

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**OLİGOASTENOSPERMİK İNFERTİL HASTALARDA VARİKOSEL
SAPTANAN VE VARİKOSEL SAPTANMAYAN GRUPLARIN
MİTOKONDRIAL DNA DELESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Faruk KUYUCU

DANIŞMAN

Doç. Dr. Arslan ARDIÇOĞLU

ELAZIĞ- 2006

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.

Dekan

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....

Üroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Danışman

Uzmanlık sınavı jüri üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Tıp ve uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin hazırlanması aşamasında her türlü destek ve yardımlarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Arslan ARDIÇOĞLU' a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince tüm desteklerinden dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Orhan YALÇIN, Doç. Dr. M. Kemal ATİKELER, Doç. Dr. İrfan ORHAN ve Yrd. Doç. Dr. Rahmi ONUR' a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması aşamasında bana yardımcı olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. Öğretim Üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE ve Dr. Ebru ETEM'e teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan Androloji laboratuvarı sorumlusu Abdulkadir DURSUN'a ve Taş Kırma Ünitesinde çalışan İlker ŞİNİK ve Nihan SERTKAYA'ya teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimi süresince beraber çalıştığım tüm üroloji Anabilim Dalı Asistanlarına, hemşirelerine ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Uzun eğitim maratonunda her zaman beni destekleyen, yardımını esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLolar LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR.....	VII
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi.....	5
3.2. Varikosel Patofizyolojisi.....	8
3.2.1 Etiyoloji.....	8
3.2.2. Patofizyoloji.....	10
3.3. Normal Sperm Hücresi.....	17
3.4. Sperm Motilite Bozukluğu.....	23
3.5. Erkek İnfertilitesinde Genetik Değerlendirme.....	27
3.6. Mitokondrial DNA.....	34
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
4.1. Hastaların Seçimi.....	37
4.1.1. Varikosel Tespit Edilen İnfertil Hastalar.....	37
4.1.2 Varikosel Tespit Edilmeyen İnfertil Hastalar.....	37
4.1.3. Kontrol Grubu.....	38
4.2. Deneyin Yapılışı.....	38
4.2.1. Kullanılan Solüsyon ve Gereçler.....	38
4.2.2. İzolasyon İşlemi.....	38
4.3. PCR Protokolü.....	39
4.3.1. Kullanılan Solüsyon ve Gereçler.....	39
4.3.2. PCR Kurulması İşlemi.....	42
4.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	42
5. BULGULAR.....	43
6. TARTIŞMA.....	47
7. KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	61

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1- Total mtDNA ve delesyonlarının belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.....	40
Tablo 2- İnsan spermatozooasının mtDNA'sında 4977, 7345 and 7599 bp'lik delesyonların tespitinde kullanılan primerler ve PZR sonrası elde edilen PZR ürün büyüklükleri.....	41
Tablo 3- V(+) ve V(-) gruplarda 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar.....	44

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil-1 Normal Spermatozoanın Şeması.....	18
Şekil-2 Sperm bağlantı parçası.....	19
Şekil-3. Y kromozomunun yüksek rezolüsyon bandlama ve haritalanması.....	30
Şekil-4 İnsan Mitokondrial DNA genomu.....	34
Şekil-5 L1-H1 ve L1-H2 primerleri kullanılarak total mtDNA varlığı	45
Şekil-6 Primer shift PCR kullanılarak 7345 ve7599 mtDNA delesyonlarının varlığı.....	46

KISALTMALAR

OXPHOS	: Oksidatif Fosforilasyon
MtDNA	: Mitokondial DNA
IVF	: İnvitro Ferlizasyon
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm İnjeksiyonu
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
HCG	: İnsan Korionik Gonadotropin
ASA	: Antisperm antikor
SCOS	: Sertoli cell-only sendromu
NO	: Nitrik Oksit
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ODF	: Outer Dense Fibers
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
FS	: Fibröz kılıf (Sheath)
DAZ	: Deleted in Azoospermia
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. ÖZET

İnfertilite, evli çiftlerin düzenli cinsel yaşamlarını sürdürmelerine ve doğum kontrolü uygulamalarına rağmen, en az bir yıllık süre içinde çocuk sahibi olamama durumudur. Evli çiftlerin yaklaşık %15'inde infertilite sorunu vardır. Bunların yaklaşık %50'sinde erkek faktörü rol oynamaktadır. Erkeğe bağlı infertilite nedenleri içinde en sık görülen varikoseldir. Varikosel semen parametrelerinde Oligozoospermi, Astenozoospermi, Teratozoospermi gibi bozukluklara neden olmaktadır. Mitokondri, hücrelerin enerji metabolizmasında önemli rol oynamakta, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile sağlanan enerji ile sperm hareket etmektedir. Mitokondial DNA (mtDNA) OXPHOS enzimatik kompleksinin bir kısım alt ünitelerini kodlamaktadır. Özellikle yüksek enerji ihtiyacı olan iskelet kası, böbrek, beyin, karaciğer ve germinal hücrelerin bazı hastalıklarında, mitokondial veya nükleer DNA kodlarındaki mutasyonlar saptanmıştır. Kao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mtDNA delesyonu ile insan sperm hareket azlığı ve infertilitenin ilişkili olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda Androloji polikliniğine infertilite nedeniyle başvuran, varikosel ile birlikte oligoastenospermi saptanan (n=20), varikosel saptanmayan hasta (n=20), mtDNA delesyon açısından normospermik kontrol grubu (n=20) ile karşılaştırılması amaçlandı. Varikosel tespit edilen oligoastenospermik grup ve kontrol grubu 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında, her iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p=0.009 ve p=0.019). Varikosel tespit edilmeyen oligoastenospermik grup ve kontrol grubu 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında da her iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0.011 ve p=0.009). V(+) ve V(-) gruplar 7345bp ve

7599bp'lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında ise sırasıyla her iki delesyon açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P=0.02$ ve $P=0.042$).

Çalışmamızda mtDNA delesyonlarının özelikle varikozel tespit edilmeyen oligoastenospermik infertil hastalarda daha sık olduğu bulunmuştur. Varikozel tespit edilen infertil grubunda da kontrolle karşılaştırıldığında bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, mtDNA delesyonu, Varikozel.

2. ABSTRACT

Investigation of Mitochondrial DNA in Oligoasthenospermic Infertile

Patients with and without Varicocele

Infertility is the inability of achieving pregnancy of couples having regular sexual activity without contraception in one year. Fifteen percent of the couples seek medical treatment for infertility. Male causes in infertility are found nearly 50% of the couples. The most common cause of male infertility is varicocele. Varicocele causes a decreased number of spermatozoa (oligozoospermia), decreased motility (asthenozoospermia) and many abnormal forms on morphological examination (teratozoospermia) in semen analysis. It is generally accepted that mitochondria play a key role in the energy metabolism as they contain the enzymes of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), which provides the energetic needs of the cells. Mitochondrial DNA (mtDNA) codes only some few subunits of the OXPHOS enzymatic complexes. Mutations of mitochondrial or nuclear DNA coding the subunits of mitochondrial machinery have been implicated in a variety of human diseases especially in the organs with a high demand for respiratory energy, like skeletal muscle, heart, kidney, brain, liver, and germinal tissue. Kao et al, demonstrated that mtDNA deletion was associated with diminished fertility and motility of human sperm and that the highest frequency of occurrence of the deletion coincided with reduced sperm motility.

In the present study we aimed to compare the mitochondrial deletion in the control fertile group (n=20) with the oligoasthenospermic infertile patients with varicocele (n=20) and without varicocele (n=20). After comparison of 7345bp and 7599bp deletions in the oligoasthenospermia group with varicocele and the

control group, a significant difference was revealed ($p=0,009$ and $p=0,019$). A significant difference was shown after comparison of 7345bp and 7599bp deletion between the oligoasthenospermia group without varicocele and the control group ($p=0,011$ and $p=0,009$). The comparison of 7345bp and 7599bp deletions between the oligoasthenospermia groups with and without varicocele showed a significant difference ($p=0,02$ and $p=0,042$).

In our study it was shown that mtDNA deletions are more common especially in the oligoasthenospermia group without varicocele. And after comparing the infertile oligoasthenospermia group with the control, it was shown that deletions were more commonly detected in the infertile varicocele group than the control group.

Key Words: Infertility, mtDNA deletions, Varicocele.

3. GİRİŞ

3.1 İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

Çiftlerin yaklaşık % 15'i korunmaksızın geçen düzgün bir cinsel hayata rağmen ilk bir yıl içerisinde çocuk sahibi olamamaktadırlar. Olguların % 20'sinde tek başına erkek faktörü sorumlu bulunurken, % 30-40'ın da ise hem kadın hem erkek faktörü birlikte görülür (1). Dolayısıyla infertil çiftlerin yarısından erkek faktörü sorumludur. Eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bozulma ile ortaya çıkar. Oysa sperm değerleri normal olsa da cinsel fonksiyon bozuklukları ya da penil deformiteler gibi sorunlar da infertilite nedeni olabilir. Ayrıca, spermin kalitatif bozuklukları da her zaman standart testlerle ortaya çıkarılamayabilir. Ortadan kaldırılması ile sağlıklı gebeliklerin elde edilebileceği bir çok çevresel faktör, değişik mekanizmalarla spermatozoanın kapasitesini ve neticede oosit ile etkileşimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Eğer semen analizindeki bozulmanın nedeni ortaya konamaz ise "idiyopatik infertilite" olarak tanımlanır. Özellikle kromatin hasarları, fertilizasyon ve embriyo gelişim bozukluğu durumları da son yıllarda üzerinde sık durulan konular arasındadır. Tedaviden yeterli sonuç alınabilmesi için, tanının iyi konması gerekir. Ayrıca, bazı azospermik erkeklerin testislerinde aktif spermatogenez odakları mevcut olup, tedavi ile sperm yapımı uyarılabilir. Tam değerlendirilmesi neticesinde, düzeltilemeyecek bir patolojiye sahip olduğunun anlaşılması, erkeğin gereksiz ve stres yaratacak uzun tedavi protokolleri içerisine girmesini önler. Böyle çiftler ejakülat spermi ya da epididim veya testislerden elde edilecek spermlerin, in vitro fertilizasyon (IVF) / intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI)'nda kullanılması ile çocuk sahibi olabilirler. Bütün bunlara ek olarak, altta yatan nedenin genetik olduğunun bilinmesi, doğacak çocuğun maruz

kalabileceği anomaliler hakkında ailenin önceden bilgilendirilmesi bakımından son derece önem taşır. Bütün bu nedenler sonucunda, infertilite olgularında erkeğin ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi çok önemlidir.

Fizik muayene, infertilite ile beraber bulunabilecek patolojileri ayırt etmeye yönelik yapılmalıdır. Hastanın yapısı ve virilizasyon tipi kaydedilmelidir. Sekonder seks karakterlerindeki anormallikler Klinefelter sendromundaki önükoid görünümde olduğu gibi, bir konjenital endokrin bozukluğun varlığını ortaya koyabilir. Temporal saç dökülmesinin ve yüzde ince kıvrıklıkların bulunmaması kazanılmış androjen yetmezliğine işaret edebilir. Skrotal organların muayenesi, kremasterik kasın gevşemesi için sıcak bir odada ve hasta ayaktayken yapılmalıdır. Kıvamım ve intratestiküler bir kitlenin varlığını ortaya koymak için testisler dikkatle palpe edilmelidir. Jinekomasti; gerek östrojen/androjen dengesizliği gerekse prolaktin yükselmesi için bir göstergedir. Situs inversus bulunması immotil silianın, dolayısıyla immotil spermin eşlik ettiği Kartagener sendromu olasılığı için şüphelendirir. Genital muayeneye özel dikkat gösterilmelidir. Penis; hipospadias ve ciddi penis eğriliği bakımından muayene edilmelidir. Testis volümünün büyük kısmını (~%80) seminifer tubüller ve germinal elemanlar oluşturduğu için, bu hücrelerin sayısındaki azalma tipik olarak testis volümünde azalma ya da testis atrofisi şeklinde belirecektir. Epididim dikkatle muayene edilerek baş, gövde ve kuyruğunun varlığı saptanmalıdır. Epididimde sertleşme ya da kistik dilatasyonların bulunması, epididimal obstrüksiyon olasılığını düşündürür.

Spermatik kordon muayene edilerek varikozel araştırılmalıdır. Grade I varikoseller sadece valsalva manevrası sırasında palpe edilebilirler. Grade II varikoseller hasta ayaktayken palpasyonla anlaşılabilir, grade III varikoseller

ise hem hasta ayaktayken palpe edilebilirler hem de skrotum cildi üzerinden görülebilirler. Spermatik kordonlar arasında valsalva manevrası sırasında daha belirgin hale gelen asimetri bulunması, varikoselin varlığına işaret eder. Aşırı kremasterik refleksi olan ya da testislerin yukarı pozisyonda bulunduğu hastalarda testisin hafifçe aşağı çekilmesi, valsalva manevrası sırasında spermatik kordonun daha doğru muayene edilmesini sağlar. Fizik muayene ile palpe edilemeyen subklinik varikosellerin tanısı için bir çok yöntem önerilmiştir. Venografi bazıları tarafından "altın standart" kabul edilerek, uzun yıllar boyunca kullanılmıştır. Oysa venografi invaziv ve komplikasyonları olan bir yöntemdir (2). Kateter ucunun pozisyonu, enjeksiyon basıncı ve değerlendirmeyi yapanın yargısı venografi sonuçlarını etkiler. Doppler stetoskop kullanılarak valsalva manevrası ile artan yoğun bir venöz akım sesinin saptanması, varikozel varlığına işaret eder (3). Gerek real time gerekse duplex skrotal ultrasonografi kullanılarak, skrotumda dilate olmuş spermatik venler görüntülenmektedir. En az bir tanesinin 3 mm'den geniş çapa sahip olduğu çok sayıda ven varlığının subklinik varikoseli belirttiğine inanılır (4). Oysa ultrasonda 3.5 mm'lik bir çap klinik varikozel için daha tanı koydurucudur (5).

Bütün bu teknikler çok sensitif olmakla birlikte, universal olarak kabul edilmiş bir "gold standart" tanı yöntemi üzerinde fikir birliğine varılmadığı sürece, spesifisitelerini belirlemek zordur. Böyle tanı metodlarının kullanılması ile, idiyopatik infertilitesi bulunan erkekler arasında %91'e varan oranlarda subklinik varikozel bulunduğu ortaya konmuştur. Bilateral varikozel ise %58'e varan oranlarda gösterilmiştir, oysa sadece klinik muayene yapıldığında hastaların yalnızca %10'unda bilateral varikozel saptanabilmektedir (6).

3.2 Varikoselin Patofizyolojisi

Varikosel, pleksus pampiniformisin patolojik dilatasyonu şeklinde tanımlanmaktadır (7). Varikosel sözcüğü ise, ilk kez 1843'de Curling tarafından "pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu" tanımına karşılık olarak kullanılmaya başlanmıştır (8).

Varikosel, erişkin erkek popülasyonunun % 15-22'sini etkileyen bir fiziksel anomalidir (9,10). İnfertilite araştırması nedeniyle başvuranların ortalama % 30-40'ında varikosel saptanmaktadır (11,12). Anormal semen analizi olan infertil erkeklerin de % 25'inde varikoselin bulunduğu bildirilmektedir (13). Anormal semen parametrelerine sahip erkeklerin % 25.4, normal semen parametrelerine sahip erkeklerin % 11.7'sinde varikoselin bulunduğu bildirilmiştir (14). Sekonder infertilite nedeniyle başvuran olgularda, varikosel görülme sıklığı artarak % 69-81 oranına ulaşmaktadır (15,16). Bununla birlikte, varikosele sahip olguların % 80'inde infertilite bulunmamaktadır (17).

3.2.1 Etiyoloji

Varikoselin etiyolojisi tartışmalı olmasına karşın; anatomik değişkenlikler, doğumsal ve/veya edinsel valv disfonksiyonuna ikincil gelişen venöz reflü ve venöz obstrüksiyon gibi değişik teoriler ileri sürülmektedir. Varikosel nedenleri arasında kabul görmüş 3 teori bulunmaktadır (18).

1- Sağ ve sol testiküler venler arasında anatomik farklılıklar: Sağ testiküler venin vena kava inferiora oblik, buna karşılık sol testiküler venin sol renal vene direkt dik açı ile açılması. Bu farklı açılımın solda hidrostatik basınç artışı ile sonuçlanması ve dolayısıyla pampiniform pleksusa iletilen basıncın venlerde dilatasyon ve tortuoziteye yol açması.

2- Venöz kanın reflüsü ile sonuçlanan kompetan venöz valvlerin olmayışı:

Varikoselli erkeklerde yapılan anatomik diseksiyon çalışmaları, sol renal ven ve internal spermatic ven birleşim düzeyinde valv bulunmadığını göstermiştir (19). Ek olarak, retrograd venografik çalışmalarla da valvlerin bulunmadığı veya yetersiz olduğu saptanmıştır (20,21). Bir başka çalışmada, varikoseli olan 659 erkeğin venografik paternleri incelendiğinde % 73'ünde venöz valvlerin yokluğu gösterilmiştir (22). Ancak, yeterli valv sistemine sahip hastalarda da % 26.2 oranında varikosel görülebilmektedir. Bazı otörlere göre valvlerin yokluğu varikosel gelişimine katkıda bulunmaktadır, ancak altta yatan neden değildir (22,23). Diğer anatomik çalışmalar ise, valvleri saptamada tamamıyla başarısız olmuşlardır (24,25).

3- Sol renal venin aorta ve superior mezenterik arter arasında kompresyonuna bağlı olarak testiküler venin parsiyel obstrüksiyonu (nutcracker fenomeni):

Testis venöz drenajının kompresyonudur. Sonuçta, kollateral drenaj gelişimi, venöz basınç artışı ve staz oluşmaktadır. Venografik çalışmalarda varikosel patogeneze katkıda bulunan 2 tip "nutcracker fenomeni" bulunur:

a- Proksimal (Klasik): Aorta anterioru ve superior mezenterik arter posteriorunda uzanan sol renal ven. İki arter arasındaki açığı venin kompresyonu ile sonuçlanır (insidans: % 0.7).

b- Distal: Sol common iliyak arterin kompresyonuna sekonder olarak sol common iliyak venin kompresyonu (insidans: % 0.5) (22).

Ayrıca, varikosel gelişiminde embriyolojik faktörlerin de rol oynadığı (ontojenik temel) ileri sürülmektedir. Buna göre, gelişim sırasında sol taraftaki vasküler yapılar daha plastik özelliğe sahiptir (22). Sağ ve solun drenajında

farklılığa yol açan bu durum, sol tarafın daha zayıf drenajına ve dolayısıyla embriyogenez sırasında kollateral damarların açık kalmasını sağlayarak yüksek oranda venöz anomaliye yol açmaktadır.

3.2.2 Patofizyoloji

Varikoselin hem hayvanlarda (26,27) hem de insanlarda (28) progresif ve zamanla artan testis hasarına yol açtığı bilinmektedir. Varikoselin fertilité üzerine etkilerini irdeleyen Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yaptığı bir çalışmada, varikoselin semen anomalileri (sayı ve motilitede bozulma), testiküler volümde azalma ve Leydig hücre fonksiyonunda azalmayla ilgili olduğunu açıkça vurgulanmaktadır (14). Ayrıca bu çalışmada, varikozel boyutu ile sperm sayısında azalma oranı arasında direkt bir ilişki olduğu bildirilmektedir (14).

Mevcut verilere göre, varikozel patofizyolojisinde sayılabilecek olası hipotezler arasında; hipertermi, testiküler kan akımı değişiklikleri ve venöz basınç değişiklikleri, renal/adrenal ürünlerin reflüsü, nutrisyon değişimi veya interstisyel sıvı formasyonunda değişiklik ile sonuçlanan testiküler kan damarı değişiklikleri, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyon defekti ve oksidatif stres bulunmaktadır (29).

1. Testiküler Kan Akımı

Varikoselin vasküler bir olay olması, patofizyolojisinin aydınlatılmasında damara yönelik pek çok çalışmanın yapılmasına yol açmıştır. Deneysel hayvan çalışmalarında, varikozel ve testiküler kan akımı değişiklikleri konusunda çelişik sonuçlar bulunmaktadır. Tek taraflı varikozel varlığında iki taraflı testiküler kan akımı artışını gösteren Turner ve arkadaşlarının çalışmalarına koşut olarak (30), erişkin ratlarda aynı bulguları saptayan ve varikozektomiye izleyen kısa ve uzun dönemlerde kan akımının normale döndüğünü bildiren çalışmalar da vardır

(31,32). Tek taraflı patolojinin neden iki taraflı etki yaptığı henüz tam olarak bilinmemesine karşın, nöral veya hormonal faktörlerin rol oynadığı ileri sürülmektedir. Ancak, Hurt ve arkadaşları, sol varikosel varlığında sol testisin çıkarılmasına rağmen sağdaki kan akımının halen yüksek olmasının, hormonal sinyallerle açıklanamayacağını bildirmektedirler (32). Buna karşın, sol spermatik vendeki nöral/nöral olmayan 'feedback' mekanizmaları veya baro/gerilme reseptörlerinin rolü üzerinde durulmuş, ancak konu açıklığa kavuşturulamamıştır. Yukarıdaki bulguların tam aksine, Varikoselin testiküler kan akımında azalmaya yol açtığını bildiren çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Nitekim Li ve arkadaşları, sol renal venin parsiyel ligasyonu ile oluşturdukları deneysel varikosel modelinde kan akımının azaldığını göstermişlerdir (33). Primatlarda yapılan bir çalışmada da benzer bulgulara rastlanmış ve iki yıldan sonra kan akımının normale döndüğü ileri sürülmüştür (26). Bu farklı sonuçların, oluşturulan modelin süresi veya ölçüm yöntemindeki farklılıklara bağlı olabileceği bildirilmektedir.

Hayvanların aksine insanlarda yapılan çalışma sonuçları daha net gibi gözükmemektedir. Renkli Doppler ultrasonografi çalışmalarında varikoseli olmayan kontrollere göre varikoseli olanlarda kan akımında anlamlı farklılıklar olduğu gösterilmiştir (34).

2. Hipertermi

Varikosele ikincil olarak gelişen testiküler işlev değişikliği için en yaygın kabul gören mekanizmadır. Skrotal ısıyı 2 termoregülatör sistem düzenlemektedir: a- Skrotumun kendisi: Bu bölgedeki ince ciltte subkütan yağ doku bulunmaz ve dartos kası tarafından kontrol edilen yüzey alanı değişken olarak kalır.

b- 'Countercurrent' ısı sistemi: İlk kez 1959'da tanımlanmıştır (35). Spermatik kordon içindeki pampiniform pleksus, arteriyel ve venöz kan arasında 'countercurrent' ısı değişim sistemini sağlamaktadır. Arteriyel kan testise girerken soğutulmakta ve testisin düşük ısını sağlanmaktadır. Bu ısı değişim sistemi, yalnızca venöz kan ısısının testise giren arteriyel kandan daha az olduğunda çalışabilmektedir (36). Yani, testise girecek olan spermatik arter kanının ısı testisten çıkan ve pleksus pampiniformisi oluşturan venöz kan tarafından soğutulmaktadır. Varikoselin bu normal mekanizmayı bozduğuna inanılmaktadır. Varikosel ve intratestiküler ısı artışı arasındaki ilişki ilk kez 1971'de gösterilmiş ve tek taraflı lezyonun iki taraflı etki oluşturduğu bildirilmiştir (37). Taşınabilir küçük dijital veri kaydedici ile skrotal ısının 24 saat sürekli kaydedilebildiği bir çalışmada, varikoseli olan infertil erkeklerin skrotal ısısının normal fertil erkeklerden hafif yüksek olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, bu bulguların aksine, varikoseli olan ve olmayan infertil erkeklerde skrotal ısı arasında fark olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (10). Artmış intratestiküler ısının hangi mekanizma ile spermatogenezi bozduğu tam olarak bilinmemektedir. Seminifer tübül ve/veya Leydig hücre düzeyinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde direkt termal hasar sonucu spermatogenezin etkilendiğinden kuşulanılmaktadır (38,39). Ancak, kısa dönemde Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunun bozulmadığı düşünülmektedir (40). Olası bir diğer mekanizma, DNA polimeraz aktivitesinde azalmadır. Varikosel ve skrotal hipertermi arasındaki direkt ilişki tartışmalı gibi gözükse de, gerek hayvan modelleri gerekse insanlarda varikosel varlığında, intratestiküler ısının arttığı çalışmalarda açıkça gösterilmiştir. Bu gözlemi destekleyen en önemli bulgu da, varikosel onarımı sonrasında intratestiküler ısının normale dönmesidir.

3. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi

Testiküler interstisyel sıvı; testiküler hücreler ve dolaşım arasında endokrin etkileşimi ve hücreler arasındaki parakrin mekanizmaları düzenler. Bu sıvının oluşumu, testiküler kapillerlerin kan akımı ve geçirgenliği tarafından belirlenir. Varikosele bağlı internal spermatik venede gelişen hidrostatik basınç artışı, testiküler kapiller ve vasküler geçirgenlikte değişiklik, dolayısıyla testiküler interstisyel sıvı oluşumunda değişikliğe yol açar. Yapılan çalışmalarda, deneysel varikozel oluşumundan sonra 30 gün içinde interstisyel sıvı oluşumunda artış olduğu gösterilmiştir (41). Seminifer tübülü ve interstisyel dokudaki hücreleri saran bu sıvı, testis ve testis vaskülaritesi ile bağlantılıdır. Testiküler interstisyel sıvı oluşumunu kontrol eden faktörler ve bu faktörlerdeki değişiklikler, testis işlevinde önemli rol oynamaktadır. Bu faktörlerden birisi de, testis kapillerlerinin vasküler geçirgenliği olabilir (42). Kan damarlarında polimorfonükleer hücre birikiminin, venöz hidrostatik basınç artışı ile gelişen vasküler geçirgenliğe ikincil ödeme bağlı olduğu düşünülmektedir.

4. Venöz Basınç

Varikozel ve venöz basınç değişiklikleri arasındaki ilişki de yıllardır tartışılan patofizyolojik mekanizmalardan birisidir. Varikosele ikincil olarak gelişen venöz basınç artışı testis kan akımını etkileyebilmektedir (43,44). Venöz akımın kollaterallerinin ligasyonu ve pampiniform pleksus distalindeki ana venöz akımın kısmi oklüzyonuna bağlı olarak, venöz basınçta % 90'ın üzerindeki artış postkapiller venüllere iletilmektedir. Kronik prekapiller vazokonstriksiyon testisin beslenme kaynağına olumsuz bir etkide bulunabilir ve dolayısıyla spermatogenez bozabilir. Ayrıca artmış venöz basınç, intratestiküler onkotik ve hidrostatik basınçlarda değişikliğe neden olabilir; önemli hormonlar için parakrin ve taşıma

ortamını değiştirebilir; mikrovasküler sıvı değişimini bozabilir. Örneğin, varikosel oluşturulmuş ratlarda kontrol grubuna göre adenin nükleotid konsantrasyonunun azalması ve NAD-sitokrom-c redüktaz aktivitesinin düşmesi gibi bu varsayımları güçlendiren bulgular literatürde bulunmaktadır (45,46). Bu çalışmalar, varikosel oluşturulmuş testiste, enerji metabolizması ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda defekt olduğunu göstermektedir. İnsanlarda, skrotumun anterolateral yüzünden pampiniform pleksusa manometre iliştirilmiş iğne ile girilerek, spermatik kordon venlerindeki normal istirahat venöz basınçları ölçülmüştür (47). Buna göre, varikoseli olanlarda olmayanlara göre pampiniformis pleksus venöz basıncı istirahatte ortalama 19.7 mmHg, valsalva ile ortalama 22 mmHg. daha yüksek çıkmaktadır. Ancak, bu çalışmada varikoselli 32 olgunun 18'inde semen parametreleri normal bulunmuştur (47).

5. Renal-Adrenal Reflü

Erkeklerin yaklasik % 50'sinde sol spermatik vende retrograd akımın olduğu bildirilmektedir (48). Aynca, venografik çalışmalarda venöz reflüdeki artış belgelenmiştir (21). Bu durum, varikoselli hastalarda böbrek ve adrenalenden katekolaminler, prostoglandin E ve F gibi metabolitlerin yuksek konsantrasyonda reflüsüne yol açmaktadır. Başlangıçta görülen kronik testiküler vazokonstriksiyon, zamanla testikuler fonksiyonu etkileyebilmektedir. Varikosel cerrahisi sırasında, testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan kandaki katekolamin düzeyi periferik venlerden alınanlardan 3 kat fazla iken, kontrol grubunda 1.5 kat fazla bulunmustur (49). Venlerdeki bu artımış, katekolamin, 'countercurrent' değişim sistemi yoluyla pleksus pampiniformis düzeyinde testiküler arterlere geçerek, arterlerdeki noradrenalin düzeyini artırmakta ve

arteriyollerde buna bağlı oluşan vazokonstriksiyon, testikuler hipoksiye katkıda bulunmaktadır.

6. Hormonal Disfonksiyon

Varikoseli olan infertil olgularda, serum testosteron konsantrasyonunda azalma olduęu dūřuncesi, varikoselin Leydig hūcre fonksiyonunu bozduęunu ve buna baęlı olarak testosteron üretiminde azalmaya sebep olduęu varsayımına yol aęmıřtır. Rat modelinde spermatogenezin sūrdūrūlebilmesi için en az 20 ng/ml. intratestikiiler testosteron konsantrasyonu gerektięi ancak varikosel modelinde serum testosteron konsantrasyonunda etkilenme olmaksızın intratestikūler testosteronda belirgin azalma olduęu bildirilmiřtir (50). Kazama ve arkadaşlarının yaptıęı bir çalıřmada, kontrol grubuyla karřılařtırıldıęında, varikoseli olanlarda dolařan serum serbest testosteron dūzeyinin daha dūřuk, östradiol ve steroid baęlayıcı globulin dūzeylerinin daha yūksək olduęu saptanmıřtır . HCG'ye testosteron yanıtının deęerlendirildięi çalıřmanın verilerine göre varikosel, HCG'ye testosteronun erken yanıtını (1-4 saat) azaltabilmektedir (51).

7. Otoimmunitė

Kan-testis bariyerinin bozulmasının antisperm antikor (ASA) üretimini sağladığına inanılır. Olası etiyolojiler arasında; testis torsiyonu, duktal obstrūksiyon, epididimit, prostatit ve testis travması yanı sıra varikosel de bulunmaktadır (52). Varikoselin hangi mekanizmayla kan-testis bariyerini bozmadan ASA'ları uyardığı bilinmemektedir (53). Hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan varikosel modelinde, sham ve opere edilmeyen ratlara göre varikosel oluşturulan ratlarda daha yūksək dūzeyde ASA birikimi olduğu gösterilmiştir (54).

8. Akrozom Reaksiyonu

Varikoselde, sperm sayı ve morfolojisinden daha çok sperm fonksiyonunda bir defekt olduğu ve bunun da daha çok zona pellusidaya bağlanma sırasındaki akrozom reaksiyonunda olduğunu düşünen araştırmacılar bulunmaktadır (55,56). Varikozel ve akrozom reaksiyonu arasındaki ilişkiyi araştıran hayvan çalışması bulunmamaktadır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, varikozel varlığında mannoz ligand reseptörleri fertil donörlerle eşdeğer ekspresyon göstermektedir. Ancak, mannoz tedavisine karşılık spermatozoa akrozom reaksiyonunu gerçekleştirememekte ve zona pellusidayı penetre edememektedir (57).

Ayrıca, varikozel olan hastalarda akrozom reaksiyonunu olumsuz etkileyen önemli sperm plazma proteinlerinin ekspresyonunda, nitelik ve nicelik olarak moleküler farklılıklar, fertilité üzerine değişken etki gösterebilir.

9. Oksidatif Stres

Normal sağlıklı bireylerde seminal plazma, aşırı reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminin etkisini nötrale eden doğal çöpçü veya antioksidanlar içerir. Ancak, patolojik koşullarda ROT üretimi antioksidan kapasiteyi aşan artmış oksidatif strese neden olur (58-60). ROT, sperm baş ve mid-piece kısmındaki poliunsaturated yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu sonucunda defektif sperm fonksiyonuna neden olabilir, sperm morfolojisini bozabilir, sperm motilitesinde azalmaya yol açabilir ve yetersiz sperm-oosit birleşmesine yol açabilir (61,62). Ayrıca, sperm DNA hasarına neden olabilir.

Varikozeli olan hastalarda ROT'un azalmış fertilitéyle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Varikozeli olan fertil veya infertil erkeklerin semen örneklerinin değerlendirilmesinde, varikozeli olanlarda olmayanlara göre daha yüksek

konsantrasyonlarda ROT bulunduğu bildirilmiştir (63). İnfertil varikoselli olguların % 80'inde artmış ROT konsantrasyonu saptanmasına karşın, bu durum varikoseli olan fertil hastaların % 77'sinde, varikoseli olmayan fertil bireylerin %20'sinde bulunmaktadır.

10. Apoptozis

Spermatogonia, spermatosit ve spermatid olmak üzere her 3 tip germ hücresi de apoptozis tarafından olumsuz şekilde etkilenebilmektedir (64). Ayrıca, normal hücrelerde bulunmayan endotelial nitrik oksit sentetazın (eNOS), apoptotik germ hücrelerinde varlığı bildirilmektedir (65). Bu gözlem, varikoseldeki germ hücre apoptozisinde nitrik oksit (NO) ve eNOS'ın rolü olabileceğini düşündürmektedir.

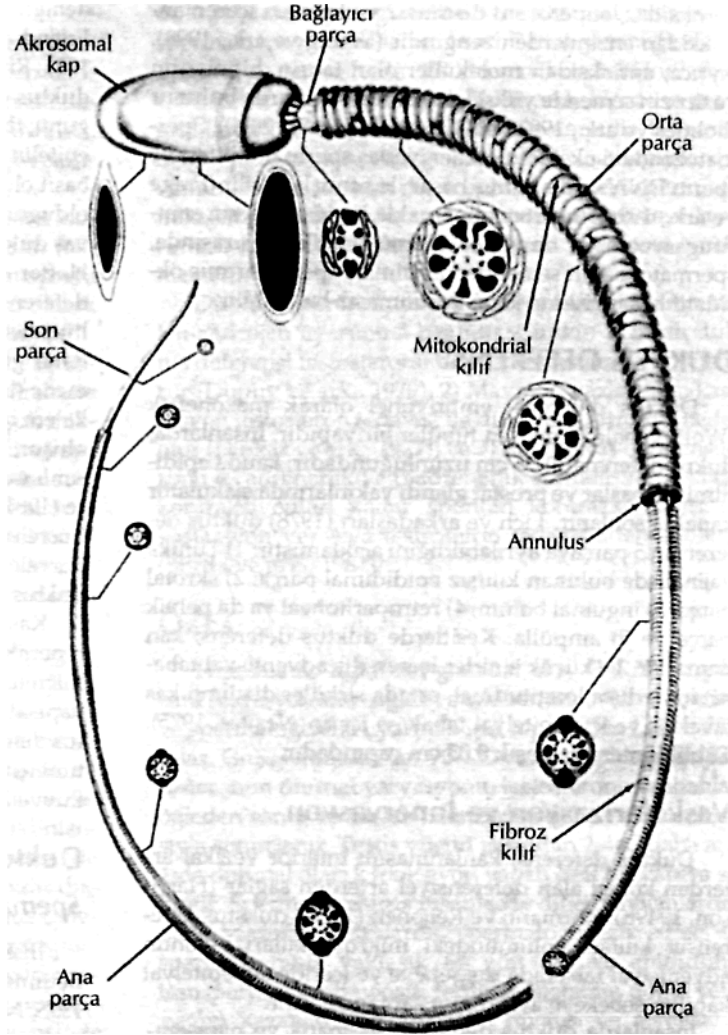
Son zamanlarda, varikoseli olan hastalarda oligospermi gelişiminde apoptozisin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Toplam germ hücre başıma her büyütme sahasındaki ortalama apoptotik hücre yüzdesinin değerlendirildiği çalışmada, varikosel için % 14.7, kontrol grubu için % 2 oranı verilmektedir. Varikoseli olan hastaların ejaküle edilen spermlerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, sperm hücreleri % 10'a kadar apoptotik iken kontrol grubunda bu oran % 0.1 bulunmuştur (66). Varikosel ve apoptozis arasındaki ilişki 3 olay nedeniyle birliktelik göstermektedir: Bunlar "heat stress" (ısı etkisi), androjen yoksunluğu ve toksik uyarıdır (67).

3.3. Normal Sperm Hücresi

İnsanda sperm ortalama 60 um. uzunluğundadır. Sperm kuyruğu 4 parçadan oluşur

1.Sperm bağlantı parçası (Connecting piece)

- 2.Orta bölüm (Middle piece)
- 3.Esas parça (Principal piece)
- 4.Son parça (Terminal piece)



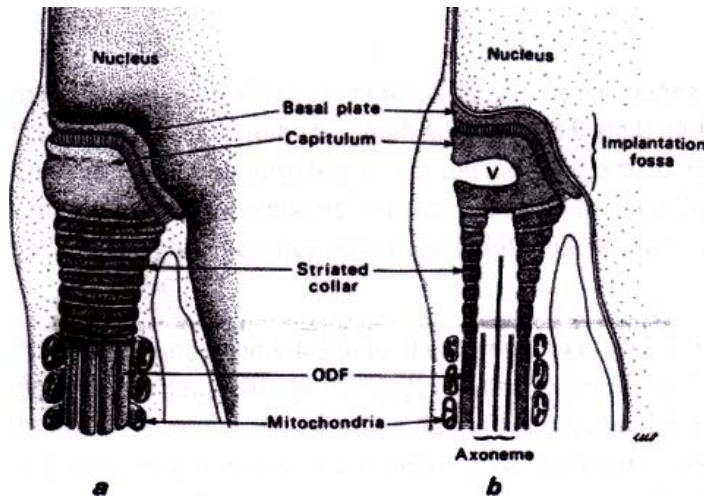
Şekil 1-Normal Spermatozoanın Şeması

(Şekil Fawsett DW: The mammalian spermatozoon. Dev Biol 44: 394-436.

1975'den değiştirilerek alınmıştır.)

Sperm bağlantı parçası (Connecting piece):

Sperm başı ile kuyruğu arasındaki kısa parçayı oluşturur (Şekil 2). Bölünmüş kolonlar ve yoğun fibröz yapıdan oluşmaktadır. Kapitulum ve sperm başının kaudalindeki bazal tabaka sperm başı ile kuyruğu arasında yer alır. Kapitulum distalinde çizgili yapı (striated collar) ile devam eder ve daha sonra orta parçada dış yoğun lifler "outer dense fibers" (ODF) ile sürer. Aynı yapı aksonemi de sarar. Sperm başı ile kuyruğu arasında devamlılığı bağlantı parçası denen yapı sağlar. Kapitulumdan geriye doğru uzanan dokuz adet parçalı kolon, flagelluma yoğun lif yapıları ile bağlanmaktadır (68). Böylece bağlantı parçası da dış lifler sayesinde devamlılık göstermektedir.



Şekil-2 Sperm bağlantı parçası.

(Şekil, Kadioğlu A, Çayan S, Orhan İ. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. Türk Androloji Derneği 20; 264-282 2004'den alınmıştır.)

Orta bölüm (Midpiece):

Aksonem boyunca yer alan 9 adet ODF'nin her biri, mikrotübüler doublet ile ilişkilidir. Bu bölümdeki mitokondriyal yapı helikal düzenlenmiştir ve enerji için gerekli yapıdır, iç mitokondriyal membran enerji üretiminden sorumludur ve flagella motiliteden sorumludur. Bu yapının, proksimalden distale doğru gittikçe çapı azalır. Distalde orta parça ile esas parçayı birleştiren annulus ile sonlanır.

Son parça (Terminal piece):

ODF ve fibröz sheath (kılıf) yoktur, sadece 9+2 aksonemal yapı mevcuttur.

Aksonemal yapı distale doğru:

1. Dynein kolların kaybı
2. Santral mikrotübüllerin kaybı
3. Mikrotübüler doublet'lerin ayrılması
4. B mikrotübül subunitlerin kaybolması ile şekillenir (69).

Bu yapılarda çinko kromatin stabilitesinde rol oynayarak, ODF yapısında yer alır (ODF yüksek sistin yapısına bağlı disülfid bağlan ile stabilize edilir) ve sistinin sülfidril gruplarına bağlanmasını sağlar. Yine sperm membranının stabilizasyonunda görev alır.

Aksonem

Flagellada hareketin oluşumunu sağlayan temel yapı aksonemdir ve 9+2 düzeninde mikro-tübüler ikililerden oluşur . Dışta 9 adet tubulin dimerlerinden oluşan A ve B alt lifler harekette rol oynar . Dıştaki 9 ikilinin her biri radyal uzantılarla santral mikrotübüle bağlanır. Santral mikrotübül doublet iki adet A alt

lifinden oluşmaktadır ve birbiriyle çapraz köprülerle bağlanmaktadır. Santral miktotübül ikilisinden aynı zamanda iç kılıf uzantıları çıkmaktadır (70).

ODF flagellumun % 60'nı oluşturur. 3-8 no'lu doublet kısa (6 µm), 2-4-7 no'lu doublet orta (17-21 µm), 1-5-6-9 nolu doublet uzun (31-35 µm) kolonlardır. ODF santralde medulla ve ince korteksten oluşur. ODF ve FS yoğun disülfid bağları nedeniyle iyonik deterjanlarla (Sodyum dodeayl sülfat) çözülmeye dirençlidir. Bu şekilde izolasyonu ve biokimyasal analizi daha kolaydır. Disülfid ile bağlantılar epididmal geçiş boyunca arttığı gözlenmiştir. Yine, Zn ODF proteinleri yapısındadır ve disülfid bağlantılarının düzenlenmesinde önemlidir (71).

Fibröz kılıf (Sheath) (FS):

3 adet protein (AKAP3-4, TAKAP-80), cAMP bağımlı protein kinaz (PKA) enzim aracılığıyla hücre sinyalizasyonunda rol oynar. 2 enzim (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz) fibröz kılıfta yer alır ve glikolitik yolda görev alırlar. FS, flagellar hareketin planında ve şeklini etkiler ve kıvrılma hareketinde yer alır. Ancak, in situ değerlendirilmesinde ve kuyruğa ait diğer komponentlerden ayrılmasında yaşanan güçlükler nedeniyle fonksiyonlarına ait deneysel kanıtlar yetersizdir. PKA, serin ve tirozin proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar ve kuyrukta lokalize proteinleri hedefler. Tirozin kinazda ise fosforilasyon için glikolitik yol önemlidir. PKA, cAMP için hedef ve ATP'den adenil siklaz yoluyla sentezlenen sekonder mesajcıdır (72).

Mitokondriyal kılıf:

Mitokondriyadan zengin kısım orta parçadadır. Helikal ve sıkı şekilde yerleşen mitokondriyaların etrafındaki kılıf yapısıdır. Kresentrik yapıları, duvarın belli bir

rijiditede olmasını sağlar. Selenyum eksikliğinde bu yapının bozuklukları tariflenmiştir. Spermatozodaki mitokondriya:

1. Hipotonik ortama
2. Yetersiz Ca²⁺ girişine direncine
3. Laktatı oksidatif substrat olarak kullanabilme yeteneği ile diğer mitokondriyalardan ayrılır.

Mikrotübül duvarı longitudinal ve lineer olarak yerleşir ve a ile p tübüler alt ünitlerden oluşur. Her bir tübül komplet A ve inkomplet (C şeklinde) 6 mikrotübüllerden oluşmaktadır (73). B tipler, A tip subünitlere neksinler sayesinde bağlanarak iletimi sağlar. Neksinler elastaz ile etkilenir. Flagellar bend (bükülme) açısını artırır. Flagellar beat frekansını azaltır. Aksonem, komşu mikrotübüler ikililerin B alt lifleri ile çapraz köprüler oluşturur ve ATP hidrolizi ile açığı çıkan enerji harekete dönüşerek etki eder. Hidrolitik ürünlerin açığa çıkması hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur (70).

Hücre hareketinden sorumlu enzimatik mekanizma ise iç ve dış kollarda yer almaktadır. Güç motoru: Flagella ve silya hareketini sağlayan itici güç kaynağı mikrotübüler ikililerin kollarındaki adenosin trifosfatazdır (Mg bağımlı). Kimyasal enerji kinetik enerjiye çevrilir, insan sperminin güç kollarında yüksek moleküler ağırlıklı ATP üniteleri dışında, değişik sayıda düşük moleküler ağırlıklı alt üniteler (tektin) de bulunmaktadır. Aksonem, komşu mikrotübüler ikililerin B altlifleri ile çapraz köprüler oluşturur ve ATP hidrolizi ile açığı çıkan enerji harekete dönüşerek etki eder. Hidrolitik ürünlerin açığa çıkması hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur.

Sitoplazmik droplet

Seminifer tübül tarafından salgılanan spermatozoa içinde küçük sitoplazmik kitledir. Lizozomal enzimlerden zengindir. Epididim boyunca sperm hareketi sırasında esas yerinden hareket ederek bağlantı parçasından orta parçanın sonuna doğru ilerler. Ejaklatta dropletlerin varlığı, ODF ve FS gibi yapıların eliminasyonuna bağlı epididimal fonksiyon bozuklumu ve fertilizasyonun azalması ile birliktelik gösterir.

3.4 Sperm Motilite Bozukluğu

Sperm motilite bozuklukları; sadece motiliteye ait bozukluklar (izole astenospermi) veya sperm sayısının ve morfolojisinin de birlikte bozulduğu (oligospermi ve teratospermi ile eşlik eden) astenospermi olmak üzere iki Şekilde görülür, izole astenospermi erkek infertil olguların yaklaşık % 24'ünde, diğer sayı ve morfoloji ile birlikte motilite bozuklukları ise % 55 oranında gözlenir (74). Sperm motilitesini değerlendirmek için semenin likefaksiyonundan sonra incelenmesi uygun olacaktır. Cinsel perhiz süresi en az 48 saat olmalıdır. Spermatozoanın epididimden geçiş süresi ortalama 11-12 gün civarındadır ve testislerden sperm üretimi arttıka epididimal geçiş süresi 3-5 güne dek kısalacaktır. Ancak testisten sperm üretimi azalmıŐsa epididimal geçiş süresi de 15 güne dek uzamaktadır ve epididimden geçiş süresi arttıka sperm motilitesi daha fazla bozulacaktır. Yapılan çalışmalarda sperm parametreleri normal olanlarda ilk ejakülat örneğinden 24 saat sonra alınan örneklere total motil sperm sayısı anlamlı olarak azılırken, tam tersine sayı ve motilite bozukluğu olan infertil erkeklerde 24 saat sonraki örneklere total sperm sayısında belirgin artış saėlanmıŐtır (75).

Özellikle ICSI uygulamalarından önce immotil sperm saptanan olgularda epididim ve diğer genital bez yapılara ait sperm motilitesi üzerine olumsuz etkiye sahip bazı maddelerin etkileri de bu şekilde en aza inecektir.

DFS (Dysplasia of Fibrous Sheath) "Stump Tail Syndrome"-Fibröz kılıfın displazisi:

- 1.Santral mikrotübül çiftin kaybı
- 2.Güç kollarının yokluğu
- 3.Dış yoğun liflerinden 3 ve 8'de anormal uzantılar olması
- 4.Orta parçalarda birleşme bozukluğu

Hipertrofi ve hiperplaziye bağlı fibröz yapılar sperm kuyruğunun kısa, kalın ve irregüler olmasına yol açar. Kuyruğun özel bir şekilde kısa ve kalın kalmasına bağlı güdük kuyruk sendromu (stump-tail) olarak da eski literatürde yer almıştır. Bu tip problemler geç spermiogenez döneminde gerçekleştiği için testiküler orijinlidir ve fibröz kılıftaki bozukluklar tüm spermatozoayı etkilediği için ciddi motilite sorunlarına yol açar (76). Aksonem yapısındaki fibröz kılıf yapısıyla beraber olan bozukluklar longitudinal kolonlarla transvers kolonlar arasındaki uyumu bozar. Bazılarında sadece santral ikilide (doublet) ve güç kollarında kayıp saptanırken, bazılarında 9+2 aksonemal yapı tamamen kaybolmaktadır.

İmmotil Silya Sendromu

Aksonemde yapısal bulgular:

1. İç ve dış güç kollarında kayıp
2. İç kollarında kayıp, dış kollarda kısalık

3. İç kollar, neksin bağlantıları ve radyal uzantılarda kayıp, mikrotübüler ikililerde bozulma
4. Dış güç kollarında kayıp
5. Radyal bağlantı ve bağlantı başlarında kayıp
6. Santral mikrotübüler ikililerin eksik veya defektif olması

Silia ve flagellalarda dynein kolları eksiktir, iç ve dış kollar yok ise, sperm hareketsiz kalacaktır. Ancak sadece dış kot yok ise sınırlı sperm hareketi vardır. Yine aksonemin aksesuar yapılarındaki bozukluklarda ise hareket kaybından çok, hareket bozuklukları gözlenir. Ancak bu tanıyı koyabilmek için çok sayıda kesitin elektron mikroskopik incelemesi gereklidir, ilk kez Kartagener tarafından 4 olguda situs inversus, bronşektazi ve kronik sinüzit tablosu ile tariflenmiştir. İmmotil silya sendromu saptanan olguların (sıklığı 1:20000) yaklaşık % 50 oranındaki bir grubu Kartagener sendromu tanısı alır. Otozomal resesif geçiş söz konusudur.

Non-spesifik flagellar anomali:

Astenospermi en sık bu tabloda gözlenir (motilite bozukluklarının % 70 oranında). Bazen aksonemal yapı normal olmakla beraber, kuyruktaki fonksiyon bozukluğuna bağlı astenospermi tanısı alan erkeklerde saptanabilir.

Protein karboksil metilaz eksikliği:

En çok testiste ve sperm kuyruğunda yoğun olarak bulunur. Spermatogenez sırasında enzimin düzeyi yükselir. Protein karboksil metilaz S-adenozilmetiyoninden proteinlerin karboksil gruplarına metal grupları taşır ve

calmodulin metilasyonunda rol oynar. Klinik olarak rutin protein karboksil metilaz ölçümünün değeri açık değildir.

Antisperm antikorlar

Ig G ve Ig A tipi sperm antijenlerine yapışan antikorlar, hücre içi enerji için gerekli kalsiyum, cAMP, ATP düzeylerinde olumsuz değişikliklere yol açarak sperm motilitesinde bozukluklara yol açabilir. Özellikle geçirilen infeksiyonlar, inguinal cerrahiler, testis travması ve tümörleri ile varikosele bağlı anti-sperm antikorların gelişimine yol açmaktadır.

Infeksiyon:

Erkeklerde genital infeksiyon tanısı için ürogenital infeksiyon öyküsü ve/veya olağan dışı rektal tuşe bulgusu, prostat sekretinde veya idrar örneğinde lökosit veya bakteri saptanması, semende lökosit sayısının 1×10^6 'ın üstünde olması, 2 kat dilüe seminal plazmada 10^3 /ml üstünde patojen veya 10^4 /ml'in üstünde non-patojen bakteri saptanması, aksesuar bezlerin sekresyonunda bozukluk bulgularından en az ikisinin var olması yeterlidir. Tanıda interlökin-6 düzeyinin araştırılması değerlidir, çünkü serbest oksijen radikalleri ile birlikte etkilenmesi ve korelasyonu gösterilmiştir. Burada sitokinlerin spermatozoa membranında lipidlerin peroksidasyonunu uyaran etkilerine bağlı ortamda serbest oksijen radikalleri bulunmaktadır. Serbest oksijen radikalleri semende polimorf nüveli lökositler ve anormal spermatozoadan kaynaklanır. Infeksiyona bağlı artan serbest oksijen radikalleri sperm motilitesini olumsuz etkilemektedir. Bu da hücre içi ATP konsantrasyonunun düşmesiyle aksonemal protein fosforilasyonunun azalması ve sonucunda sperm immobilizasyonuna bağlıdır. Serbest oksijen radikallerindeki bu artış aynı zamanda sperm nükleusunda DNA bütünlüğünü de bozmaktadır.

İnfeksiyonlar sonrası uygulanan antibiyoterapilerle sperm parametrelerinde artış gözlenirken, tedavi her zaman doğum oranlarını aynı şekilde etkilemez (77).

Sigara

Sigara içen infertil erkeklerle, sigara içmeyen infertil ve fertil erkekler arasındaki çalışmada sigaraya bağlı intrasitoplazmik artık artışı gözlenmektedir (78). Wong ve arkadaşları yaptıkları diğer çalışmada sigara içen erkeklerde infertilite probleminin daha sık rastlandığı ve sigaranın içinde saptanan kotin maddesinin kan ve seminal plazma miktarlarının ölçümü sonrası sperm parametrelerinin olumsuz etkilendiği bildirilmektedir (79).

Varikosel

Aşırı serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu sonrası hücresel hasara yol açmaktadır. Bunun sonucunda da sperm motilitesi azalmaktadır. Varikoselli erkeklerde lokal ve sistematik olarak serbest oksijen radikallerinde artış gösterilmiştir. Varikoselin tedavisi ile de motilite bozukluklarında düzelme kanıtlanmıştır (80,81).

3.5 Erkek İnfertilitesinde Genetik Değerlendirme

Tüm infertilite olgularının % 30-50'sinde erkek faktörü bulunduğu için erkek infertilitesi önemli bir tıbbi problem olarak kabul edilmektedir (82). Ancak erkeklerin % 30-40'ında anormal sperm üretim nedeni tam olarak ortaya konamamaktadır. Genetik değişkenliklerin ağır infertilite olgularının büyük kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir(83).

Spermatogenez hücre proliferasyonu, mayoz ve farklılaşmasını kapsayan uzun ve karmaşık bir işlevdir. Erkek germ hücre üretimi işlevinde yer alan çok sıkı kontrol

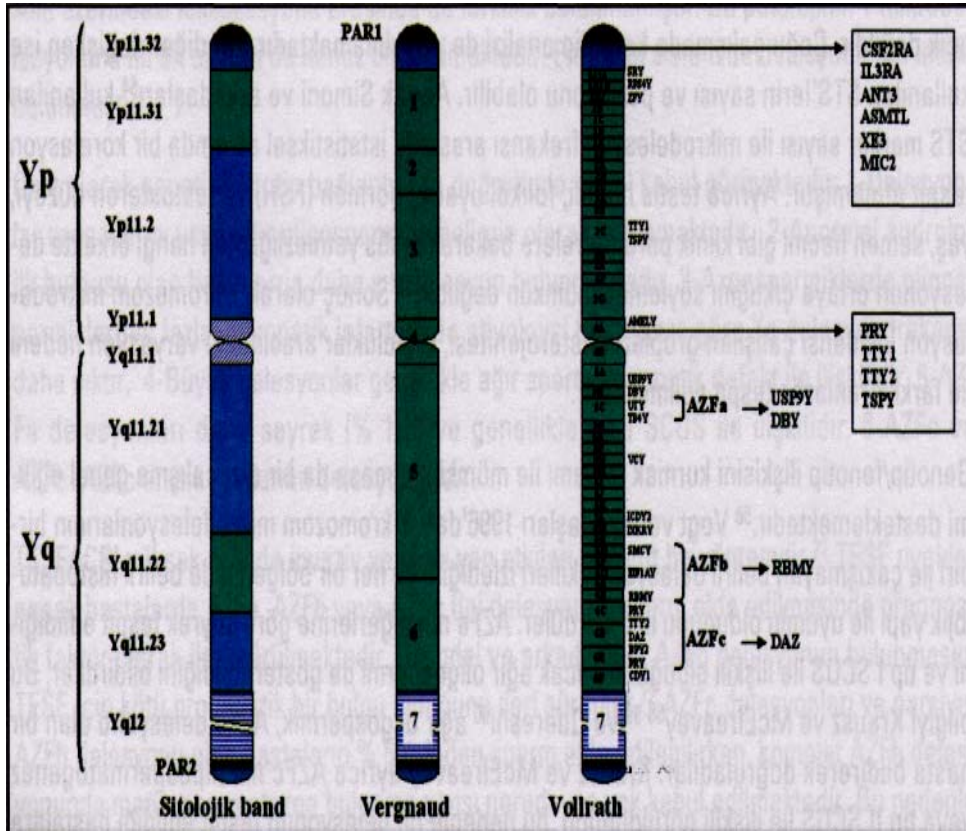
altındaki sinyal akışını etkileyen genetik değişiklikler bazen olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir, insanlarda erkek infertilitesine neden olan bir çok genetik etiyoloji tanımlanmıştır. Ayrıca teknoloji sayesinde fare modelinde spesifik bir genin delesyonu yaratılarak spermatogenezde rolü olan genlerin ayırt edilmesi sağlanabilmektedir. Ancak bu yeni genetik bulgular şiddetli erkek infertilitesinde kullanılan özellikle TESE ve ICSI gibi üremeye yardımcı tedavi yöntemleri uygulanması açısından dikkat çekicidir. Normalde transferi mümkün olmayan genetik yapıyı taşıyan ve doğal bariyerleri aşarak fertilizasyon yapamayacak defektif spermiler ICSI'de kullanılabilir. Bu nedenle erkek infertilitesi ile ilişkili genetik bozuklukların bilinmesi gerekmektedir. İnfertil ve subfertil erkeklerde kromozomal bozukluklar sık olarak bulunabilmektedir. Normal populasyonda % 0.5 civarında bulunan bu durum 9766 infertil erkeğin değerlendirildiği bir analizde % 5.8 civarında bu tip bir anomalinin bulunabileceği bildirilmiştir (83). Bu erkeklerin % 4.2'sinde seks kromozom anomalileri, % 1.5'inde otozomal kromozomal anomaliler saptanmıştır. Öte yandan 94.465 erkek yeni doğanda yapılan benzer bir analizde kromozomal anomali oranı % 0.38, seks kromozomal anomali oranı % 0.14, otozomal kromozomal anomali oranı ise % 0.25 bulunmuştur (84). Kromozomal anomaliler seks kromozom anomalileri veya otozomal kromozomal anomaliler yanında sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler olarak da alt gruplarda değerlendirilebilir. Sayısal anomaliler hücre başına düşen kromozom sayısında görülen deviasyonlardır. Poliploidi, kromozom sayısının katlı oranda arttığını ifade eder veya anöploidi bir veya daha fazla kromozomun kaybı veya fazlalığını ifade eder. Poliploidi genellikle yaşamla bağdaşmaz veya belli tip kanserlerde karakteristik olarak görülür. Anöploidi ise yaşamla bağdaşır, ancak klinik olarak ağırlığı hangi kromozomun etkilendiğine göre değişmektedir.

Yapısal kromozomal anomaliler bir veya daha fazla kromozomun delesyonunu veya duplikasyonunu içermektedir. Aynı zamanda kromozomal yeniden düzenlenme ve translokasyonları da içermektedir. Otozomal ve seks kromozomları bu tip düzensizliklerden etkilenmektedirler ve her iki durumda da erkek infertilitesi ile ilişkisi bulunabilmektedir. Karyotip değerlendirmesi sayısal ve yapısal kromozomal anomalileri saptamada faydalı bir yöntemdir. Özellikle ejakülatta 5 milyon/ml. altında sperm hücresi bulunan idiopatik infertil erkek hastaların yaklaşık % 7-13'ünde karyotip bozukluğu saptanmaktadır. Somatik karyotipi normal olan bazı hastaların da germ hücrelerinde bulunan kromozomal anöploidi çocukta potansiyel genetik problemlere neden olabilir. Bu konuda özelleşmiş laboratuvarlardan ejakülattaki spermlere floresan in situ hibridizasyon (FISH) yapılması istenebilir. Eğer numerik veya yapısal kromozomal anöploidi bulunursa prenatal genetik tanı için genetik danışma, amniosentez veya koryonik villus biyopsisi önerilmelidir (84,85).

Y Kromozom Mikrodelesyonları

1976'da Y kromozomdaki yapısal değişikliklerin erkek infertilitesinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (86). Artık Y kromozomunun uzun kolunun spermatogenez için gerekli olduğu ortaya konmuştur. Yq üzerinde 3 adet birbiri ile örtüşmeyen lokus veya bölge haritalanmıştır. Bu bölgeler AZFa (proksimal), AZFb (santral) ve AFZc (distal) olarak isimlendirilmektedir (Şekil 3) (87). AZFd isimli 4. bir bölge daha önerilmiş olmakla birlikte bu bölgeye ait henüz bir gen ailesi tanımlanmamıştır (88). Bu bölgeler olasılıkla spermatogenezin değişik safhaları için gerekli olan multipl genleri kapsamaktadır. AZFa lokusu için aday genler USP9Y (ubiquitin spesifik proteaz 9) ve DBY (dead box), AZFb için RBMY (RNA binding motif) ve AZFc için DAZ (deleted in azoospermia) genidir

(87,89,90). Bu bölgelerin delesyonu ağır oligospermi ile birlikte özellikle şiddetli azospermi ile ilgilidir ve sıklıkla DAZ genini de kapsamaktadır. Hasta seçim kriterlerine göre değişmekle birlikte obstrüktif olmayan azospermik erkeklerdeki Y mikrolelesyon insidensi % 8-18 arasında bildirilmektedir. Bu bölgede 30'dan fazla gen ve gen ailesi tanımlanmıştır (87). Birkaç genin spermatogenezde defektle ilişkisi ortaya konduysa da çoğu genin fonksiyonu bilinmemektedir.



Şekil-3. Y kromozomunun yüksek rezolüsyon bandlama ve haritalanması.

(Şekil, Kadioğlu A, Çayan S, Orhan İ. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. Türk Androloji Derneği 15; 193-216 2004'den değiştirilerek alınmıştır.)

En soldaki Y kromozomunun yüksek rezolüsyon 6TG bandlama ile ortaya çıkan görüntüsünü şematize etmektedir. Ortadaki resimde Vergnaud'un 1986'da Southern blotting yöntemi ile 7 intervale bölerek tanımladığı harita görülmektedir. Vollrath ise 1992'de tüm Y kromozomunu 43 subintervale bölmüştür. Şu anda en sık kullanılan harita budur. Ancak daha sonra Human Genome Project çerçevesinde Washington University ve Whitehead Institute liderliğinde 300'ün üzerinde sekans bölgesi (STS) jenere edilmiş ve haritalanmıştır. 1994'den beri Yq mikrolelesyonlarının azospermik ve oligospermiklerdeki oranlarını tespit etmek ve infertil fenotip ile delesyonun boyut ve pozisyonunu ilişkilendirmek için çeşitli kombinasyonlarda klinik ve moleküler çalışmalar yürütülmektedir. Bu tip bir bilginin edinilmesi özellikle tip II Sertoli cell-only sendromu (SCOS) veya ağır hipospermatogenez gösteren hastaların ICSI yöntemi aracılığı ile çocuk sahibi olabilmeleri ve bu genetik defekti erkek çocuklara geçirme riski açısından önem taşımaktadır.

Y kromozom mikrolelesyonları spermatogenetik yetmezliğin en sık sebeplerinden biridir (91). İdiyopatik azospermide % 15-20, idiyopatik oligospermide % 7-10 oranında rastlanmaktadır. Literatür genel olarak değerlendirildiğinde % 1 arasında değişen sıklıklara rastlamak olasıdır (92,93). Sonuç olarak Y kromozom mikrolelesyon insidensi çalışılan grupların heterojenitesi, topluluklar arasındaki varyasyon nedeni ile farklı oranlarda tespit edilmektedir.

Genotip/fenotip ilişkisini kurmak tamamı ile mümkün olmasa da bir dizi çalışma genel eğilimi desteklemektedir ve genotip/fenotip bağlantısı şu doğrultuda genel kabul görmektedir;

- 1-Delesyonlar azospermi veya ağır oligospermide belirgin olarak bulunmaktadır,
- 2-Anormal androlojik bulgusu olan hastalarda daha sık delesyon bulunmaktadır,
- 3-Azospermiklerde oligospermiklerden fazla, idiyopatik infertilitede etiyolojisi bilinenlere göre Yq delesyon frekansı daha sıktır,
- 4-Büyük delesyonlar genellikle ağır spermatogenetik defekt ile ilişkilidir,
- 5-AZFa delesyonları daha seyrek (% 1-5) ve genellikle tip I SCOS ile ilişkilidir,
- 6-AZFc ve AZFb+AZFc en sık rastlanan delesyonlardır (94).

TESE/ICSI yüksek oranda invaziv ve olası yan etkileri mevcut bir yöntemdir (95). TESE uygulanacak hastalarda AZFa, AZFb veya AZFc tipi delesyonlar sperm elde edilmesinde prognostik faktör olarak ileri sürülmektedir. Brandel ve arkadaşları, AZFb delesyonunun bulunmasını TESE için kötü prognostik bir bulgu olduğunu ileri sürdüler (96). AZFc delesyonları ve parsiyel AZFb delesyonu olan hastaların % 50'sinden sperm elde edilebilirken, komplet AZFb delesyonunda matür spermatozoa bulunma şansı neredeyse yok kabul edilmektedir. Bu nedenle Y mikrodelesyonunun pozisyonu ve büyüklüğü önem taşımaktadır. AZFc bölgesini içeren veya bu bölgeye uzanan delesyonlarda (AZFb+AZFc ve AZFa+AZFb+AZFc) testiküler spermatozoanın total yokluğu ile ilişkili bulunmuştur (97).

Normal fertillerde de Y kromozom mikrodelesyonları araştırılmıştır. Kent-First ve arkadaşları, 85 STS tarayarak yaptığı çalışmasında ilk grupta 200 fertilde hiç delesyon saptamamıştır (98). Sonraki 700 fertilde yapılan çalışmada 2 bireyde sY272,3 bireyde sY207 saptanmıştır (% 0.7). Pryor ve arkadaşları, 200 fertil erkeğin 4'ünde (% 2) distal AZFb kısmında delesyon saptamıştır (99). Kent-First ve arkadaşları, 920 fertilde yapılan çalışmalarında 8 kişide delesyon tespit etmiştir

(% 0.87) (100). Burada tespit edilen 4 STS'nin polimorfizm gösterdiği düşünülmüştür. Bunlar sY207, sY272 (delesyon interval 6'nın proksimali), sY269 (AZFc bölgesinde), Amelogenin-Y (p-kolunda)'dir. Çoğu çalışma Yq delesyonu olan erkeklerde tipik olarak en az 0.5-1 milyon baz çifti uzunluğunda DNA delesyonu olduğu yönündedir. Öte yandan 3 veya daha az sıralı STS'lere ait ultra-short delesyonların infertil kişilerde (% 3.5) ve fertil kişilerde (% 2.9) benzer bulunması, bu çok kısa Y kromozom delesyonlarının polimorfizm gösterdiğini ve infertilite sebebinden çok normal bir varyasyon olduğunu ifade etmektedir (99).

Seks Determining Region Y (SRY):

Bu gen testis determinasyonunda yer almaktadır (100,101). Bazı 46XY seks reversed dişilerde yetersiz veya SRY yokluğu bulunmaktadır (102). Bu hastaların sadece küçük bir oranında SRY bozukluğu bulunması nedeni ile başka etiyolojilerde ileri sürülmüştür (103). XY seks reversed dişilerde X'e bağlı seks reversed löküsün (SRVX) duplikasyonundan bahsedilmektedir (104). Gerçekte bazı seks reversed dişilerde SRVK'in 2 aktif kopyası bulunmaktadır.

Deleted in Azoospermia (DAZ):

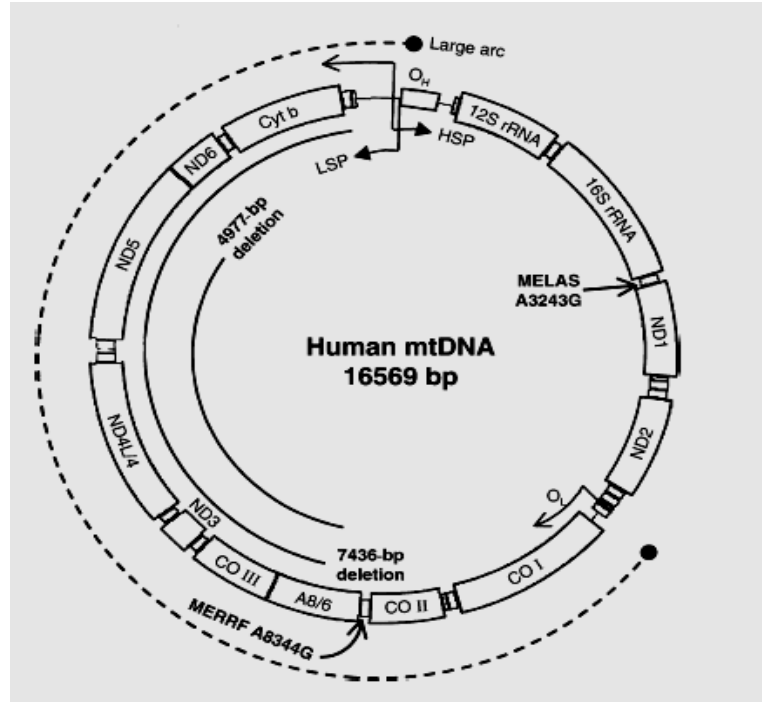
1995'de DAZ (deleted in azoospermia geni) Y kromozom üzerinde tanımlandı (90). Bu gen normal spermatogenezin tamamlanması için gerekli bir genidir. Bu geni içeren bölge azoospermik ve oligospermiklerde delesyone olarak bulunmaktadır. DAZ delesyonu bu iki infertil kategorideki hastanın değerlendirilmesinde göz önüne alınması gereken bir genidir. Y kromozomunda mikrodelesyon saptanan hastaların ejakülatlarında veya testislerinde birkaç sperm bulunabilir, bu spermler bu hastaların TESE-ICSI için aday olmalarına neden olabilir. Bu

spermlerle elde edilen gebeliklerde Y mikrodelesyon taşıyıcılığı bulunması ve sonraki jenerasyona transferi mümkündür.

Y Kromozom Mikrodelesyon Tanısında Testler:

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Y kromozom üzerindeki spesifik delesyonların tespit edilmesi için sık kullanılan bir yöntemdir (105). Laboratuvarlar arasında değişkenlik gösteren sekans bölgeleri bulunmaktadır ve bu nedenle inceleme spermatogenezle ilgili AZF bölgelerini kapsayan incelemeler yapılmalıdır. Multipleks PCR, pozitif ve negatif kontrollerle (normal erkek ve kadın DNA) değerlendirilmeli ve Y kromozomu için pozitif bir marker (genellikle SRY) kullanılmalıdır. Üremeye yardımcı tedavi yöntemleri planlanan bu hastalara genetik danışma verilmelidir

3.6. Mitokondrial DNA



Şekil-4 İnsan Mitokondrial DNA genomu

(Şekil Wei YH, Kao SH; Mithochondrial DNA Mutation and Depletion are Associated with Decline of Fertility and Motility of Human Sperm. Zoological Studies 39(1);1-12 2000 ‘den değiştirilerek alınmıştır.)

Mitokondria, eukaryot hücrelerin enerji metabolizmasında önemli rol oynamakta, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile sağlanan enerji ile sperm hareket etmektedir. Mitokondial DNA (mtDNA) OXPHOS enzimatik kompleksinin bir kısım alt ünitelerini kodlamaktadır(106). Özellikle yüksek enerji ihtiyacı olan iskelet kası, böbrek, beyin, karaciğer ve germinal hücrelerin bazı hastalıklarında, mitokondial veya nükleer DNA kodlarındaki mutasyonlar saptanmıştır(107-109). Kao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mtDNA delesyonu ile insan sperm hareket azlığı ve infertilite ilişkili olduğu saptanmıştır(110). Sperm hücrelerinde de enerji mitokondrialardan sağlanarak sperm motilitesini sağlar. İnsan sperm hücresinde orta kısımda 70-80 adet mitokondri yer alır. İnsan sperm mtDNA 16569 bp’den oluşan çift sarmallı DNA molekülünden oluşur ve 2 rRNA, 22 tRNA ve 13 polipeptiti kodlar (Şekil-4)(111). İnsan mtDNA maternal kalıtım göstermektedir. Mitokondial respiratuar zincir reaksiyonu mitokondial ve nükleer genlerdeki gen ekspresyonunun koordinasyonuna bağlıdır. Her iki genlerdeki mutasyonlardan biri mitokondrilardaki enerji üretimini bozabilir. Büyük mitokondial DNA delesyonları mitokondial myopati hastaların ve yaşlı bireylerin etkilenmiş dokularında bulunmaktadır. mtDNA delesyonları pek çok post mitotik hücre tipinde yaygındır. Özellikle 4977bp’lik delesyona beyin, karaciğer, kalp ve testis gibi pek çok dokuda rastlamıştır. Bu yaygın delesyon 7.4kb’lık bir alanı kaplamaktadır ve uçlarında tekrar dizileri mevcuttur. Bu uçlardaki tekrarlardan dolayı polimeraz enzimi bu kısımları yanlış okumaktadır. Bu yanlış okunmadan dolayı delesyon meydana gelmekte ve elektron transfer

zincirinde ATP sentezi için gerekli olan birkaç genin kaybı gerçekleşmektedir (112). 4977bp'lik mtDNA delesyonu sonucunda pek çok yapısal genin delesyonu veya kısmi kaybı (ATPase 6/8, COIII, ND3, ND4L, ve ND4) gerçekleşmektedir. 7345 ve 7599bp'lik delesyonlar ise benzer şekilde pek çok yapısal genin delesyonuna veya kısmi kaybına (ATPase 6/8, COIII, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6, *Cytb*, ve 8 tRNA geni) neden olmaktadır. Bu mtDNA genlerinin kaybı solunum zincirinde eksikliklere neden olabilmektedir. Delesyonlu mtDNA bölgesinden kodlanan proteinleri içeren defektli solunum zincir proteinleri serbest oksijen radikalleri oluşumunu arttırmakta ve sonuçta oksidatif hasar ortaya çıkmaktadır. Spermatozoaların plazma membranları doymamış yağ asitlerinden zengin olduğu için oksidatif hasardan diğer hücrelerle karşılaştırıldığında daha fazla etkilenmektedirler (113). Mitokondrial disfonksiyonuna endojen ve ekzojen serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasar ve mtDNA mutasyonlarının neden olabileceği gösterilmiştir (114). Reaktif oksijen türleri (ROT) sürekli olarak solunum zinciri tarafından oluşturulmaktadır. Eğer ROT yeterli düzeyde elimine edilemezde mtDNA'da hasara neden olabilmektedir.

Çalışmada, varikozel pozitif ve varikozel negatif oligoastenospermili infertil hastalarda 7345bp ve 7599bp'lik mtDNA delesyonlarının spermogram testi normal olan kontrol grubu ile karşılaştırılarak delesyonların varikozel ve infertiliteyle ilişkisinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Hastaların Seçimi

Çalışmaya Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji polikliniğine infertilite nedeniyle başvuran, spermiyogram tetkikleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre, aynı laboratuvar teknisyeni tarafından 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası alınan semen örneklerinde oligoastenospermi tespit edilen hastalar dahil edildi. Hastalar varikosel olan ve varikosel olmayan olarak 2 gruba ayrıldı.

4.1.1. Varikosel Tespit Edilen İnfertil Hastalar

İnfertilite nedeniyle takip edilen, spermiyogram tetkiki sonucu DSÖ kriterlerine göre oligoastenospermi tespit edilen, fizik muayene ve dopler ultrasonografi ile varikosel tespit edilen 20 erkek hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların ejakulat örnekleri -20 derecede saklandı. Hastaların hormon profili (FSH, LH, Total Testosteron, Prolaktin, Estradiol) tarandı, normal olanlar çalışmaya alındı.

4.1.2 Varikosel Tespit Edilmeyen İnfertil Hastalar

İnfertilite nedeniyle takip edilen, spermiyogram tetkiki sonucu DSÖ kriterlerine göre oligoastenospermi tespit edilen, fizik muayene ve dopler ultrasonografi ile varikosel tespit edilmeyen 20 erkek hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların ejakulat örnekleri -20 derecede saklandı. Hastaların hormon profili (FSH, LH, Total Testosteron, Prolaktin, Estradiol) tarandı, normal olanlar çalışmaya alındı.

4.1.3 Kontrol Grubu

Fertil olan, spermiyogram tetkikleri DSÖ kriterlerine normal olan 20 erkek hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların ejakulatları -20 derecede saklandı.

4.2. Deneyin Yapılışı

Spermden DNA İzolasyonu

İncelemeye alınan tüm olguların DNA izolasyonları gerçekleştirilerek delesyon çalışmaları için kullanıldı.

4.2.1 Kullanılan solüsyon ve gereçler

DNA izolasyon kiti (PureGene), 1.5 ml'lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 100 ve 1000 µl'lik pipet (Eppendorf), pipet uçları (Axygen scientific), mikrosantrifüj, vorteks, izopropil alkol, % 70'lik etil alkol

4.2.2 İzolasyon İşlemi

1. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl ejakulat kondu.
2. 13 000-16 000 rpm'de de 20 saniye santrifüj edildi.
3. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.
4. Hücreler resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
5. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Hücrelerin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visköz bir hale geldiği gözlemlendi. Üzerine 12 µl DTT ve 1,5 µl Proteinaz K (20mg/ml) eklendi. Eppendorf tüp elle birkaç kez alt üst edilerek solüsyon içerisinde eklenen maddelerin homojen hale gelmesi sağlandı.
6. Örnekler 1 gece 55 °C'lik benmaride bekletildi.

7. Örneklerin oda ısısına gelmesi beklendi. 1.5 µl Rnase solüsyonu eklendi ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 10-20 saniye vortekslemedi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. 13 000-16 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak tüp alt üst edildi. İşleme ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar devam edildi (50 kez).
11. 13 000-16 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
12. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklendi ve tekrar 13 000-16 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüpler 1 saat oda ısısında bekletilerek alkolün uçması sağlandı. 100 µl DNA rehisratasyon solüsyonu eklendi. DNA'nın erimesi için örnekler 60 °C'lik benmaride 1 saat bekletildi. Örnekler +4°C'de saklandı.

4.3 PCR Protokolü

4.3.1 Kullanılan Solüsyon ve Gereçler

ddH₂O, dNTP seti, MgCl₂, 10X buffer, Taq polimeraz, agaroz, EtBr, DNA boyut markırı, 5X TBE tamponu, yükleme tamponu, mikrosantrifüj, elektronik hassas terazi, vorteks, 37°C'ye ve 65°C'ye ayarlanabilen su banyosu, elektroforez aparatı, elektroforez box, Eppendorf Mastercycler Gradient, UV lambası ile ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi, steril 1.5 ml, 0.5 ml ve 0.2 ml'lik Eppendorf santrifüj tüpler.

Tablo 1: Total mtDNA ve delesyonlarının belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.

L1 (3304–3323):	5’-AACATACCCATGGCCAACCT-3’
L2 (7901–7920):	5’-TGAACCTACGAGTACACCGA-3’
L3 (8150–8166):	5’-CCGGGGGTATACTACGGTCA-3’
L4 (8251–8270):	5’-GCCCCGTATTTACCCTATAGC-3’
L5 (8531–8550):	5’-ACGAAAATCTGTTCGCTTCA-3’
L6 (8811–8830):	5’-CACCCAACCTATCTATAAACCC-3’
H1 (3717–3698):	5’-GGCTACTCGTCGCAGTGCGC-3’
H2 (3836–3817):	5’-GGCAGGAGTAATCAGAGGTG-3’
H3 (16255–16236):	5’-CTTTGGAGTTGCAGTTGATG-3’
H4 (16430–16411):	5’-TGCGGGATATTGATTTACAG-3’
H5 (16450–16431):	5’-CGAGGAGAGTAGCACTCTTG-3’
H6 (16509–16490):	5’-AGGAACCAGATGTCGGATAC-3’

Tablo 2: İnsan spermatozoosunun mtDNA'sında 4977, 7345 and 7599 bp'lik delesyonların tespitinde kullanılan primerler ve PCR sonrası elde edilen PCR ürün büyüklükleri.

Primer	Çoğaltılan Bölge	Normal mtDNA	Delesyonlu mtDNA
L1-H1a	3304–3717	414	414
L1-H2a	3304–3836	533	533
L2-H3d	7901–16255	8355	756
L3-H5d	8150–16450	8301	702
L4-H3d	8251–16255	8005	406
L5-H4c	8531–16430	7900	555
L6-H6c	8811–16509	7699	354
L6-H5c	8811–16450	7640	295
L3-H6e	8150–16509	8360	3383b, 1015c, 761d

- a. Total mtDNA'nın tanımlanmasında kullanılan primer çiftleri.
- b. 4977bp'lik mtDNA delesyonun belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.
- c. 7345bp'lik mtDNA delesyonun belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.
- d. 7599bp'lik mtDNA delesyonun belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.
- e. Long-range PZR ürünlerinin elde edilmesinde kullanılan primer dizileri (Kao S,1998)

4.3.2 PCR Kurulması İşlemi

Her bir tüpe 3 µl hasta DNA'sı ve üzerine 6 µl MgCl₂, 6 µl 10X buffer, 6 µl dNTP (2.5mM), 1 µl primer 1 (30pmol), 1 µl primer 2 (30pmol), 0.3 U Taq DNA polimeraz ve 19.7 µl ddH₂O konuldu. Hazırlanan tüpler vortekslendi ve PCR cihazında çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için yalnızca bir döngü olmak üzere 94°C'de 5 dakika, denatürasyon (melting) için 94°C'de 40 saniye, yapışma (annealing) için 60°C'de 40 dakika, uzatma (extension) için 72°C'de 40 dakika olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirildi. En son döngüdeki uzatma periyodu 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR ampliconları agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

4.3.3 Agaroz Jel Elektorforezi

Elde edilen PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde koşturuldu. %1,5'lik agaroz jelin hazırlanmasında 1,5 gr agaroz tartılarak üzerine 100 ml 0.5XTBE eklendi ve mikrodalga fırında eritildi. Eriyen agaroz-TBE solüsyonu içerisine 7 µl EtBr konuldu ve agaroz-TBE solüsyonu içinde iyice karışması sağlandı. Hazırlanan solüsyon daha önce kenarları bantlanmış olan elektroforez aparatına döküldü ve donmaya bırakıldı.

PCR ürünlerinden 13 µl alınarak 3 µl yükleme boyasıyla karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Her yükleme işleminde 100 bp'lik DNA boyut markırı kullanılarak karşılaştırma ve kontrol işlemleri yapıldı. Sonuçlar SPSS programında Mann Whitney-U Test metodu ile değerlendirildi.

5. BULGULAR

Çalışmaya kontrol grubu olarak alınan spermiogram incelemesi WHO kriterlerine göre normal değerler içerisinde olan 20 hastanın yaşları en küçük 26, en büyük 40 yaş, ortalama 33 ± 7 olarak belirlendi. Hasta grubu olarak kullanılan varikosel negatif 20 bireyin yaşları en küçük 28, en büyük 39 yaş, ortalama $33,5\pm5,5$ ve varikosel pozitif 20 hastanın yaşları en küçük 25, en büyük 43 yaş, ortalama 34 ± 9 olarak tespit edildi. Her 3 grubunda yaş ortalamaları birbirine oldukça yakın bulundu. Varikosel pozitif ve Varikosel negatif hastaların beraberce yaş ortalamaları hesaplandığında 33 olarak bulundu.

Şekil 5’de L1-H1 ve L1-H2 primerleri kullanılarak total mtDNA varlığı gösterilmiştir.

Şekil 6’de primer shift PCR kullanılarak 7345 ve 7599 mtDNA delesyonlarının varlığı gösterilmiştir.

Çalışmada V(+) ve V(-) gruplar 7345bp ve 7599bp’lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında sırasıyla her iki delesyon açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P=0.02$ ve $P=0.042$).

Tablo 3’de olgular ve tespit edilen delesyonlar gösterilmiştir.

Tablo 3: V(+) ve V(-) gruplarda 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar.

No	7345bp'lik delesyon	7599bp'lik delesyon	Klinik	Bulgu
1	-	-		1
2	+	+		1
3	+	+		1
4	+	+		1
5	-	-		1
6	-	-		1
7	-	-		1
8	+	+		1
9	+	+		1
10	-	-		1
11	+	+		1
12	+	+		1
13	-	-		1
14	-	-		1
15	+	+		1
16	+	+		1
17	+	+		1
18	+	+		1
19	-	-		1
20	+	+		1
21	-	-		2
22	+	+		2
23	-	-		2
24	+	+		2
25	-	-		2
26	+	+		2
27	-	-		2
28	-	-		2
29	-	-		2
30	-	-		2
31	-	-		2
32	-	-		2
33	-	-		2
34	-	-		2
35	-	-		2
36	+	+		2
37	-	-		2
38	-	-		2
39	+	-		2
40	-	-		2

+: Belirtilen delesyonun varlığı, -: Belirtilen delesyonun yokluğu,1: V(-) infertilite, 2: V(+) infertilite.

V(+) ve sağlıklı kontrol 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.009$ ve $p=0.019$).

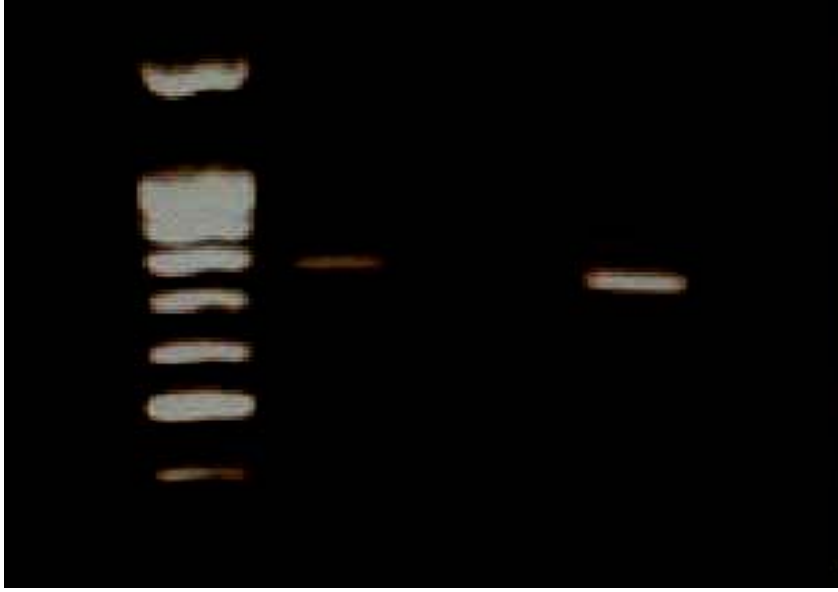
V(-) ve sağlıklı kontrol 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.011$ ve $p=0.009$).

V(-) ve V(+) gruplarda 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar sırasıyla %60 ve %55, %25 ve %20 oranlarında tespit edildi.

Yaş, total sperm miktarı, hareketlilik ve incelenen delesyonlar arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığının ortaya konması için yapılan lineer korelasyon testinde total sperm miktarı yada hareketlilik ve mtDNA delesyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.



şekil 5: Total mtDNA'nın gösterimi. Stun1: DNA boyut markırı, Sütun 2: 414bp'lik rn, Sütun 3: 533bp'lik rn.



Şekil 6: 7345bp ve 7599bp'lik mtDNA delesyonlarının gösterimi. Sütun1: DNA boyut markırı, Sütun 2 ve 4: 756bp ve 702bp'lik ürünler (7345bp'lik delesyon için), Sütun 3: 555bp'lik ürün (7599bp'lik delesyon için).

6. TARTIŞMA

Erkek infertilitesi astenospermi veya oligoastenospermi ile beraberlik göstermektedir. Her iki durumdada mtDNA'da nokta mutasyonları ve büyük delesyonlar tespit edilmiştir (115). Son zamanlarda erkek infertilitesi testiküler ve sperm patolojilerinde artış ve sperm sayısındaki azalmadan dolayı özellikle endüstrileşmiş şehirlerde artmıştır. Defektif sperm fonksiyonu erkek infertilitesinin en sık karşılaşılan nedenlerindendir. İnfertilite kliniklerine başvuran çiftlerin yaklaşık %27'si bu şikayetle gelmektedir. Sperm disfonksiyonu flagellar hareketteki anormallikler, sperm zona tanınmasındaki başarısızlık, sperm-oosit füzyonunun başarılmasını da içeren pek çok nedenden kaynaklanabilmektedir. Spermatozoanın azalmış fertilitate ve hareketliliğinin altında yatan etyolojilerin anlaşılması ve tedavilerin geliştirilmesi için moleküler düzeyde çalışmalar yapılmalıdır (113).

Manfredi ve arkadaşları her bir spermin 1500mtDNA molekülü içerdiğini bulmuşlardır (115). Bir hücredeki mitokondriler sahip oldukları genom açısından birkaç farklı mtDNA'ya sahip olabilirler. Her bir mitokondri veya hücre ya homoplazmik (Tüm mtDNA'ların mutasyonsuz yada tüm mtDNA'ların mutasyonlu olması durumu) yada heteroplazmik (Mutasyonlu mtDNA ve mutasyonsuz mtDNA'ların beraber bulunması durumu)'tir (112). Büyük mitokondrial DNA delesyonları mitokondrial myopatili hastaların ve yaşlı bireylerin etkilenmiş dokularında bulunmaktadır. mtDNA delesyonları pek çok post mitotik hücre tipinde yaygındır. Özellikle 4977bp'lik delesyona beyin, karaciğer, kalp ve testis gibi pek çok dokuda rastlanmıştır. Bu yaygın delesyon 7.4kb'lık bir alanı kaplamaktadır ve uçlarında tekrar dizileri mevcuttur. Bu uçlardaki tekrarlardan dolayı polimeraz enzimi bu kısımları yanlış okumaktadır.

Bu yanlış okunmadan dolayı delesyon meydana gelmekte ve elektron transfer zincirinde ATP sentezi için gerekli olan birkaç genin kaybı gerçekleşmektedir (112). 4977bp'lik mtDNA delesyonu sonucunda pek çok yapısal genin delesyonu veya kısmi kaybı (ATPase 6/8, COIII, ND3, ND4L, ve ND4) gerçekleşmektedir. 7345 ve 7599bp'lik delesyonlar ise benzer şekilde pek çok yapısal genin delesyonuna veya kısmi kaybına (ATPase 6/8, COIII, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6, *Cytb*, ve 8 tRNA geni) neden olmaktadır. Bu mtDNA genlerinin kaybı solunum zincirinde eksikliklere neden olabilmektedir. Delesyonlu mtDNA bölgesinden kodlanan proteinleri içeren defektli solunum zincir proteinleri serbest oksijen radikalleri oluşumunu arttırmakta ve sonuçta oksidatif hasar ortaya çıkmaktadır. Spermatozoların plazma membranları doymamış yağ asitlerinden zengin olduğu için oksidatif hasardan diğer hücrelerle karşılaştırıldığında daha fazla etkilenmektedirler (113). Mitokondrial disfonksiyonuna endojen ve ekzojen serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasar ve mtDNA mutasyonlarının neden olabileceği gösterilmiştir (114). Reaktif oksijen türleri (ROT) sürekli olarak solunum zinciri tarafından oluşturulmaktadır. Eğer ROT yeterli düzeyde elimine edilemezse mtDNA'da hasara neden olabilmektedir. Fraga ve arkadaşları sigaranın antioksidanları etkileyerek oksidatif stresi uyarabileceğini ve sperm DNA'sında 8-hidroksi-2'deoksiguanozinde anlamlı bir artışa neden olduğunu belirtmişlerdir(116). Normal aerobik solunum boyunca serbest radikallerin oluşumu veya ROT'a neden olan mitokondrial DNA mutasyonları veya delesyonlarından dolayı spermatozoa enerji krizine girecek ve sonuçta kısır bir döngü oluşacaktır. Bu kısır döngü defektli mitokondriden elektron akışını hızlandırabilir ve erkek infertilitesi veya subfertilitesinde rol oynayabilir.

Pek çok çalışmada 4977bp'lik delesyon ve sperm disfonksiyonu arasındaki ilişkiler incelenmiştir. 4977bp'lik delesyonun incelendiği 2 çalışmada farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalardan ilkinde 4977bp'lik delesyonun düzeyi ve ayrılmış sperm fraksiyonlarındaki hareketliliğin derecesi arasında negatif bir ilişki bulunmuştur (110). Diğer çalışmada ise semen örnekleri analiz edilmiş ve hasta patolojisiyle delesyon arasında herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir (112). Kao ve arkadaşları 7599bp'lik mtDNA delesyonunu normal fertil kişilerin %11'inde, primer infertillerin %83.3'ünde ve sekonder infertillerin %42.8'inde tespit etmişlerdir (113). Çalışmamızda 7345 ve 7599bp'lik mtDNA delesyonları Varikosel (-) infertiliteli grupta sırasıyla %60 ve %55, Varikosel (+) infertilite grubunda %25 ve %20 oranlarında, sağlıklı kontrolde %20 ve %15 oranlarında tespit edilmiştir.

Kitagawa ve arkadaşları 4977bp'lik mtDNA delesyonunun post menopozal overlerde arttığını tespit etmişlerdir. Bu delesyon aynı zamanda 45 yaş üstü dişilerin oositlerindedey tespit edilmiştir (117). Germ hücrelerindeki mtDNA delesyonlarının yaşlanmayla çeşitli iç ve çevresel faktörlere(hormonlar, ROT gibi) maruziyetle meydana geldiği muhtemeldir. Bu sonuçlar daha yaşlı erkeklerde üreme sisteminde oluşan sporadik spermatogenetik yetmezlik, sertoli hücre anomalilerinde artış, artmış epididimal geçiş zamanı ve azalmış sperm verimi ile tutarlıdır. mtDNA mutasyonları spermatozoda ve spermatogenezis boyunca oluşabilir ve artarak spermatozooanın hareketini etkileyebilir. Çalışmamızda hasta yaşı ve incelenen delesyonlar arasında herhangi bir beraberlik yada korelasyon gösterilememiştir.

Lestienne ve arkadaşları oligoastenospermili hastalarda yaptıkları çalışmada mtDNA'da pek çok delesyonunun varlığını tespit etmişlerdir. Özellikle

intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) programlarına alınan bireylerde mtDNA delesyonlarının araştırılmasının gerekli olduğunu belirtmişlerdir (118). Sperm mtDNA'sının PCR ile amplifikasyonu etkilenmemiş bireylerle karşılaştırıldığında infertil ve subfertil erkelerde mtDNA delesyonlarının yüksek insidansını göstermektedir (119). Çalışmamızda da Varikosel (-) ve Varikosel (+) infertilite gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla mtDNA delesyonlarına sahip olduğu gösterilmiştir.

mtDNA delesyonlarının sağlıklı kontrolle karşılaştırıldığında V(+) ve V(-) oligospermili gruplarda ki artışının pek çok nedeni olabilir. mtDNA solunum zincirinde görevli olan proteinlerin sentezini gerçekleştirmektedir. Spermatozoa gibi hücreler yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyduklarından dolayı mtDNA diğer hücreler ile karşılaştırıldığında daha fazla bölünmektedir. Bu bölünmeler sırasında spermatozoa mtDNA'sındaki mutasyonları veya yeniden düzenlenmeleri elimine edemez veya onaramaz. İlâveten, sadece testiste sentezlenen mitokondrial transkripsiyon faktör aktivatör hafif zincirden kodlanan proteinlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır. Kısaca mtDNA replikasyonunu sağlamaktadır. Böylece spermin yüksek enerji ihtiyacının karşılanması için normalden daha hızlı bir mtDNA replikasyonu ve artışı gerçekleşmektedir (118). Yine diğer bir neden infertil bireylerde mtDNA içeriğinin fazla olmasıdır. Hareketli spermlerdeki mtDNA içeriği kötü kaliteli sperm örneklerine göre 28 kat daha yüksek bulunmuştur (115). %40'luk fraksiyondan toplanan spermlerin (çoğunluğu anormal spermlerden oluşmaktadır) mtDNA içeriği %100'lük fraksiyondan toplanan spermlerin (çoğunluğu normal spermlerden oluşmaktadır) mtDNA içeriğinden 70 kat daha fazladır. Bu fazlalık 2 nedenden kaynaklanabilir. İlki, enerji ihtiyacını karşılamak için mtDNA sayısını arttırmıştır. İkincisi, mtDNA

artışı infertil hastaların anormal farklılaşması ve olgunlaşmasından kaynaklanabilir (115).

Primer ve sekonder infertiliteli bireylerde mtDNA'da meydana gelen delesyonlarının yanı sıra nokta mutasyonlarının da erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Holyoake ve arkadaşları az semen miktarına sahip erkeklerin mtDNA'larındaki substitüsyonları incelemişler ve kontrolle karşılaştırıldığında 3 katlık bir artış olduğunu belirtmişlerdir (120).

Smith ve arkadaşları varikoselli hastalarda semen örneklerindeki total oksidatif stres ve sperm DNA hasarı arasında bir ilişkinin bulunduğunu belirtmişlerdir (121). Chen ve arkadaşları 4977bp'lik mtDNA delesyonunu oligospermili grupta %47.3, oligoastenospermili grupta %17.7 oranında tespit etmişlerdir. Seminal oksidatif streste artışıla mtDNA 4977bp'lik delesyon arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir (122). Çalışmada varikozel sonucu oluşan infertil hastalarda mtDNA delesyonlarının sağlıklı kontrolle karşılaştırıldığında arttığı tespit edilmiştir. Weese ve arkadaşları kontrolle karşılaştırıldığında ROT'un varikoselli infertil ve fertil erkeklerde attığını tespit etmişleridir (123). Varikoselli hastaların spermatozoalarında oksidatif hasar bu bireylerdeki belirli antioksidanların hücredeki yetersizliğinden dolayı artabilir. Sharma ve arkadaşları varikoselli hastalarda kontrolle karşılaştırıldığında total ROT'un yüksek antioksidan kapasitenin düşük olduğunu belirtmişlerdir (124). Hendin ve arkadaşları varikozel öncesi ve sonrası ROT ölçümlerini yapmışlar ve varikozelde ROT'un arttığını tespit etmişlerdir (125). ROT nükleer DNA'da hasar meydana getirebileceği mtDNA'da benzer şekilde hasra neden olabilmektedir. Varikozelde mtDNA delesyonlarının artmasının nedenlerinden biri semendeki artmış ROT olabilir. V(+) grupta mtDNA delesyonlarında

kontrolle karşılaştırıldığında artış olmasına rağmen V(-) grupta bu artış daha belirgindir. Varikoselde artmış oksidatif stres mtDNA delesyonlarındaki artışı açıklayabilir. Ancak negatif gruptaki artışın temelinde yatan genetik nedenleri açıklamak oldukça zordur. Varikosel gibi tedavi edilebilen infertilite nedenleri ekarte edildikten sonra varikosel tespit edilmeyen oligoastenospermik hastalarda genetik anormallik insidansının yüksek olması bu hasta grubunda delesyonları arttırıcı yönde işleyen mekanizmalarda görevli genlerin mutasyonları; bu ve benzeri etkenler ortaya çıkarabilir. Bu süreçte etkili olan genler ve mtDNA delesyonları arasındaki ilişkilerin araştırılması bu sürecin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

Sonuç olarak, çalışmada mtDNA delesyonlarının özellikle varikosel tespit edilmeyen oligoastenospermik infertil hastalarda sık olduğu bulunmuştur. Varikosel tespit edilen infertil grubunda da kontrolle karşılaştırıldığında bir artış olduğu tespit edilmiştir. mtDNA delesyonlarına özellikle ICSI programlarına yönlendirilecek ve alınacak infertil hastalarda bakılması çok düşük oranda da olsa zigota delesyonlu yada mutasyonlu mtDNA'ların geçişinin elimine edilmesi açısından önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. Moshier WD, Pratt WF, Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trends. *Fertil Steril* 1991; 56: 192-193.
2. Setferth W, Jecht E, Zeittler E. Percutaneous sclerotherapy of varicocele. *Radiology* 1981; 139: 335-340.
3. Greenberg SH, Lipshultz LI, Wein AJ: A preliminary report of "subclinical varicocele": Diagnosis by Doppler ultrasonic stethoscope: Examination and initial results of surgical therapy. *J Reprod Med* 1979;22:77-81.
4. McClure RD, Hricak H: Scrotal ultrasound in the infertile man; Detection of subclinical unilateral and bilateral varicoceles. *J Urol* 1986;135:711-715
5. Meacham RB, Townsend RR, Rademacher D, et al: The incidence of varicoceles in the general population when evaluated by physical examination, gray scale sonography and color Doppler sonography. *J Urol* 1994;151:1535-1538.
6. Perrin P, Rollet J, Durand L: The Doppler stethoscope in the diagnosis of subclinical varicocele. *Br J Urol* 1980;52:390-391.
7. Kendirci M, Boylu U, Miroğlu C: Andrologic surgery of the 15th century. in *Cerrahiyyetü'l Haniyye. The History of Male-Female Sexuality and Fertility in Asia Minör* . (Eds: Kendirci M, Kadioğlu A, Miroğlu C), İstanbul, 2003, 127-148.
8. Noske HD and Weidner W: Varicocele - A historical perspective. *World J Urol* 1999; 17(3): 151-157.
9. Kursh EO: What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril*; 1987; 48(3): 510-511.
10. Hargreave TB: Varicocele-a clinical enigma. *Br J Urol* 1993; 72(4): 401-408.
11. Hendry VVF, Sommerville IF, Hail RR et al.: Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol* 1973; 45: 684-692.
12. Cockett ATK, Takihara M and Cosentino MJ. The varicocele. *Fertil Steril* 1984; 41:1-12.
13. Nieschlag E, Mertle L, Fishedick A, Behre HM: Treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod* 1995; 10(2): 347-353.
14. WHO: The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 1992; 57:1289-1293.
15. Gorelick JI and Goldstein M: Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* 1993; 59:613-616.
16. Saypol DC, Hovvards SS, Turner TT et al: influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 1981; 68:39-45.
17. Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP: Varicocele related testicular atrophy and its

- predictive effect upon fertility. *J Urol* 1994; 152(2 pt 2): 788-790.
18. Naughton CK, Nangia AK and Agarwal A: Varicocele and male infertility: part II. *Hum Rep Update* 2001; 7(5): 473-481.
 19. Kohler FP: On the etiology of varicocele. *J Urol* 1967; 97: 741-742.
 20. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N et al: Phlebography in varicocele scroti (Abstract). *Açta Radiol Diag* 1966; 4: 517-528.
 21. Comhaire F, Kannen M, Nahourn C: Radiological anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int J Androl* 1981; 4: 379-387.
 22. Braedel HU, Steffens J, Ziegler M et al: A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol* 1994; 151: 62-66.
 23. Shafik A, Moftah A, Olfat S et al: Testicular veins: anatomy and role in varicocelogenesis and other pathologic conditions. *Urology* 1990; 35(2): 175-182.
 24. Dennison AR and Tibbs DJ: Varicocele and varicose veins compared: a basis for logical surgery. *Urology* 1986; 28(3): 211-217.
 25. Wishahi MM: Anatomy of the venous drainage of the human testis: testicular vein cast, microdissection and radiographic demonstration. A new anatomical concept. *Eur Urol* 1991; 20(2): 154-160.
 26. Harrison RM, Lewis RW, Roberts J A: Pathophysiology of varicocele in nonhuman primates: long-term seminal and testicular changes. *Fertil Steril* 1986; 46:500-503.
 27. Salama N, Bergh A, Oamher JE: The changes in testicular vascular permeability during progression of the experimental varicocele. *Eur Urol*. 2003; 43(11): 84-91.
 28. Lipshultz LI, Corriere Jr JN: Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol* 1977; 117(2): 175-176.
 29. Sigman M, Howards SS: Male infertility. In Walsh PC, Retik AB, Vaughn ED, Wein AJ, editors. *Campbell's Urology* 1997; 7th eds: 1287-1330.
 30. Turner TT, Brown KJ and Spann CL: Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity: effect of experimental varicocele. *J Androl* 1993; 14:180-186.
 31. Green KF, Turner TT and Howard SS: Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol* 1984; 131:1208-1211.
 32. Hurt GS, Howards SS and Turner TT: Repair of experimental varicoceles in the rat. Long term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymal sperm concentrations and motility. *J Androl* 1986; 7: 271-276.
 33. Li H, Dubocq F, Jiang V et al: Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology* 1999; 53:1258-1262.
 34. Grasso LF, Pepe P, Panella P et al: Velocimetric evaluation of spermatic vessels with echo color Doppler in patients with idiopathic varicocele. *Minerva Urol Nefrol* 1997; 49:179-182.

35. Dahl HV, Hendrick JF: A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet* 1959; 108:697-705.
36. Mieusset R, Bujan L: Testicular heating and its possible contribution to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995; 18:169-184.
37. Zorgniotli AW, MacLeod J: Studies in the temperature, human semen quality and varicocele. *Fertil Steril* 1973;24:295-301.
38. Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K et al: Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl* 1989; 22:149-159.
39. Nishiyama H, Danno S, Kaneko V et al. Decreased expression of cold-induced RNA-binding proteins (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Path* 1998; 152:289-296.
40. Namiki M, Nakamura M, Okuyama A et al: Influence of temperature on the function of Sertoli and Leydig cells of human testes. *Fertil Steril* 1987; 47: 475-480.
41. Turner TT, Miller DW: Protein synthesis and secretion by the rat seminiferous tubule in vivo not affected by experimental varicocele. *J Urol*. 1996; 156(5): 1881-1887.
42. Snarpe RM: Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 1984, 30(1): 29-49.
43. Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C et al Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol* 1991; 260: 1581-1589.
44. Sweeney TE, Rozum JS and Gore RW: Alteration of testicular microvascular pressure during venous pressure elevation. *Am J Physiol* 1995; 269: 37-45.
45. Hsu HS, Chang LS, Chen UT et al: Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *Eur Urol* 1994; 25: 71-75.
46. Hsu HS, Wei YH and Li AF: Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. *Urology* 1995; 46: 545-549.
47. Shafik A, Bedeir GAM. Venous tension patterns in cord veins. I In normal and varicocele individuals. *J Urol* 1980; 123: 383-385.
48. Coolsaet BLRA: The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. *J Urol* 1980; 124: 833-926.
49. Comhaire F, Vermeulen A: Varicocele sterility cortisol and catecholamines. *Fertil Steril* 1974; 25:88-95.
50. Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA et al: Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration with the testis. *Endocrinology* 1989; 124: 3043-3049.
51. Kazama T: Effect of experimental varicocele on rat Leydig cell function. *Nippon Hinyok Gak Zas* 1995; Abstract 86: 308-315.
52. Jarrow JP, Sanzone JJ: Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol* 1992; 148: 1805-1807.

53. Turner TT, Jones CE and Roddy MS: Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentration or testicular blood gas concentration. *Biol Reprod* 1987; 36: 926-932.
54. Shook TE, Nyberg LM, Collins BS et al: Pathological and immunological effects of surgically induced varicocele in juvenile and adult rats. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 17: 141-144.
55. Rogers BJ, Mygatt GG, Soderdahl DW et al: Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1985; 44: 800-805.
56. Virgil P, Wohler C, Bustos-Obregon E et al: Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 1994; 26: 55-60.
57. Benoff S, Barcia M, Hurley IR et al: Classification of male factor infertility relevant to in vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. *Hum Rep* 1996; 11: 1905-1918.
58. De Lamirande E, Gagnon C: Human sperm hyperactivation in whole sperm and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 1993; 59: 1291-1295.
59. Aitken RJ, Clarson JS, Hargreave TB et al: Analysis of the relationship between defective sperm function and generation of reactive oxygen species in cases of oligospermia. *J Androl* 1989; 10: 214-220.
60. Alkan I, Simsek F, Haklar G et al: Reactive oxygen species production by spermatozoa of patients with idiopathic infertility. *J Urol* 1997; 157: 140-143.
61. Aitken RJ and Clarson JS: Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 459-465.
62. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco Letal: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8: 338-348.
63. Weese DL, Peaster ML, Kyle KH et al: Stimulated reactive oxygen species generation by the spermatozoa of infertile men. *J Urol* 1993; 149: 64-67.
64. Sinha-Hikim AP, Swerdloff RS: Temporal and stage-specific effect of recombinant human follicular stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropin releasing hormone antagonist treated rat. *Endocrinology* 1995; 136: 253-261.
65. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN: Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod* 1996; 55(5): 935-941.
66. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P: Apoptosis in human ejaculated cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; Abstract 28, 587-596.
67. Marmar JL. Varicocele and male infertility: part II. *Hum Rep Update* 2001; 7(5):461-472.

68. Cyry MR, Watson PF: Sperm structure and function. in Grudzinskas JG, Yovich JL: Gametes-The Spermatozoon. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 45-69.
69. Koehler JK: Structural heterogeneity of the mammalian sperm flagellar membrane. *J Submicrosc. Cytol* 1983; 15: 247-253.
70. Mortimer ST: A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reprod* 1997; 3: 403-439.
71. Henkel R, Bittner J, Weber R, Hither F, Miska W: Relevance of zinc in human sperm flagella and relation to motility. *Fertil Steril* 1999; 71: 1138-1143.
72. Eddy E, Toshimori K, O'Brien: Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc. Res. Tech.* 2003; 61: 103-115.
73. Baccetti B, Porter KR, Ulrich M: High voltage electron microscopy of sperm axoneme. *J Submicrosc. Cytol* 1985; 17: 171-176.
74. Lipshultz L: Subfertility. in Kaufman J, editör: *Current Urologic Therapy*, Philadelphia, 1980, WB Saunders, 127-139.
75. Tur-Kaspa I, Maor Y, Levran D, Yonish M, Mashiach S, Dor J. How often should infertile men have intercourse to achieve conception. *Fertil Steril* 1994; 62: 370-5.
76. Escalier D, David G: Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and periaxonemal anomalies. *Biol. Celi* 1984; 50; 37-52
77. Weidner W, Krause W, Ludvigg M. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 1999; 5:421-432.
78. Mak V, Jarvi K, Buckspan M, Freeman M, Hechter S, Zini A: Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. *Urology.* 2000; 56: 463-6.
79. Wong WY, Thomas CM, Merkus HM, Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RP: Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril* 2000; 74: 930-5
80. Seftel AD, Rutchik SD, Chen H, Stovsky M, Goldfarb J, Desai N: Effects of subinguinal varicocele ligation on sperm concentration, motility and Kruger morphology. *J Urol.* 1997;158:1800-3.
81. Kibar Y, Seçkin B, Erduran D: The effects of subinguinal varicocelectomy on Kruger morphology and semen parameters. *J Urol.* 2002; 168: 1071-4.
82. Leifke E, Nieschlag E: Male infertility treatment in the light of evidence-based medicine. *Andrologia* 1996; 28: 23.
83. Rucker GB, Mielnik A, King P, Goidstein M, Schlegel PN: Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction. *J Urol* 1998; 160:2068.
84. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al: Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996; suppl., 4:1.

85. Pauer HU, Hinney B, Michelmann HW, Krasemann EW, Zoll B, Engel W: Relevance of genetic counselling in couples prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:1909.
86. Tiepolo L, Zuffardi O: Localisation of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34:119.
87. Foresta C, Moro E, Ferlin A: Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrinol Rev* 2001; 22: 226.
88. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, et al: Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:27.
89. Vogt PH, Affara N, Oavey P, Hammer M, Johling MA, Lau YF, et al: Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping 1997. Heidelberg, Germany, April 13-16, 1997. *Cytogenet Celi Genet* 1997; 79:1.
90. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10:383.
91. Van Steirteghem AÇ, Verheyen G, Tcmnave H, Deuroey P: Assisted reproductive technology by intracytoplasmic sperm injection in male-factor infertility. *Curr Opin Urol* 1996; 6: 333.
92. Mc Elreavey K, Krausz C, Bishop CE. The human Y chromosome and male infertility. In Mc Elreavey K (eds.): *The Genetic Basis of Male Infertility*. Springer, Heidelberg, Germany, 1999; 211-220.
93. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus O, Hovatto O: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10:383.
94. Girardi SK, Mielnic A, Schlegel PN: Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Rep* 1997; 12: 1635-41.
95. Manning M, Junemann KP, Alken P, et al: Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Lancet* 1998; 352:37.
96. Brandel RA, Mielnik A, Liotta D, et al: AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction. Preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 1998; 13:2812-2815.
97. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, et al: Y chromosome deletions in azoospermic and severe oligospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1998; 13: 3332-3337.
98. Kent-First M, Kol A, Muallem R, et al: The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their

- infertile fathers. *Mol Hum Reprod* 1996;2: 243.
99. Pryor J, Kent-First M, Muallem A, et al. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New Engl J Med* 1997; 336:534-539.
 100. Kent-First M, Muallem A, Stuta J, et al: Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. *Molec Reprod and Develop* 1999; 53 (1): 27-41.
 101. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S: Human Y chromosome: azoospermia factors IAZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 993-43.
 102. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, et al: Benetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; 348; 443.
 103. Jager RJ, Anvret M, Hail K, Scherer G: A human XY female with a frame shift mutation in the A candidate testis determining gene SRY. *Nature* 1990; 348:452.
 104. Pao CC, Kao SM, Hor JJ, Chang SY; Lack of mutational alteration in the conserved regions of ZFY and SRY genes of 46, XY females with gonadal dysgenesis. *Hum Reprod* 1993; 8:224.
 105. Lamb DJ: Debate: is ICSI a genelle time bomb? Yes. *J Androl* 1999;20:23.
 106. Carra E, Sangiorgi D, Gattuccio F. Male infertility and mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Com* 322 (2004); 333-339.
 107. Ozawa T, Genetics and functional changes in mitochondrial associated with aging, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 425-456
 108. Wallace DC, Disease of the mitochondrial DNA, *Ann. Rev. Biochem.* 61 (1992) 1175-1212.
 109. Cummins JM, Jequier AM, Kan R, Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stres. *Mol. Reprod. Dev.* 37 (1994) 345-362.
 110. Kao SH, Chao HT, Wei YH, Mitochondrial deoxyribonukleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm, *Biol. Reprod.* 52 (1995) 729-736.
 111. Wei YH, Kao SH; Mithochondrial DNA Mutation and Depletion are Associated with Decline of Fertility and Motility of Human Sperm. *Zoological Studies* 2000; 39(1): 1-12.
 112. St John JC, Sakkas D, Barratt CL. A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J Androl.* 2000;21:189-199.
 113. Kao SH, Chao HT, Wei YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* vol.4 no.7 pp. 657-666, 1998.
 114. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 21;94(2):514-9.

115. Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61, 953-960.
116. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.* 1996; 351:199-203.
117. Kitagawa T, Suganuma N, Nawa A. Rapid accumulation of deleted mitochondrial deoxyribonucleic acids in post menapausal ovaries. *Biol reprod* 1993; 49: 730-736.
118. Lestienne P, Reynier P, Chretien MF, Penisson-Besnier I, Malthiery Y, Rohmer V. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA Rearrangements. *Molecular Human Reproduction* 1997; 3(9); 811–814.
119. Carra E, Sangiorgi D, Gattuccio F. Male infertility and mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Com* 322 (2004); 333-339.
120. Holyoake AJ, McHugh P, Wu M, O'Carroll S, Benny P, Sin IL, Sin FY. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Int J Androl*, 2001; 24(3): 175-82.
121. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod.* 2005; 16; 256-262.
122. Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wei YH. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod.* 2002; 17(3):718-25.
123. Weese DL, Peaster ML, Himsl KK, Leach GE, Lad PM, Zimmern PE. Stimulated reactive oxygen species generation in the spermatozoa of infertile men. *J Urol.* 1993; 149(1):64-7.
124. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod.* 1999;14(11):2801-7.
125. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol.* 1999;161(6):1831-4.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Adana'da doğdum. İlköğrenimimi Adana Ahmet Sapmaz İlkokulu, orta ve lise öğrenimimi Adana Kurttepe Anadolu Lisesi'nde 1989 yılında tamamladım. 1990 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım, 1997 yılında mezun oldum. 1997-2000 yılları arasında Sağlık Bakanlığı bünyesindeki Şırnak Devlet Hastanesi acil polikliniğinde pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2000-2001 yılları arasında Kahramanmaraş Tekke Sağlık Ocağında görev yaptım. 2001 yılı Eylül dönemi TUS sınavını kazanarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.

Faruk KUYUCU