında bir korelasyon bulunmadığı bildirilmektedir [157]. Çalışmamızda ortalama FSH değeri TESE'de sperm bulunan hastalarda bulunmayanlara göre hafif derecede yüksek bulunsada, derleme ve meta-analizlere benzer şekilde FSH düzeyi ile TESE'de sperm elde etme başarısı arasında herhangi bir ilişki saptanamadı

FSH düzeyi ile sperm elde başarısı arasında herhangi bir ilişki bulunamasa da, NOA'lı erkeklerde TESE öncesi uygulanan bazı tedavilerle sperm bulma şansının arttırılabileceği gösterilmiştir. FSH düzeyi normal olan NOA'lı hastalara TESE öncesi FSH tedavisi uygulanması TESE başarısını arttırabilmektedir [158].

Yapılan çalışmalarda FSH düzeyi gibi, total testosteron seviyesi ile de sperm elde etme arasında bir ilişki bulunmadığı görülmektedir. 177 NOA'lı hastanın incelendiği bir çalışmada serum FSH, LH ve total testosteron değerlerinin sperm elde etmeyi predikte edebilen faktörler olmadığı bildirilmiştir [159]. Çalışmamıza benzer şekilde 145 hasta ile yapılan başka bir çalışmada, sperm elde edilen grupta total testosteron seviyesi sperm elde edilemeyen gruba göre daha yüksek bulunsada fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır[156]. Bizim sonuçlarımıza göre de; total testosteron seviyesi sperm elde edilen grupta daha yüksek olsa da, sperm bulunan ve bulunmayan iki grup arasında total testosteron miktarları açısından istatistiksel bir fark bulunmamaktadır.

Testis boyutu ile TESE’de sperm bulma olasılığı arasında ilişki olup olmadığını inceleyen çalışmalarda daha çok kabul gören sonuç, testis boyutu ile TESE sonucu arasında herhangi bir ilişki olmadığıdır. Yapılan bir çalışmada normal volümlü testislerin %44’ünde, küçük volümlü testislerin de %25’inde spermatozoa bulunmuş ve testis volümleri 5 ml’den az olan olgularda bile spermatozoa bulunabileceği gösterilmiştir. 178 hastanın dahil edildiği 2001 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise; testis volümü 5ml ve daha düşük olan hastalarda sperm elde etme oranı %6,4, 6-15 ml arasında olan hastalarda %40,4 ve 16 ml ve daha üstü olan hastalarda ise %53.2 olarak bulunmuştur [160]. 2012’de yayınlanan ve 276 NOA hastanın ele alındığı bir başka çalışmada ise testis uzunluğu ile TESE’de sperm bulma arasında ciddi bir korelasyon saptanmış [161]. Biz de çalışmamızda testis volümleri ile TESE’de sperm elde etme başarısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptadık.

NOA olan erkeklerde varikozel saptama oranı %5-10 olarak bilinmektedir. Değişik serilerde, varikosektomi sonrasında bu hastalarda semende spermatozoa saptanma olasılığının %21 ila 55 arasında değiştiği bildirilmiştir [141]. Özellikle testis histolojisi HS ve geç MA olan hastalarda sperm bulma olasılığı daha yüksek iken, patolojisi erken MA ve SCO olan hastalarda bu olasılık daha düşüktür [10]. Ejakülatta sperm saptanmasının önemi hastaların gereksiz TESE işleminden kurtulmuş olmasıdır. Yine bu hastalarda varikosektominin, sonrasında yapılacak olan TESE’de sperm elde etme başarısını arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [162]. Dört retrospektif çalışmanın derlendiği bir meta-analizde varikoselli erkeklerde varikozel tedavisi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, varikosektominin gebelik oranını 1.59 kat ve canlı doğum oranını 2.17 kat arttırdığı bildirilmiştir [89]. Literatürde erkek partnerin klinik varikoseli olduğu durumlarda, ICSI öncesi varikosektomi yapılmasının hem ICSI’da gebelik başarısını arttırdığını hem de canlı doğum oranlarını iyileştirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [163]. Bizim çalışmamızda da, geçmişte varikosektomi öyküsü olan NOA’lı hastaların %60’ında TESE’de sperm saptanmış, tüm NOA hastalarındaki sperm bulma başarısından daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmalar erişkinde olduğu gibi çocuk ve adölesanlarda da subinguinal mikrovarikosektominin güvenli, etkili ve minimal invaziv bir tedavi olduğunu göstermiştir [164]. Kriptorşidizm ile ilişkili

subfertiliteye dair öne sürülen mekanizmalar, testiküler disgenezi, bozulmuş endokrin aks, immünolojik hasar ve obstrüksiyondur. Kriptorşidizm nedeniyle geçmişte orşiopeksi yapılan NOA'lı hastalarda yapılan TESE'nin başarısı çalışmamızda %63 olarak bulunmuştur. Etiyolojisinde herhangi bir neden bulunamayan idiopatik hasta grubunda ise sperm bulma başarısı literatüre benzer şekilde %42 olarak bulunmuştur.

Literatürde TESE'de sperm elde başarısını predikte etmede en önemli faktör olarak gösterilen testis biyopsisinin, çalışmamızda da TESE'de sperm bulma olasılığı ile ilişkisi gösterildi. 2001 yılında Seo JT. ve arkadaşlarının NOA'lı hastalarda yaptığı bir çalışmada patolojisi SCO gelen hastaların %16'sında, patolojisi MA olan hasta grubunun %63'ünde ve patolojisi HS olan hasta grubunun %89'unda TESE'de sperm bulunmuştur. Çalışmada histopatoloji ile TESE başarısı arasında korelasyon gösterilmiş[133]. 2012'de yayınlanan Raheem AA. ve arkadaşlarının NOA'lı hastalar üzerinde yaptığı bir çalışma da ise patolojisi SCO, MA, HS ve normal spermatogenezis olan hastaların sırasıyla %24, %37, %94 ve %100'ünde TESE'de sperm bulunmuştur. Bu sonuçlarla gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, gruplar arası farklılık istatistiksel olarak da anlamlı çıkmıştır ($p<0.001$) [161]. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde, patolojisi HS ve MA olan grupların TESE başarısı, patolojisi SCO gelen hasta grubunun TESE başarısından önemli derecede istatistiksel olarak farklı çıkmıştır. Patolojisi MA ve HS olan gruplar arasında da istatistiksel olarak fark gösterilmiş, patolojisi HS olan grupta TESE'de sperm bulma başarısı, patolojisi MA olan gruba göre daha yüksek çıkmıştır.

Bazı markırların TESE öncesi testislerde sperm varlığını belirlemede rolleri değişik çalışmalarda araştırılmıştır. Testiste kök hücre markırları olarak kabul edilen CD24 ve CD133 genlerinin spermatogenez defekti ile ilişkisi ve azoospermik hastalarda bir belirteç olarak kullanıp kullanılamayacağı araştırılmış, CD133 geninin en fazla OA grubunda, sonra azalarak HS ve MA grubunda eksprese edildiği gösterilmiştir. SCO grubunda ise CD133 ekspresyonu hiç gösterilememiştir [165].

ADAMTS gen ailesinden ADAMTS1 ve ADAMTS5 ifadelerinin, fertil hasta grubunun hücre kültürlerinde NOA hastalarının hücre kültüründekine göre sırası ile 1.7 ve 1.96 kat daha fazla olduğu ispat edilmiştir. TESE yapılması planlanan

hastalarda, öncesinde bu genlerin ekspresyon düzeyine bakılmasının sperm elde etme başarısını öngörmeye etkili olabileceği düşünülmüştür [166]. Yine bu genler üzerine yapılmış başka bir çalışmada, infertil bireyler normozoospermi, oligozoospermi ve azoospermi gruplarına ayrılmış, semendeki ADAMTS1 ve ADAMTS5 protein seviyeleri analiz edilmiştir. ADAMTS1 protein seviyesi, OS, AS ve NS gruplarında kontrol grubuna göre sırasıyla 3, 3.3 ve 1.6 kat daha düşük, ADAMTS5 protein düzeyi ise, OS, AS ve NS gruplarında kontrol grubuna göre sırasıyla 3.2, 2.7 ve 1.4 kat daha düşük bulunmuştur. Semende ölçülen bu iki proteinin ifadeleri ile sperm üretiminin önemli ölçüde ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [167]. ADAMTS ailesi proteinler, germ hücrelerinin olgunlaşma aşamasında Sertoli hücrelerinden ayrılmasında rolü bulunur. Bu proteinlerin düşük ifadeleri, TESE tekniğinin seçimi bakımından önemlidir. Böyle olgularda testis dokusunun enzimatik ayrıştırması, spermatozoa elde edilmesinde başarıyı artırabilir. Nitekim enzimatik ayrıştırmanın TESE ile sperm elde etme olasılığını anlamlı derecede artırdığı başka çalışmalarda da gösterilmiştir [159].

Proteomiklerden ECM1 ve TEX101'in seminal plazmadaki miktarlarının, azoospermının çeşidini ve testis patolojisini aydınlatmadaki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada sonuçlar bir hayli yüz güldürücü olmuştur. Çalışma sonucunda; ECM1 proteinin 2,3 µg/ml'nin altında olmasının OA'yı düşündürmesi ve hastaya yüksek başarı şansı olduğu söylenerek TESE'ye yönlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. ECM1>2,3 µg/ml olduğunda ise NOA düşünülmeli ve bu durumda TEX101 miktarına bakılarak; TEX101 5-120 ng/ml ise testis patolojisinin HS veya MA, 5 ng/ml'nin altında ise SCO olduğu düşünülmeli gerektiği belirtilmiştir. Testis patolojisi HS ve MA düşünülen hastalarda TESE başarısının daha yüksek, SCO olan hastalarda daha düşük olacağı öngörülüp, hastalara uygun danışmanlık verilmelidir [145].

Hashemi MS. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada azoospermik erkeklerde sperm elde etme şansını öngörebilmek adına 7 adet testis spesifik moleküler marker incelenmiş, bunlar arasından SPEM1'in TESE başarısı için önemli bir belirteç olduğu sonucuna varılmıştır [168].

FSH tedavisi öncesi ve sonrası NOA'lı erkeklerden elde edilen Sertoli hücre kültürlerinde 88 farklı sitokinin ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış, sonuçlar FSH tedavisinin NOA hastalarının Sertoli hücreleri üzerinde belirli gen ekspresyon seviyelerini değiştirerek sperm elde etmede olumlu etkilerinin olabileceğini göstermiştir. Bazı sitokin seviyelerinin ise NOA hastalarını saptamada potansiyel bir aday olabileceği belirtilmiştir [169].

Sperm hücreleri mayoz bölünme ile çoğaldığı için, mayoz bölünmenin testis dokusunda aktif olduğunun gösterilmesi azoospermik erkeklerde sperm üretimi ile ilgili önemli bilgiler verebilir[170]. Ökaryotlarda yapılan çalışmalar LİM-15 proteinin sadece mayoz bölünmeye spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiştir. Bu nedenle bu proteinlerin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir [13]. PCNA ise LİM-15 ve Rad-51 gibi proteinlerle etkileşerek DNA replikasyonunda ve onarımında anahtar rol oynamaktadır [13]. Neticede, LİM-15 gen ekspresyon analizi testis dokusu içinde sperm yapımını sağlayan mayoz bölünmenin olup olmadığını veya olma potansiyelini (olabileceğini) gösteren önemli bir belirteçtir. Dolayısıyla azoospermik hastalarda LİM-15 gen ekspresyonuna bakılarak, hastanın sperm üretiminin veya üretme potansiyelinin olup olmadığı, verilen tedavinin bu potansiyeli artırıp arttırmadığı ve verilecek tedavinin etkili olup olmayacağı endişeleri kısmen de olsa giderilebilir.

TESE ameliyatı sonrası olgun spermatozoa bulunamaması durumunda bakılacak en önemli şey, henüz olgunlaşmamış ama olgunlaşma potansiyeli olan erken evre sperm seri hücrelerinin bulunup bulunmadığıdır. Bu hücreler hormonal yollarla stimüle edilerek bunların daha hızlı olgunlaşmaları sağlanabilir ve bir sonraki TESE ile olgun spermatozoa elde etme olanağı sağlanabilir [171, 172]. Bu tedavilerden fayda görecektir hasta grubunda LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin daha fazla olacağı beklenebilir.

PCNA ifadesi bir çalışmada NOA'lı hastaların gonadotropin tedavisine cevap verip vermediğini tespit etmek için kullanılmıştır. Spermatogenik hücrelerdeki DNA sentezi, PCNA ekspresyon miktarlarının ölçümü ile değerlendirilmiştir. PCNA ifadesi incelenerek hastaların gonadotropin tedavisine tepki verip vermediği hakkında bir kanıya varılmıştır [17]. Başka bir çalışmada ise farelere değişen

miktarlarda sperm yapımını negatif yönde etkileyen kuinestrol maddesi verilmiştir. Sonuç olarak; kuinestrol alan grupta apoptatik kaspaz-3, Bax, Fas ve Fas-L'nin ekspresyonunu artarken, PCNA ve Bcl-2 miktarları azaldığı gösterilmiştir [173]. Bunlar da göstermektedir ki, PCNA ifadesi ile spermatogenez arasında doğrudan ilişki mevcuttur. Germ hücrelerinde mitoz azaldıkça, PCNA ifadesi de düşme eğilimi gösterir. Dolayısıyla, PCNA'daki bu şekilde bir farklılığın ortaya konması, TESE ile sperm elde etme olasılığını tahmin ettirebilir. Her ne kadar çalışmamızda seminal plazma PCNA ölçümleri ile anlamlı bir netice çıkmamış olsa da, bu yönde bir eğilim dikkat çekmektedir.

Singh V. ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınlanan çalışmasında testis biyopsilerinde ölçülen DNA tamir genlerinin değişen ifadelerinin azospermi ve infertilite ile ilişkisi gösterilmiştir. Çalışılan genlerden biri olan LİM-15/DMC1 geni ekspresyonun normal spermatogenezde en fazla iken, HS, MA ve SCO'ye doğru giderek azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak DNA tamir mekanizması genlerinden biri olan LİM-15 (DMC1) geni down-regülasyonunun, artmış apoptozis, azospermi ve infertilite ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [174].

Bizim çalışmamızda da testis biyopsilerinde bakılan LİM-15 ve PCNA gen ekspresyon düzeylerinin TESE'de sperm saptanan hastalarda daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı çıkmıştır (TESE PCNA; $p=0,038$ ve TESE LİM-15; $p=0,022$). Bu sonuç daha önce bu konuda yapılmış spermatogenez-PCNA/LİM-15 ilişkisini gösteren literatürlerle benzer sonuç göstermektedir [13, 17, 173]. Çalışmamızın sonuçları ve geçmiş literatür sonuçları ele alındığında testis biyopsisinde bakılan PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon miktarlarının bir sonraki TESE başarısını ön görmede yardımcı olabileceğini söylemek mümkündür.

Çalışmamızda, semende yani seminal sıvıda bakılan PCNA ve LİM-15 gen düzeyleri de TESE'de sperm bulunan infertil hastalarda daha yüksek oranda saptanmıştır. Sonuçlara bakıldığında; semen LİM-15 gen ekspresyon düzeyinin TESE + hasta grubunda istatistiksel olarak daha fazla olduğu görülürken, TESE + hasta grubundaki semen PCNA gen ekspresyon düzeyi yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır (Semen PCNA; $p=0,061$ ve Semen LİM-15; $p=0,004$). Semen

PCNA düzeyinde iki grup arasında istatistiksel farkın çıkmama sebebi hasta sayısının yeterli olmamasıdır. Hasta sayısı arttırıldığında iki grup arasındaki seminal sıvıda ölçülen PCNA değeri farkının da anlamlı bir seviyede olacağı kanısı edinilmektedir.

Gerek testis biyopsisinde gerek seminal sıvıda ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin, patolojisi SCO olan hasta grubunda daha düşük olması bu hasta grubundaki TESE başarısı ile yakından ilişkilidir.

Çalışmamızın kısıtlılıklarının başında hasta sayısının azlığı gelmektedir. Hasta sayısı arttığı takdirde, sayısal olarak farklılık gösteren değerler, istatistiksel olarak da farklılık göstererek sonuçları değiştirebilecektir. Ayrıca bu hastalarda, tekrarlayan TESE'lerde sperm elde edilmesi, sonuçları ve analizlerin değişmesine neden olacak ve yeniden gözden geçirilmesini gerektirecektir. Yine bu hastalarda testis heterojenitesine bağlı olarak, farklı zamanlarda alınan farklı örneklerde, spermatogeneze ait gen ürünlerinin farklı oranlarda saptanması da imkân dahilindedir ve bu durum da sonuçları etkileme potansiyeline sahiptir.

6. SONUÇ

Çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin yaklaşık %15'i bir yıl içerisinde gebelik sağlayamamakta ve bu nedenle tedavi almaktadır. Bu çiftlerin %50'sinde infertiliteye anormal semen parametreleri neden olmaktadır. Anormal semen parametreleri içerisinde NOA'nın önemli bir yeri vardır. NOA hastalarında gebelik elde edilebilmesi için YÜT'nin kullanılması gereklidir. mTESE, NOA'lı hastalarda YÜT için kullanılacak spermin elde edilmesinde gerek başarı gerek düşük komplikasyon oranları ile en seçkin cerrahi yöntemdir.

YÜT'nin invaziv olması, maliyetlerinin yüksek olması ve hazırlıklarının ovaryan hiperstimülasyon sendromu gibi patofizyolojik ve psikolojik etkileri nedeniyle, bu hastalara özel danışmanlık verilmesi önemli bir husustur. Bu nedenle geçmişte TESE öncesinde cerrahi işlemin başarısını öngörebilmeyi amaçlayan pek çok klinik ve laboratuvar çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalarda çeşitli genetik, histolojik ve hormonal faktörler araştırılmış çalışmaların çoğunda yeterli sonuç sağlanamamıştır.

Günümüzde NOA'lı erkeklerde sperm elde etmede en önemli prediktif faktör testis histolojisi olsa da, testis biyopsisi gibi invaziv bir işlem gerektirmesi nedeniyle seminal sıvıda bakılacak parametreler ile TESE başarısı predikte edilmeye çalışılmış ve bu konu üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada da, daha önceki çalışmalara benzer şekilde sperm bulmayı predikte edebilecek faktörlerden yaş, serum total testosteron ve FSH düzeyi, testis volümleri ve testis histopatolojisi incelenmiş olup, testis volümlerinin ve histopatolojisinin iyi birer prediktif faktörler olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada, NOA'lı TESE endikasyonu konulan hastalarda hem operasyon öncesi alınan semen, hem de TESE sırasında alınan testis doku örneğinde, geçmiş literatürlerde de üzerinde çalışmalar yapılmış olan PCNA ve LİM-15 (DMC1) genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Bu ekspresyon düzeyleri ile TESE'de sperm bulunması arasındaki ilişki incelenmiş ve TESE dokusunda bakılan PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri ile semende bakılan LİM-15 gen ekspresyon düzeyinin TESE başarısını öngörmeye etkili olduğu gösterilmiştir.

Semen dokusunda bakılan PCNA düzeyi her ne kadar sperm saptanan hasta grubunda daha yüksek miktarda tespit edilse de bu fark istatistiğe yansımamıştır. Fakat hasta sayısının arttırılmasıyla bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olacağı düşünülmektedir. Bu sonuçlara göre PCNA ve LİM-15 genlerinin down-regülasyonun azospermi ve infertilite ile ilişkili olduğunu söyleyebiliriz.

Mümkünse semende, değilse TESE sırasında alınacak olan testis doku örneklerinde çalışılarak elde edilecek PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri, kendi biyolojik çocuklarına sahip olma umuduyla YÜT için hazırlık yapan infertil hastalara daha kaliteli danışmanlık hizmeti verilmesinin yolunu açacak ve gereksiz maliyetlerin engellenmesi sağlanacaktır.

Netice olarak; biz bu tez çalışmamızda NOA olgularında mTESE öncesi testislerde sperm üretim durumunu tahmin ettirmeye yönelik LİM-15 ve PCNA markerlarının genetik ifade düzeylerini araştırdık. Sonuçlarımız, özellikle LİM-15'in, mTESE öncesi seminal plazmada ölçülmesinin, olgun sperm elde etmede anlamlı rolü olacağını göstermiştir. Diğer klinik bulgularla birlikte değerlendirildiğinde bu oran daha da artmaktadır. Ancak sperm üretimi henüz tam anlamıyla ortaya konulamamış çok karışık bir mekanizmayla olur. Özellikle sperm kök hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile mayoz bölünmelerini belirleyen genomik, proteomik ve metabolomik çok sayıda moleküler etkileşim mevcuttur. Bütün bunların yanı sıra, epigenetik faktörlerin de belirleyici rolleri gösterilmiştir. Nihayet, tetkiklerde kullanılan laboratuvar tekniklerinin de duyarlılıkları henüz optimum değildir. Ancak çalışmalar ilerledikçe, izah edilemeyen azospermi olgularının tedavisinde daha başarılı sonuçların alınacağı kesindir. Çalışmamızdan elde edile bulguların bu alanda yapılacak diğer araştırmalara ışık tutacağı kanısındayız.

ÖZET

NON-OBSTRUKTİF AZOSPERMİLİ HASTALARDA EJEKÜLATTA VE TESE MATERYALİNDE BAKILAN PCNA VE LİM-15 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN TESE'DE SPERM BULMA KONUSUNDA PREDİKTİF DEĞERİ

Amaç: Kliniğimizde NOA tanısı konularak TESE işlemi uygulanan hastalarda, ejakülatta ve testis dokusunda bakılan PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin TESE başarısını öngörme olasılığını incelemek

Yöntem ve Gereç: Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi üroloji polikliniğine 01 Şubat 2018 ve 31 Temmuz 2019 tarihleri arasında başvuran, NOA tanısı ile mTESE cerrahi endikasyonu konulan hastalar dahil edilmiştir. mTESE yapılmış olan tüm hastalardan cerrahi öncesi 7 gün içinde Lim 15 ve PCNA gen ekspresyon düzeyleri ölçülmek üzere semen örneği alınmıştır. TESE işlemi sırasında, sperm hücresi araştırmak, Lim 15 ve PCNA gen ekspresyon düzeyleri ölçmek ve testis histolojisini değerlendirmek için ayrı ayrı doku örnekleri alınmıştır. Alınan semen örneği ve testis dokusu bir dizi işleminden geçtikten sonra dokularda revers transkriptaz enzimi ile cDNA'lar sentezlenmiştir. Daha sonrasında ise RT-PCR ile ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar TESE'de sperm bulunan ve bulunmayan iki grup arasında karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya 22-45 yaş aralığında dahil edilen 143 hastanın ortalama yaşı 34,3 ($\pm 4,2$) olarak saptanmıştır. Hastaların 73'ünde TESE'de sperm saptanırken (%51), kalan 70'inde (%49) sperm gözlenmemiştir. Hastaların total testosteron değerinin 116-821 ng/dl arasında değiştiği ve ortalama total testosteron değerinin 431,02 ($\pm 161,2$) ng/dl olduğu görülmüştür. Hastaların FSH düzeyleri ise 1,1-28 arasında değişmekte olup, ortalama FSH değeri 6,19 ($\pm 5,8$) mIU/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre yaşın, serum total testosteron ve FSH düzeylerinin, TESE'de sperm elde etme oranları üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır (Yaş; $p=0,982$, Total testosteron; $p=0,120$, FSH; $p=0,362$). Hastaların ultrasonografik olarak ölçülen sağ ve sol testis volüm ortalamaları sırasıyla 15,45 ($\pm 6,5$) ml ve 15,55 ($\pm 6,2$) ml idi. Hastalar testis volümlerine göre 5 ml ve altı, 5-15

ml ve 15 ml üstü olarak 3 gruba ayrılmıştır. Üç grup, sperm bulma açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında testis volmü 15 ml'den yüksek olan grupta istatistiksel olarak daha fazla sperm bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır ($p=0,008$). Aynı şekilde testis volmü 6-15 ml olan hastalarda sperm bulma şansının, testis volmü 5 ml'den küçük olgularınkinden istatistiksel olarak daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Yapılan TESE işleminde testis patolojisi MA ve HS gelen hasta gruplarında, patolojisi SCO gelen hasta grubuna göre sperm elde etme şansının istatistiksel olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). Aynı şekilde patolojisi HS gelen grupta, patolojisi MA olan gruba göre sperm elde etme şansının istatistiksel olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). TESE dokusunda ölçülen PCNA ve LİM-15 ve semende ölçülen LİM-15 gen ekspresyon miktarı açısından sperm bulunan ve bulunmayan iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır (TESE-PCNA; $p=0,038$, TESE-LİM-15; $p=0,022$ Semen-LİM-15; $p=0,004$). Semende ölçülen PCNA ekspresyon miktarı açısından sperm bulunan ve bulunmayan iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Sonuç: NOA'lı hastalarda, TESE işleminde alınan dokularda ölçülen PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeylerinin ve semen örneklerinde ölçülen LİM-15 gen ekspresyon düzeyinin TESE'de sperm saptanması ile korele olduğu gösterilmiştir. Hasta sayısının arttırılması halinde semende ölçülen PCNA gen ekspresyon düzeyinin de istatistiksel olarak anlamlı çıkacağı düşünülmektedir. PCNA ve LİM-15 gen ekspresyon düzeyleri, kendi biyolojik çocuklarına sahip olma umuduyla YÜT için hazırlık yapan infertil hastalara daha kaliteli danışmanlık hizmeti verilmesinin yolunu açacak ve gereksiz maliyetlerin engellenmesi sağlanacaktır.

Anahtar Sözcükler: azospermi, prediktif faktör, testiküler sperm ekstraksiyonu, infertilite

SUMMARY

PREDICTIVE VALUE OF PCNA AND LIM-15 GENE EXPRESSION LEVELS IN EJECULATE AND TESE MATERIALS FOR NON-OBSTRUCTIVE AZOSPERMIA PATIENTS

Objective: To investigate the likelihood of the expression of PCNA and LIM-15 gene expression levels in ejaculate and testicular tissue in patients undergoing TESE with the diagnosis of NOA in our clinic.

Materials and Methods: Patients who were admitted to Ankara University Medical Faculty urology outpatient clinic between February 2018 and July 2019 were diagnosed as non-obstructive azospermia (NOA) and indicated for mTESE surgery included in this study. Semen samples were taken from all patients who underwent mTESE to measure Lim 15 and PCNA gene expression levels within 7 days before surgery. During the TESE procedure, individual tissue samples were taken to investigate sperm cell, measure Lim 15 and PCNA gene expression levels and evaluate testicular histology. After the semen sample and testicular tissue underwent a series of procedures, complementary DNAs were synthesized by reverse transcriptase enzyme. Afterwards, expression levels were measured by RT-PCR. Results were compared between two groups according to successful sperm retrieval in TESE procedure.

Results: 143 patients were included in the study. The range of age was 22-45 years and the mean age was 34.3 ($\pm$ 4.2) years. While 73 of the patients (51%) were found to have sperm in TESE, sperm was not observed in 70 patients (49%). Total testosterone value ranged from 116-821 ng / dl and the mean total testosterone value was 431.02 ($\pm$ 161.2) ng / dl. FSH levels of the patients ranged from 1.1 to 28 and the mean FSH value was 6.19 ($\pm$ 5.8) mIU / ml. According to these results, it was found that age, serum total testosterone and FSH levels did not have a significant effect on sperm retrieval rates (Age; p = 0.982, Total testosterone; p = 0.120, FSH; p = 0.362). The mean volume of the right and left testes was 15.45 ($\pm$ 6.5) ml and 15.55 ($\pm$ 6.2) ml, respectively. Patients were divided into 3 groups according to their testicular volumes: <5 ml, 5-15 ml and >15 ml.. When these three groups were

compared with each other in terms of sperm retrieval, it was concluded that much more sperm retrieval was obtained in the testis volume of more than 15 ml ($p = 0.008$). Similarly, the rate of successful sperm retrieval was statistically higher in patients with testicular volume of 6-15 ml than those of testicular volume less than 5 ml ($p < 0.05$). In the TESE procedure, it was shown that the rate of sperm retrieval was statistically higher in the patients with maturation arrest and hypospermatogenesis as a result of testicular pathology than the patients with Sertoli cell only ($p < 0.05$). Likewise, it was shown that the rate of sperm retrieval was statistically higher in the group with pathology HS than the group with pathology MA ($p < 0.05$). There was a statistically significant difference between two groups with and without sperm in terms of PCNA and LIM-15 expression in TESE tissue and LIM-15 gene expression measured in semen (TESE-PCNA; $p = 0.038$, TESE-LIM-15; $p = 0.022$ Semen -LIM-15; $p = 0.004$). There was no statistically significant difference between two groups with and without sperm in terms of PCNA expression measured in semen.

Conclusion: It was shown that PCNA and LIM-15 gene expression levels measured in tissues taken during TESE procedure and LIM-15 gene expression levels measured in semen samples were correlated with sperm detection in TESE in patients with NOA. PCNA gene expression level measured in semen is considered to be statistically significant if the studies are performed with a wider patient population. PCNA and LIM-15 gene expression levels will lead to better quality counseling for infertile patients preparing for ART in the hope of having their own biological children. In addition, unnecessary costs will be prevented for these patients.

Keywords: azospermia, predictive factor, testicular sperm extraction, infertility

KAYNAKLAR

1. Haimov-Kochman, R., Y. Sciaky-Tamir, and A. Hurwitz, *Reproduction concepts and practices in ancient Egypt mirrored by modern medicine*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. **123**(1): p. 3-8.
2. Zegers-Hochschild, F., et al., *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. Fertil Steril, 2009. **92**(5): p. 1520-4.
3. Gurunath, S., et al., *Defining infertility--a systematic review of prevalence studies*. Hum Reprod Update, 2011. **17**(5): p. 575-88.
4. Zegers-Hochschild, F., et al., *The international glossary on infertility and fertility care, 2017*. Human reproduction, 2017. **32**(9): p. 1786-1801.
5. Gunnell, D.J. and P. Ewings, *Infertility prevalence, needs assessment and purchasing*. J Public Health Med, 1994. **16**(1): p. 29-35.
6. Mosher, W.D. and W.F. Pratt, *Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends*. Fertility and sterility, 1991. **56**(2): p. 192-3.
7. Rowe, P.J., et al., *WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male*. 2000: Cambridge University Press.
8. Van Peperstraten, A., et al., *Techniques for surgical retrieval of sperm prior to intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) for azoospermia*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(2): p. Cd002807.
9. Andrology, I., Nieschlag E, Behre HM and Nieschlag S (eds). *Male reproductive health and dysfunction*. Male reproductive health and dysfunction, 2010.
10. Abdel-Meguid, T.A., *Predictors of sperm recovery and azoospermia relapse in men with nonobstructive azoospermia after varicocele repair*. J Urol, 2012. **187**(1): p. 222-6.

11. Colpi, G.M., et al., *Sperm retrieval for intra-cytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia*. Minerva Urol Nefrol, 2005. **57**(2): p. 99-107.
12. Aslani, F., et al., *Seminal molecular markers as a non-invasive diagnostic tool for the evaluation of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia*. Syst Biol Reprod Med, 2011. **57**(4): p. 190-6.
13. Hamada, F.N., et al., *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacts with a meiosis-specific RecA homologues, Lim15/Dmc1, but does not stimulate its strand transfer activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(4): p. 836-42.
14. Sauvageau, S., et al., *Fission yeast rad51 and dmc1, two efficient DNA recombinases forming helical nucleoprotein filaments*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(11): p. 4377-4387.
15. al-Sheneber, I.F., et al., *Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer*. Cancer, 1993. **71**(6): p. 1954-9.
16. Zhou, H., et al., *The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer: A meta-analysis*. Medicine (Baltimore), 2018. **97**(50): p. e13752.
17. Shinjo, E., K. Shiraishi, and H. Matsuyama, *The effect of human chorionic gonadotropin-based hormonal therapy on intratesticular testosterone levels and spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia*. Andrology, 2013. **1**(6): p. 929-35.
18. Carlson, B.M., *Human Embryology and Developmental Biology E-Book: With STUDENT CONSULT Online Access*. 2008: Elsevier Health Sciences.
19. Hai, Y., et al. *The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2014. Elsevier.
20. Famiglietti, G., *Normal ultrasonographic anatomy and measurement of the scrotum*. Archivio italiano di urologia, andrologia: organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica, 2000. **72**(4): p. 345-349.

21. Wosnitzer, M.S. and M. Goldstein, *Obstructive azoospermia*. Urologic Clinics, 2014. **41**(1): p. 83-95.
22. Dacheux, J.-L. and F. Dacheux, *New insights into epididymal function in relation to sperm maturation*. Reproduction, 2014. **147**(2): p. R27-R42.
23. Rey, R., *Regulation of spermatogenesis*. Endocrine Development, 2003. 5: p. 38-55.
24. Lehnert, J. and A. Khadra, *How pulsatile kisspeptin stimulation and GnRH autocrine feedback can drive GnRH secretion: A modeling investigation*. Endocrinology, 2019.
25. Johnson, L., et al., *Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach*. Animal Reproduction Science, 2000. **60**: p. 471-480.
26. Griswold, M.D., *Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis*. Physiol Rev, 2016. **96**(1): p. 1-17.
27. Wilcox, A.J., C.R. Weinberg, and D.D. Baird, *Timing of sexual intercourse in relation to ovulation—effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby*. New England Journal of Medicine, 1995. **333**(23): p. 1517-1521.
28. Dunson, D.B., et al., *Day-specific probabilities of clinical pregnancy based on two studies with imperfect measures of ovulation*. Human Reproduction, 1999. **14**(7): p. 1835-1839.
29. Wilcox, A.J., D. Dunson, and D.D. Baird, *The timing of the “fertile window” in the menstrual cycle: day specific estimates from a prospective study*. Bmj, 2000. **321**(7271): p. 1259-1262.
30. Tur-Kaspa, I., et al., *How often should infertile men have intercourse to achieve conception?* Fertility and sterility, 1994. **62**(2): p. 370-375.
31. Glazer, C.H., et al., *Male factor infertility and risk of multiple sclerosis: A register-based cohort study*. Mult Scler, 2017: p. 1352458517734069.
32. Krassas, G., K. Poppe, and D. Glinioer, *Thyroid function and human reproductive health*. Endocrine reviews, 2010. **31**(5): p. 702-755.

33. Lambert, S.M. and H. Fisch, *Infertility and testis cancer*. Urol Clin North Am, 2007. **34**(2): p. 269-77; abstract xi.
34. Harlev, A., et al., *Smoking and male infertility: an evidence-based review*. The world journal of men's health, 2015. **33**(3): p. 143-160.
35. Petrelli, G. and I. Figa-Talamanca, *Reduction in fertility in male greenhouse workers exposed to pesticides*. European journal of epidemiology, 2001. **17**(7): p. 675-677.
36. Gennart, J.-P., et al., *Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese*. American journal of epidemiology, 1992. **135**(11): p. 1208-1219.
37. Jorgensen, N., et al., *Testicular dysgenesis syndrome comprises some but not all cases of hypospadias and impaired spermatogenesis*. Int J Androl, 2010. **33**(2): p. 298-303.
38. Lo, E.M., J.M. Hotaling, and A.W. Pastuszak, *Urologic conditions associated with malignancy*. Urol Oncol, 2019.
39. Lipshultz, L.I. and J.N. Corriere, *Progressive testicular atrophy in the varicocele patient*. The Journal of urology, 1977. **117**(2): p. 175-176.
40. Neischlag, E., H. Behre, and S. Neischlag, *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. 2010, Springer: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
41. Clarke, G.N., *ART and history, 1678–1978*. Human Reproduction, 2006. **21**(7): p. 1645-1650.
42. Organization, W.H., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2010.
43. Jungwirth, A., et al., *EAU Guidelines on*. 2016.
44. Björndahl, L., et al., *'How to count sperm properly': checklist for acceptability of studies based on human semen analysis*. Human reproduction, 2015. **31**(2): p. 227-232.
45. Carlsen, E., et al., *Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality*. Fertil Steril, 2004. **82**(2): p. 358-66.

46. Bjorndahl, L. and U. Kvist, *Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message*. Reprod Biomed Online, 2003. **7**(4): p. 440-8.
47. Agarwal, A., H. Malvezzi, and R. Sharma, *Effect of an isotonic lubricant on sperm collection and sperm quality*. Fertil Steril, 2013. **99**(6): p. 1581-6.
48. Handelsman, D.J., et al., *Randomised controlled trial of whether erotic material is required for semen collection: impact of informed consent on outcome*. Andrology, 2013. **1**(6): p. 943-7.
49. Brown, D.J., S.T. Hill, and H.W. Baker, *Male fertility and sexual function after spinal cord injury*. Prog Brain Res, 2006. **152**: p. 427-39.
50. Berman, N.G., C. Wang, and C.A. Paulsen, *Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data*. J Androl, 1996. **17**(1): p. 68-73.
51. Jorgensen, N., et al., *Regional differences in semen quality in Europe*. Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 1012-9.
52. Swan, S.H., et al., *Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(4): p. 414-20.
53. Macdonald, A.A., A.W. Stewart, and C.M. Farquhar, *Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones in New Zealand men: a cross-sectional study in fertility clinics*. Hum Reprod, 2013. **28**(12): p. 3178-87.
54. Hammoud, A.O., et al., *Obesity and male infertility: a practical approach*. Semin Reprod Med, 2012. **30**(6): p. 486-95.
55. Eisenberg, M.L., et al., *Relationship between semen production and medical comorbidity*. Fertil Steril, 2015. **103**(1): p. 66-71.
56. Hamilton, J.A., et al., *Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system*. Hum Reprod, 2015. **30**(5): p. 1110-21.
57. Borges, E., Jr., et al., *Total motile sperm count has a superior predictive value over the WHO 2010 cut-off values for the outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles*. Andrology, 2016. **4**(5): p. 880-6.

58. Buck Louis, G.M., et al., *Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study*. Fertil Steril, 2014. **101**(2): p. 453-62.
59. van der Steeg, J.W., et al., *Should the post-coital test (PCT) be part of the routine fertility work-up?* Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1373-9.
60. Corson, S.L., et al., *The human sperm-hamster egg penetration assay: prognostic value*. Fertil Steril, 1988. **49**(2): p. 328-34.
61. Guzick, D.S., et al., *Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1388-93.
62. Munuce, M.J., et al., *Relationship between antisperm antibodies, sperm movement, and semen quality*. Urol Int, 2000. **65**(4): p. 200-3.
63. McLachlan, R.I., et al., *Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice*. Pathology, 2003. **35**(1): p. 25-33.
64. Francavilla, F., et al., *Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 2890-911.
65. Shai, S., et al., *A multicenter study evaluating the flowcytometric-based kit for semen analysis*. Fertil Steril, 2005. **83**(4): p. 1034-8.
66. Xu, S.P. and B.E. Zhan, *[Analysis of relationship between semen quality and sperm acrosin activity]*. Zhonghua Nan Ke Xue, 2006. **12**(5): p. 438-40.
67. Lewis-Jones, D.I., et al., *Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma*. Hum Reprod, 1996. **11**(11): p. 2465-7.
68. Deepinder, F., M. Cocuzza, and A. Agarwal, *Should seminal oxidative stress measurement be offered routinely to men presenting for infertility evaluation?* Endocr Pract, 2008. **14**(4): p. 484-91.
69. Zini, A. and M. Sigman, *Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons*. Journal of andrology, 2009. **30**(3): p. 219-229.
70. Sigman, M. and J.P. Jarow, *Endocrine evaluation of infertile men*. Urology, 1997. **50**(5): p. 659-64.

71. Trummer, H., et al., *Thyroid hormones and thyroid antibodies in infertile males*. Fertil Steril, 2001. **76**(2): p. 254-7.
72. Ratbi, I., et al., *Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling*. Hum Reprod, 2007. **22**(5): p. 1285-91.
73. Johnsen, S.G., *Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males*. Hormone Research in Paediatrics, 1970. **1**(1): p. 2-25.
74. Joshi, K.R., et al., *Effects of vasectomy on testes*. Int Surg, 1972. **57**(9): p. 711-3.
75. Jarow, J.P., M.A. Espeland, and L.I. Lipshultz, *Evaluation of the azoospermic patient*. J Urol, 1989. **142**(1): p. 62-5.
76. French, D.B. and E. Sabanegh, *Advances in microsurgery and assisted reproduction for management of male infertility*. Front Biosci (Elite Ed), 2009. **1**: p. 381-9.
77. Sigman, M. and J.P. Jarow, *Endocrine evaluation of infertile men*. Urology, 1997. **50**(5): p. 659-664.
78. Baazeem, A., et al., *Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair*. Eur Urol, 2011. **60**(4): p. 796-808.
79. Braedel, H., et al., *A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele*. The Journal of urology, 1994. **151**(1): p. 62-66.
80. Khera, M. and L.I. Lipshultz, *Evolving approach to the varicocele*. Urologic Clinics of North America, 2008. **35**(2): p. 183-189.
81. Wright, E.J., G.P. Young, and M. Goldstein, *Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men*. Urology, 1997. **50**(2): p. 257-259.

82. Allamaneni, S.S., et al., *Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size*. Fertility and sterility, 2004. **82**(6): p. 1684-1686.
83. Mostafa, T., et al., *Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele*. Andrologia, 2009. **41**(2): p. 125-129.
84. *Report on varicocele and infertility*. Fertil Steril, 2004. **82 Suppl 1**: p. S142-5.
85. Jungwirth, A., et al., *European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update*. Eur Urol, 2012. **62**(2): p. 324-32.
86. Segenreich, E., et al., *Evaluation of the relationship between semen parameters, pregnancy rate of wives of infertile men with varicocele, and gonadotropin-releasing hormone test before and after varicocelectomy*. Urology, 1998. **52**(5): p. 853-857.
87. Abdulmaaboud, M.R., et al., *Treatment of varicocele: a comparative study of conventional open surgery, percutaneous retrograde sclerotherapy, and laparoscopy*. Urology, 1998. **52**(2): p. 294-300.
88. Pryor, J. and S. Howards, *Varicocele*. The urologic clinics of North America, 1987. **14**(3): p. 499-513.
89. Esteves, S.C., M. Roque, and A. Agarwal, *Outcome of assisted reproductive technology in men with treated and untreated varicocele: systematic review and meta-analysis*. Asian J Androl, 2016. **18**(2): p. 254-8.
90. Scorer, C., *The descent of the testis*. Archives of disease in childhood, 1964. **39**(208): p. 605.
91. Caroppo, E., et al., *Effect of cryptorchidism and retractile testes on male factor infertility: a multicenter, retrospective, chart review*. Fertility and sterility, 2005. **83**(5): p. 1581-1584.
92. Hadziselimovic, F., E. Hecker, and B. Herzog, *The value of testicular biopsy in cryptorchidism*. Urol Res, 1984. **12**(3): p. 171-4.

93. Sussman, E.M., A. Chudnovsky, and C.S. Niederberger, *Hormonal evaluation of the infertile male: has it evolved?* Urol Clin North Am, 2008. **35**(2): p. 147-55, vii.
94. Holm, V.A., et al., *Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria.* Pediatrics, 1993. **91**(2): p. 398-402.
95. LEY, S.B. and J.M. LEONARD, *Male Hypogonadotropic Hypogonadism: Factors Influencing Response to Human Chorionic Gonadotropin and Human Menopausal Gonadotropin, Including Prior Exogenous Androgens.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1985. **61**(4): p. 746-752.
96. BURRIS, A.S., et al., *Gonadotropin therapy in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism: the response to human chorionic gonadotropin is predicted by initial testicular size.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1988. **66**(6): p. 1144-1151.
97. Melmed, S., et al., *Williams textbook of endocrinology.* 2015: Elsevier Health Sciences.
98. Urban, M.D., P.A. Lee, and C.J. Migeon, *Adult height and fertility in men with congenital virilizing adrenal hyperplasia.* New England Journal of Medicine, 1978. **299**(25): p. 1392-1396.
99. Melmed, S., et al., *Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011. **96**(2): p. 273-288.
100. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome.* Endocrine reviews, 2000. **21**(6): p. 697-738.
101. Kamischke, A., et al., *Clinical and diagnostic features of patients with suspected Klinefelter syndrome.* Journal of andrology, 2003. **24**(1): p. 41-48.
102. Simpson, J.L., et al., *Klinefelter syndrome: expanding the phenotype and identifying new research directions.* 2003, Nature Publishing Group.
103. Visootsak, J. and J.M. Graham, *Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies.* Orphanet journal of rare diseases, 2006. **1**(1): p. 42.

104. Guttenbach, M., et al., *Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47, XXY Klinefelter's karyotype: a FISH analysis*. Human genetics, 1997. **99**(4): p. 474-477.
105. Hennebicq, S., et al., *Segregation of sex chromosomes in a klinefelter patient (47, xxy)*. Fertility and Sterility, 2000. **73**(4): p. S6.
106. Foresta, C., et al., *High incidence of sperm sex chromosomes aneuploidies in two patients with Klinefelter's syndrome*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1998. **83**(1): p. 203-205.
107. Sharland, M., et al., *A clinical study of Noonan syndrome*. Archives of disease in childhood, 1992. **67**(2): p. 178-183.
108. Pryor, J.L., et al., *Microdeletions in the Y chromosome of infertile men*. N Engl J Med, 1997. **336**(8): p. 534-9.
109. Blagosklonova, O., et al., *AZF α deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(9): p. 795-9.
110. Oates, R.D., *The genetic basis of male reproductive failure*. Urol Clin North Am, 2008. **35**(2): p. 257-70, ix.
111. Jarow, J.P., et al., *Effect of level of anastomosis and quality of intraepididymal sperm on the outcome of end-to-side epididymovasostomy*. Urology, 1997. **49**(4): p. 590-5.
112. Oates, R.D., et al., *Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa*. Hum Reprod, 1996. **11**(1): p. 133-8.
113. Kay, V.J. and D.S. Irvine, *Successful in-vitro fertilization pregnancy with spermatozoa from a patient with Kartagener's syndrome: case report*. Hum Reprod, 2000. **15**(1): p. 135-8.
114. Nieschlag, E., *Classification of andrological disorders*, in *Andrology*. 2001, Springer. p. 83-87.

115. Tomlinson, M., et al., *Infertility: Prognostic indicators for intrauterine insemination (IUI): Statistical model for IUI success*. Human Reproduction, 1996. **11**(9): p. 1892-1896.
116. Karabinus, D.S. and T.J. Gelety, *The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success*. Fertility and sterility, 1997. **67**(3): p. 536-541.
117. Palermo, G.D., et al. *ICSI: where we have been and where we are going*. in *Seminars in reproductive medicine*. 2009. © Thieme Medical Publishers.
118. Tsirigotis, M., et al., *Experience with subzonal insemination (SUZI) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on unfertilized aged human oocytes*. Journal of assisted reproduction and genetics, 1994. **11**(8): p. 389-394.
119. Shrivastav, P., et al., *Andrology: percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia*. Human reproduction, 1994. **9**(11): p. 2058-2061.
120. Pasqualotto, F.F., et al., *Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia*. The Journal of urology, 2002. **167**(4): p. 1753-1756.
121. Temple-Smith, P., et al., *Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis*. Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 1985. **2**(3): p. 119-122.
122. Nudell, D.M., et al., *The mini-micro-epididymal sperm aspiration for sperm retrieval: a study of urological outcomes*. Human reproduction (Oxford, England), 1998. **13**(5): p. 1260-1265.
123. Belker, A.M., et al., *Percutaneous testicular sperm aspiration: a convenient and effective office procedure to retrieve sperm for in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection*. The Journal of urology, 1998. **160**(6 Part 1): p. 2058-2062.
124. Ishikawa, T., *Surgical recovery of sperm in non-obstructive azoospermia*. Asian J Androl, 2012. **14**(1): p. 109-15.

125. Borges, E., Jr., et al., *Predictive factors of repeat sperm aspiration success*. Urology, 2010. **75**(1): p. 87-91.
126. Dardashti, K., R.H. Williams, and M. Goldstein, *Microsurgical testis biopsy: a novel technique for retrieval of testicular tissue*. J Urol, 2000. **163**(4): p. 1206-7.
127. Schlegel, P.N., *Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision*. Human reproduction, 1999. **14**(1): p. 131-135.
128. Schlegel, P.N., *Male infertility: evaluation and sperm retrieval*. Clin Obstet Gynecol, 2006. **49**(1): p. 55-72.
129. Ramasamy, R., N. Yagan, and P.N. Schlegel, *Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction*. Urology, 2005. **65**(6): p. 1190-4.
130. Ramasamy, R., et al., *High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction*. Fertility and sterility, 2009. **92**(2): p. 590-593.
131. Mitchell, V., et al., *Seminal plasma levels of anti-Müllerian hormone and inhibin B are not predictive of testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: a study of 139 men*. Fertility and sterility, 2010. **94**(6): p. 2147-2150.
132. Ferhi, K., et al., *Age as only predictive factor for successful sperm recovery in patients with Klinefelter's syndrome*. Andrologia, 2009. **41**(2): p. 84-87.
133. Seo, J.T. and W.J. Ko, *Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients*. International journal of andrology, 2001. **24**(5): p. 306-310.
134. Yang, Q., et al., *Follicle-stimulating hormone as a predictor for sperm retrieval rate in patients with nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis*. Asian journal of andrology, 2015. **17**(2): p. 281.

135. Mitchell, V., et al., *Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels*. International journal of andrology, 2011. **34**(4pt1): p. 299-305.
136. Tsujimura, A., et al., *Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study*. Human Reproduction, 2002. **17**(11): p. 2924-2929.
137. Okada, H., et al., *Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia*. J Urol, 2002. **168**(3): p. 1063-7.
138. Corona, G., et al., *Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2017. **23**(3): p. 265-275.
139. Ramasamy, R., et al., *Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome*. J Urol, 2009. **182**(3): p. 1108-13.
140. Bernie, A.M., R. Ramasamy, and P.N. Schlegel, *Predictive factors of successful microdissection testicular sperm extraction*. Basic Clin Androl, 2013. **23**: p. 5.
141. Elzanaty, S., *Varicocele repair in non-obstructive azoospermic men: diagnostic value of testicular biopsy - a meta-analysis*. Scand J Urol, 2014. **48**(6): p. 494-8.
142. Ando, M., et al., *Expression of VASA mRNA in testis as a significant predictor of sperm recovery by microdissection testicular sperm extraction in patient with nonobstructive azoospermia*. J Androl, 2012. **33**(4): p. 711-6.
143. Kleiman, S.E., et al., *CDY1 and BOULE transcripts assessed in the same biopsy as predictive markers for successful testicular sperm retrieval*. Fertil Steril, 2011. **95**(7): p. 2297-302, 2302.e1.
144. Kleiman, S.E., et al., *Expression of CDY1 may identify complete spermatogenesis*. Fertil Steril, 2001. **75**(1): p. 166-73.

145. Drabovich, A.P., et al., *Differential diagnosis of azoospermia with proteomic biomarkers ECM1 and TEX101 quantified in seminal plasma*. Sci Transl Med, 2013. **5**(212): p. 212ra160.
146. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Nucleic acids research, 2000. **28**(1): p. 27-30.
147. Masson, J.Y. and S.C. West, *The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(2): p. 131-6.
148. Dresser, M.E., et al., *DMC1 functions in a Saccharomyces cerevisiae meiotic pathway that is largely independent of the RAD51 pathway*. Genetics, 1997. **147**(2): p. 533-44.
149. Costabile, R.A., S. Skoog, and M. Radowich, *Testicular volume assessment in the adolescent with a varicocele*. J Urol, 1992. **147**(5): p. 1348-50.
150. Talas, H., O. Yaman, and K. Aydos, *Outcome of repeated micro-surgical testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia*. Asian J Androl, 2007. **9**(5): p. 668-73.
151. Schlegel, P.N., *Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision*. Hum Reprod, 1999. **14**(1): p. 131-5.
152. Friedler, S., et al., *Outcome of first and repeated testicular sperm extraction and ICSI in patients with non-obstructive azoospermia*. Hum Reprod, 2002. **17**(9): p. 2356-61.
153. Ferhi, K., et al., *Age as only predictive factor for successful sperm recovery in patients with Klinefelter's syndrome*. Andrologia, 2009. **41**(2): p. 84-7.
154. Ramasamy, R., et al., *High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction*. Fertil Steril, 2009. **92**(2): p. 590-3.
155. Yang, Q., et al., *Follicle-stimulating hormone as a predictor for sperm retrieval rate in patients with nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis*. Asian J Androl, 2015. **17**(2): p. 281-4.

156. Eken, A. and F. Gulec, *Microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE): Predictive value of preoperative hormonal levels and pathology in non-obstructive azoospermia*. Kaohsiung J Med Sci, 2018. **34**(2): p. 103-108.
157. Kalsi, J., et al., *In the era of micro-dissection sperm retrieval (m-TESE) is an isolated testicular biopsy necessary in the management of men with non-obstructive azoospermia?* BJU Int, 2012. **109**(3): p. 418-24.
158. Aydos, K., et al., *The effect of pure FSH administration in non-obstructive azoospermic men on testicular sperm retrieval*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. **108**(1): p. 54-8.
159. Aydos, K., et al., *Enzymatic digestion plus mechanical searching improves testicular sperm retrieval in non-obstructive azoospermia cases*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. **120**(1): p. 80-6.
160. Zheng, J., X. Huang, and C. Li, *[Predictive factors for successful sperm recovery in azoospermia patients]*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2000. **38**(5): p. 366-8.
161. Abdel Raheem, A., et al., *Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia*. BJU Int, 2013. **111**(3): p. 492-9.
162. Zampieri, N., et al., *Relationship between testicular sperm extraction and varicocelectomy in patients with varicocele and nonobstructive azoospermia*. Urology, 2013. **82**(1): p. 74-7.
163. Gokce, M.I., et al., *Effect of performing varicocelectomy before intracytoplasmic sperm injection on clinical outcomes in non-azoospermic males*. Int Urol Nephrol, 2013. **45**(2): p. 367-72.
164. Yaman, O., et al., *Results of microsurgical subinguinal varicocelectomy in children and adolescents*. Urology, 2006. **68**(2): p. 410-2.
165. Yukselten, Y., et al., *Investigation of CD133 and CD24 as candidate azoospermia markers and their relationship with spermatogenesis defects*. Gene, 2019. **706**: p. 211-221.

166. Aydos, O.S., et al., *ADAMTS1 and ADAMTS5 metalloproteases produced by Sertoli cells: a potential diagnostic marker in azoospermia*. Syst Biol Reprod Med, 2019. **65**(1): p. 29-38.
167. Aydos, S.E., et al., *Role of ADAMTS1 and ADAMTS5 in male infertility*. Andrologia, 2016. **48**(10): p. 1113-1119.
168. Hashemi, M.S., et al., *Among seven testis-specific molecular markers, SPEM1 appears to have a significant clinical value for prediction of sperm retrieval in azoospermic men*. Andrology, 2018. **6**(6): p. 890-895.
169. Heidargholizadeh, S., et al., *A differential cytokine expression profile before and after rFSH treatment in Sertoli cell cultures of men with nonobstructive azoospermia*. Andrologia, 2017. **49**(4).
170. Johnson, L., *Spermatogenesis and aging in the human*. J Androl, 1986. **7**(6): p. 331-54.
171. Foresta, C., et al., *Recombinant FSH in the treatment of oligozoospermia*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(5): p. 659-66.
172. Shiraishi, K., et al., *Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia*. Hum Reprod, 2012. **27**(2): p. 331-9.
173. Li, J., et al., *Mitochondrial- and Fas-L-mediated pathways involved in quineestrol induced spermatogenic apoptosis in adult rat testes*. Toxicol Mech Methods, 2014. **24**(9): p. 609-15.
174. Singh, V., et al., *Azoospermic infertility is associated with altered expression of DNA repair genes*. DNA Repair (Amst), 2019. **75**: p. 39-47.