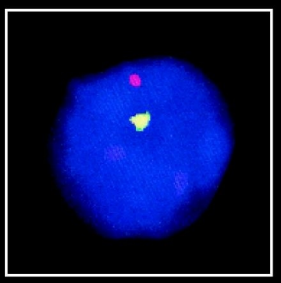
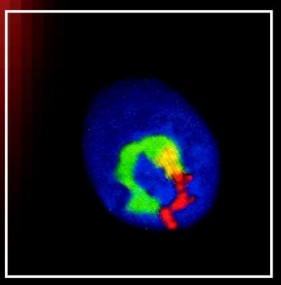
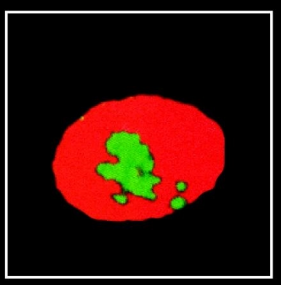
Erkek İnfertilitesi

Teşhis ve Tedavi







Editör

Sergio C. OEHNINGER
Thinus F. KRUGER

Çeviri Editörü

Doç. Dr. Mete KİLCİLER

Habitat
TIP YAYINCILIK

Erkek İnfertilitesi

Teşhis ve Tedavi

Çeviri Editörü:

Doç.Dr .Mete KİLCİLER

İTHAF

Bu kitap, bizlere son yirmi yıldır hedefimize ulaşmada ilham veren ve varlıklarıyla başarımıza fazlasıyla katkıda bulunan değerli eşlerimiz Sanderina Kruger ve Laura Oehninger'e ithaf edilmiştir.

Erkek İnfertilitesi

Teşhis ve Tedavi

Editors

Sergio C Oehninger MD PhD

Professor, Departments of Obstetrics and Gynecology, and Urology and Division Director,

The Jones Institute for Reproductive Medicine Eastern Virginia Medical School, Norfolk,

Virginia USA

Thinus F Kruger MD FRCOG

Professor and Chairperson

Department of Obstetrics & Gynaecology, and Reproductive Biology Unit

Tygerberg Academic Hospital and Stellenbosch University,

Tygerberg South Africa

Çeviri Editörü

Doç.Dr. Mete Kilciler

GATA Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.

Habitat Yayıncılık

© 2009 Habitat Yayıncılık

Bu kitabın Türkçe basım hakları Habitat Yayıncılık tarafından devralınmıştır. Yasalarca belirlenen tüm haklar Habitat Yayıncılık tarafından saklı tutulur. Habitat Yayıncılık telif hakları tamamen kendisinde olan tüm yayınlarındaki yazılar, resim, şekil, figür, fotoğraf veya bilime katkı sağlayabilmek için iktibas edilmesinde fayda görülen ya da bilimsel çalışmaya kolaylık sağlayacak her türlü materyalin kullanılmasına izin verir ve bu şekilde ilân eder.

Yazar/editör: Sergio C Oehninger MD PhD & Thinus F Kruger MD FRCOG

Kitabın Orijinal adı: Male Infertility Diagnosis and Treatment 2007 Second Edition
Orijinal Yayınevi: Informa Healthcare
Orijinal ISBN 0-415-39742-1

Kitabın Türkçe Adı: Erkek İnfertilitesi
Kitabın Çeviri Editörü: Doç.Dr. Mete Kilciler
ISBN: 978-975-00515-9-3

Önemli Not: Tıp bilimindeki bilgiler sürekli olarak değişebilmektedir. Yeni araştırmalar ve klinik deneyimler bilgilerimizi artırırken, tedavide birtakım değişiklikleri de beraberinde getirebilir. Buradaki bilgilerin sağlayıcıları yazarlar ve editörler ve hatta yayıncı, konunun standartlarına uyan ve de tam ve doğru bilgi sağlayabilmek için kendi alanlarındaki güvenilir sayılabilecek kaynaklara başvurmuşlardır. Yazarlar editörler yayımcı veya bu çalışmanın içerisinde bulunan diğer şahıslar, insan hatası olasılığı ve medikal bilgilerde oluşabilecek değişiklikleri de gözönünde bulundurulması gerektiğini hatırlatırken, buradaki bilgilerin tam ve doğru olduğunu temin eder ve olası herhangi bir hata, ihmal ve bilginin kullanımından doğacak sonuçlardan sorumlu değildir. Bilim insanlarının kitaptaki bilgileri diğer kaynaklarla doğrulamaları önerilmektedir. Örneğin; hekimlerin buradaki bilgilerin doğru olduğu ve tavsiye edilen dozda veya uygulama kontrendikasyonlarında değişiklik olup olmadığını uygulamayı düşündükleri ilâçların kutularında bulunan prospektüslerini okuyarak doğrulamalıdırlar. Bu öneri yeni veya sık kullanılmayan ilâçların kullanımında daha da önem kazanmaktadır.

Bu kitapta kullanılan ürün isimleri, patentler. kaydedilmiş markalar veya patentli isimlerdir. Bu nedenle bir ismin marka olarak bildirilmemesi, yayıncının tasviri olarak yorumlanmamalıdır.

HABİTAT
www.habitatyayincilik.com
HABİTAT YAYINCILIK SATIŞ TEMSİLCİLERİ
• *CERRAHPASA TIP KİTABEVİ*
• *DEFNE YAYINCILIK*

İÇİNDEKİLER

Çeviri Editörünün Önsözü ..... **ix**

Önsöz ..... **xi**

Giriş ..... **xiii**

Yazarlar ..... **xix**

Katkıda Bulunanlar ..... **xxv**

BÖLÜM 1: Temel Konseptler: Sperm Fizyolojisi ve Patolojisi

1. Spermatozonun Anatomisi ve Moleküler Morfolojisi **1**

- Christaan F. Hoogendijk, Thinus F. Kruger, Roelof Menkveld

  Çeviri: *Op.Dr. Deniz Abat, Doç.Dr. Erkan Demir*

2. Sperm Motilitesinin Fizyolojisi ve Patofizyolojisi **9**

- Michaela Luconi, Elisabetta Baldi, Gustavo F. Doncel

  Çeviri: *Op.Dr. Onur Karslı, Doç.Dr. Erkan Demir*

3. Erkek Üreme Sisteminin Patofizyoloji ve Genetiği **27**

- Christian F. Hoogendijk, Ralf Henkel

  Çeviri: *Op.Dr. Fikret Önol*

4. Erkek Gamet Hücresinin Fertilizasyon ve Embriyogeneze Katkısı **39**

- Gerardo Barfesol Sergio Oehninger

  Çeviri: *Op.Dr. Emir Şahbal*

5. İnsanda Sperm Hücrelerinin Genom Yapısı: Erkek İnfertilitesi ve Gebelik Başarısı Üzerine Olası Etkileri **61**

- Olga Mudrak, Andrei Zalensky

  Çeviri: *Prof.Dr. Kaan Aydos, Yrd.Doç.Dr. Sena Aydos*

6. Sperm Patolojisi: Patojenik Mekanizmalar ve Desteklenmiş Üremede Doğurtganlık Potansiyeli **71**

- Hector E. Chemes, Vanesa Y. Rawe

  Çeviri: *Op.Dr. Emre Huri, Doç.Dr. Ali Ayyıldız*

7. Testiküler Disgenezis Sendromu: Biyolojik ve Klinik Önemi **89**

- Niels Jorgensen, Camilla Asklund, Katrine Bay, Niels E. Skakkebaek

  Çeviri: *Uzm.Dr. Sema Nur Ayyıldız, Doç.Dr. Ali Ayyıldız*

BÖLÜM 2: Erkek İnfertilitesinin Tanımı

8. Subfertil Erkeğin Değerlendirilmesi 97

- Agnaldo P. Cedenho

  Çeviri: *Doç.Dr. Fikret Erdemir, Doç.Dr. Mete Kilciler*

9. Temel Semen Analizi 117

- Roelof Menkveld

  Çeviri: *Doç.Dr. Fikret Erdemir, Uzm.Dr. Uğur Boylu, Doç.Dr. Mete Kilciler*

10. Erkek İnfertilitesi Otomatik Sperm Morfolojisi Değerlendirmesinde İlerlemeler..... 141

- Kevin Coetzee, Thinus F. Kruger

  Çeviri: *Op.Dr. İbrahim Dönmez, Doç.Dr. Bülent Akduman*

11. Klinikle Uyumlu Sonuçlar için Sperm Morfoloji Eğitimi ve Kalite Kontrol Programları Temeldir..... 151

- Daniel R. Franken, Thinus F. Kruger

  Çeviri: *Op.Dr. İbrahim Dönmez, Doç.Dr. Bülent Akduman*

12. Fertilizasyonu Öngörmede Akrozom İndeksinin Prediktif Önemi..... 157

- Roelof Mekveld

  Çeviri: *Op.Dr. Ahmet Bostancı*

13. Akrozom Reaksiyonu: Fizyolojisi ve Bunun Klinik Pratikteki Önemi 163

- Daniel R. Franken, Hadley S. Bastiaan, Sergio Oehninger

  Çeviri: *Op.Dr. Ahmet Bostancı*

14. Sperm-Zona Pellucida Bağlanma Analizleri..... 173

- Sergio Oehninger, Murat Arslan, Daniel R. Franken

  Çeviri: *Op.Dr. Ahmet Bostancı*

15. Spermdeki DNA Hasarının Saptanması..... 185

- Ralf Henkel

  Çeviri: *Yrd.Doç.Dr. Cabir Alan, Op.Dr. Emre Ulukaradağ*

16. Erkek İnfertilitesinde Kromozomal ve Genetik Anormallikler 197

- Pasquale Patrizio, Jose Sepulveda, Sepideh Mehri

  Çeviri: *Yrd.Doç.Dr. Cabir Alan, Op.Dr. Fatih Altunrende*

17. Reaktif Oksijen Türleri ve Fertilite Üzerine Etkileri..... 209

- R. John Aitken, Liga E.Bennets

  Çeviri: *Yrd.Doç.Dr. Güldem Kilciler, Op.Dr. Koray Erten*

18. Erkek Subinfertilitesinin Tanımlanması ve Genel Populasyondaki Oranı 221
- T. Igno Siebert, F. Haynes van der Merwe, Thinus F. Kruger, Willem Ombelet

  Çeviri: *Op.Dr. Murat Yıldız*

19. DNA Fragmantasyonu ve Fertilizasyon ve Gebelik Üzerine Etkisi 229
- Ralf Henkel

  Çeviri: *Yrd.Doç.Dr. E. Oğuz Güven*

20. Embryolog Bakış Açısıyla Paternal Faktörün Embryo Kalitesi ve Gelişmesi Üzerine Etkisi 241
- Marie-Lena Windt

  Çeviri: *Yrd.Doç.Dr. E.Oğuz Güven*

BÖLÜM 3: Erkek İnfertilitesinde Tedavi Alternatifleri

21. Erkek İnfertilitesinin Kliniği 253
- Murat Arslan, Sergio Oehninger, Thinus F. Kruger

  Çeviri: *Op.Dr. Koray Erten*

22. Erkek İnfertilitesi Tedavisinde Ürolojik Girişimler 267
- Victor M. Brugh, Donald F. Lynch Jr.

  Çeviri: *Doç.Dr. Mete Kilciler*

23. Erkek İnfertilitesinin Medikal Tedavisi 277
- Gerhard Haidl

  Çeviri: *Doç.Dr. Mete Kilciler*

24. Erkekte Ürogenital Sistem Enfeksiyonları: Tanı ve Tedavi 287
- Frank H. Comhaire, Ahmed MA Mahmoud

  Çeviri: *Op.Dr. Mehmet Öder, Op.Dr. Halilibrahim Çam*

25. HIV Enfeksiyonlu Erkekler için Sperm Yıkama Teknikleri: Açıklama ve Deneyim 293
- Gary S. Nakhuda, Mark V. Sauer

  Çeviri: *Op.Dr. Mehmet Öder, Op.Dr. Halilibrahim Çam*

26. HIV Uygunsuz Çiftlerin Tedavisi: İtalyan Tecrübesi 303
- Augusto E. Semprini, Lital Hollander

  Çeviri: *Op.Dr. Mutlu Kilciler, Yrd.Doç.Dr. Güldem Kilciler*

27. Homolog ve Donor Spermin Kullanıldığı Artifisyel İnseminasyon 315
- Willem Ombelet, Martine Nijs

  Çeviri: *Op.Dr. Mutlu Kilciler*

28. İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu: Mevcut Teknik ve Sonuçlar.....331

- André Van Steirteghem

  Çeviri: *Op.Dr. Mutlu Kilciler*

29. İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu için Sperm Elde Etme Teknikleri.....339

- Valérie Vernaeve, Herman Tournaye

  Çeviri: *Doç.Dr. Mete Kilciler*

30. Sperm Tarafından Hyaluronik Asidin Bağlanması: Erkek Fertilitesinin Değerlendirilmesi ve İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu için Sperm Seçimi 349

- Gabor Huszar, Atilla Jakab, Ciler Celik-Özenci, G Leyla Sati

  Çeviri: *Op.Dr. Halilibrahim Çam, Op.Dr. Mehmet Öder*

31. Spermatozoanın İn Vitro Matürasyonu 359

- Rosália Sá, Mário Sousa, Nieves Cremades, Cláudia Alves, Joaquina Silva, Alberto Barros

  Çeviri: *Dr. Ali Furkan Batur, Doç.Dr. İlker Şen*

32. İnfertil Erkek Hastanın Değerlendirilmesi ve Yönetiminde Yeni Gelişmeler 385

- Darius A Paduch, Marc Goldstein, Zev Rosenwaks

  Çeviri: *Dr.Ali Furkan Batur, Doç.Dr.İlker Şen*

ÇEVİRİ EDİTÖRÜNÜN ÖNSÖZÜ

Son yıllarda teknolojideki gelişmeler tıp alanındaki gelişmelere de yansımıştır. Tıptaki gelişmeler paralelinde erkek infertilitesi de bundan etkilenmiştir. Sergio C Oehninger ve Thinus F Kruger'in editörlüğünü yaptığı 'Male Infertility' kitabı bu konuda çok güzel bir kaynaktır. Her bölümü konusunda uzman kişilerce kanıta dayalı tıp verileri kullanılarak ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Bu kitabın Türkçe baskısını Türk tıbbına kazandırmanın mutluluğunu yaşamaktayım.

Çeviri editörü olarak birçok kez okuyup düzeltme yaptığım halde, gözden kaçabilmiş olan yazım ve imlâ hatalarından dolayı sayın meslektaşlarımın affına sığınıyorum.

Kitabın çevirisi için benimle beraber titizlikle çalışan değerli meslektaşlarıma ve Habitat Yayıncılık çalışanlarına teşekkür ederim.

Doç. Dr. Mete Kilciler

x

ÖNSÖZ

İnfertilite problemi bulunan çiftlerin yaklaşık yarısında, erkek partnerde sperm yetersizliği bulunur. Erkek infertilitesi çok özel iki karakteristiğe sahiptir:

Birincisi, çoğu vakada sperm yetersizliğinin patolojik detayları anlaşılmamakla birlikte, bu problemi çözen çok iyi tedavi modelitesi bulunmakta ve bir sonraki nesil erkek partnerin genetik mesajı olarak taşınmaktadır. Bu tedavi modelitesi tabiî ki intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) dur. Bu başarılı tedavi erkek infertilitesindeki fizyopatalojisi aciliyetini azaltmaktadır. Maalesef, bu (ICSI) yöntem, takip eden nesil döllerinde artan sperm defektine yol açabileceğine dair görüşler ve bazı deliller bulunmaktadır.

1., 2. ve 3. bölümlerde bu alanda nelerin bilindiği, sperm yetersizliğinin fizyopatolojisinde daha ileri araştırmalar için başlangıç noktasına yardımcı olacaktır. Bu kısımlarda ayrıca, klinisyenlere genetik yapısı bozuk spermler ile yapılan ICSI sonucunda bir sonraki nesillere geçebilecek defektler konusunda uyarılarda bulunulmaktadır. Şüphesiz ICSI, diğer yöntemlerle çocuk sahibi olamayan aileler için bu tedavi sonrası çocuk sahibi olma mutluluğuna neden olan ana tedavilerden, bilimde "blockbuster" diye nitelenen en önemli atılımdır.

Erkek infertilitesinin ikinci özel karakteristiği, tanısının alanı olmayan ve infertiller tarafından sıklıkla başvurulan uzmanlar -Jinekologlar- tarafından konmasıdır. Bu yüzden bu kitabın editörlerinin üreme problemlerinde ve erkek infertilite problemlerinde çok iyi uzman jinekologlar olması sürpriz değildir. Bu nedenle androlojinin alt dalları çoğunluğunu obstetrik ve jinekolojiye ait geniş alanın oluşturduğu çatı altında doğdu. Erkek infertilitesindeki özel problemler ürologlar, bazı ülkelerde dermatologlar tarafından tedavi edilir. Ancak tedavide son basamak, örneğin ICSI invitro fertilizasyon teknolojisi üreme endokrinologlarının parmakları arasındadır.

Erkek infertilitesi: Tanı ve Tedavi insan androlojisi hakkındaki güncel bilgilerin sentezi ve IVF döneminden önce erkek infertilite problemlerinin çözümünde gerçek ilerleme, yeni bir perspektif getirdiğinin farkına varan obstetrik ve jinekoloji bölümleri tarafından gelmesi dikkat çekicidir.

Bu düşüncelere rağmen editörler erkek infertilitesine yaklaşımda sadece üreme endokrinologlarının perspektifinden değil ayrıca ürolog, dermatolog, tıp bilim adamlarının bakış açısını tamamen gözden geçiren seçkin katılımcıların listesini bir araya getirdi.

Androloji yukarıda belirtildiği gibi bir disiplin anlamına gelmez. Bununla birlikte bu kitap infertilitenin büyük çoğunluğunun çözümüne dinamik yaklaşımın sanatsal ve bilimsel güncel anlayışların bir özetidir.

Howard W Jones Jr MD
Proffessor Emeritus, The Jones Institute for Reproductive Medicine
Department of Obstetrics & Gynecology
Eastern Virginia Medical School
Norfolk, VA
USA

GİRİŞ

Çocuksuz çiftler ile görüşen doktorlar erkek infertilitesinin yüksek sıklığının farkındadır. En son tahminler erkek infertitilitesinin, infertilite için değerlendirilen vakaların % 40-50 oranında olduğunu bildirmektedir. Erkek infertilitesi için bir çok sebep bulunurken tedavi yöntemleri geleneksel yöntemlerde sınırlıdır. Ürolojik ve tıbbi girişimler, tanımlanmış klinik senaryolarda başarılı bir şekilde yerine getirildi ve getiriliyor. Ancak tartışmasız yardımlı üreme teknolojilerinin giderek artan büyüme ve verimi androloji alanının yönünü değiştirdi.

Şüphesiz intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sadece infertilite tedavisinde değil aynı zamanda klinik androloji disiplininin daha ileri gelişmesini sağlayarak anlamlı gelişme oluşturmuştur. Fertilizasyona yardımcı bir mikroteknik olarak ICSI, semen parametreleri belirgin bozulmuş erkeklerin (antisperm antikorlu ya da antikorsuz oligo-asteno-teratozoospermi patolojilerinin tek ya da kombinasyonlarının olduğu hastalarda, hatta obstruktif ya da nonobstruktif azospermili hastalarda) kendi istekleri doğrultusunda aile kurmasına izin verir.

Spermatozoalar, oositleri dölleme ve embriyo gelişimine neden olma gibi özel fonksiyona sahip yüksek diferansiye hücrelerdir. Fonksiyonel olarak olgun sperm hücreleri hücre diferansiasyonu, çoğalması (mitoz), haploid safhanın oluşması (mayoz) ve dramatik bir metamorfozu (spermiyogenezis) içeren kompleks spermatogenesis işlemininin sonucudur. Spermatozoa daha ileri matürasyonel; yapısal, kimyasal ve fonksiyonel değişikliklerin (kapasitasyon) oluştuğu epididimlere salınır (spermiasyon). Gametogenez ve seminifer tüplerinin fonksiyonları sıkı endokrin ve parakrin kontrol altında olur. Oositi başarılı bir şekilde döllemek için, spermatozoonun kritik fonksiyonlarından olan migrasyon, zona pellusidanın tanınması ve bağlanması, zona pellusidanın penetrasyonu, oolemmaya bağlanma, oositin akivasyonu, nükleer dekondensasyon ve singamiyi oluşturan pronükleer oluşumuna katılımını yerine getirilebilmelidir. Bu kompleks olaylar dizisi hatalar için bir çok potansiyel fırsata ve bir sürü patojenik mekanizmaya bağlı engellere neden olur.

Erkek infertilitesi için güncel tedavi seçenekleri büyük sayıda ürolojik prosedürleri (duktal obstrüksiyon vakalarında rekontrüksiron cerrahisi, varikoselin düzeltilmesi ve diğerleri), tibbi-farmokolojik tedaviler (hormon kullanımı, antibiyotikler), yardımcı üreme teknikleri (intrauterin inseminasyon tedavisi gibi) ve daha ileri ve karışık olan ART'yi içermektedir. Çağdaş tedaviler ile erkek infertilitesinden madur çiftlerin konsepsiyon fırsatı artmasına rağmen sıklıkla bu çözümler kesin etiyoloji veya patofizyolojik tanı eksikliğini artırmaktadır. Erkek infertilitesi vakalarının büyük çoğunluğu, ne yazık ki hâlâ 'idiyopatik' olarak düşünülür.

Dünyadaki ilk *in vitro* fertilizasyon çocuğu, Louise Brown, 1978 yılında İngiltere'de Bourn Hall'da doğdu. Louise'i Avusturalya'da 1980'de, ABD'de Norfolk'ta 1981 (Elizabeth Carr), kıta Avrupası'nda 1982'de ve Güney Afrika'da Tygerberg'de 1982'de ilk IVF doğumları izledi (Fauser ve Edward 2005 yılında derlendi). Erken 1980'lerden itibaren IVF etkinliği, transfer siklusu başına klinik gebelik oranlarında orta yaşlılarda bireysel prognoz grubu ile karşılaştırıldığında %30-50'ye ulaşan dramatik artış gerçekleştirmiştir. Bu başarılı sonuçlar, gelişmiş over stimulasyon protokolleri, optimize gamet ve embriyonun *in vitro* kültür durumları, oositlerin geri alınması ve embriyo transferinde üstün teknikler ve daha etkin kryopreservasyon programlarının gelişmesi için devam eden çabalar ile elde edildi. Androloji alanında yardımcı üreme tekniklerindeki (ART) gelişmelere paralel gittikçe artan büyüme olmaktadır. En önemli kayda değer bazı köşe taşları ve birkaç ilgili klinik yazılar belirtildi:

Bu kitaptaki konuların tümü en yaygın erkek infertilitesindeki patojenik mekanizmalar ve en gelişmiş tanı yöntemleri ve infertil erkek için güncel uygun tedavi seçeneklerinin detaylı tariflerini güncel yaklaşımlarla anlatmaktadır. Kitabın düzenlenmesi bu amaçları taşır. Her bir bölümde güncel ve bütün referans listeleri desteklenen objektif deliller bulunmaktadır. Katkıda bulunan yazarlar, tıp öğrencileri, mezuniyet sonrası, üreme ile ilgili doktorlar ve bilim adamlarını içeren değişik okuyucular tarafından kolayca okunup ve anlaşılabilen bölümler ve özet bilgiler sunmaktadır.

Gerçekten de genel beklenti uzmanların (androloglar, üreme endokrinologlar, obstetrik ve jinekologlar, ürologlar, yoğun bakım hekimleri) buradaki bilgilerden faydalanmasıdır. Bizim amacımız tarama test ve tekniklerinin reçetelerini içeren kılavuz sunmak değil ancak kanıta dayalı tıpla desteklenen klinik uygulamaların arkasındaki mantığı incelemektir. Bu düşüncelere rağmen yöntemler özetle bahsedilmiş ve konuyla ilgili okuyucular daha teknik detaya, geniş belirtilmiş kaynakça arasından ulaşabilir.

Biz yedi kıtanın altısında bulunan (Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Afrika, Avustralya ve Asya) önde gelen ve uluslararası yazarlar gurubunu bir araya getirmekle şanslıydık. Bu multidisipliner yazarlar grubu erkek infertilitesi alanına öncülük eden ve/veya seçkin katkılar sağlamak gibi anlamlı etkiye sahip bilim adamları ve klinisyenlerden oluşmaktadır.

Bölüm 1'de *'temel kavramlar: sperm fizyolojisi ve patolojisi'* ciddi olarak tartışılmaktadır.

Kısım 1'de, CF Hoogendijk, TF Kuruger ve R Menkvelt (Güney Afrika) *'spermatozoonun fonksiyonel anatomisi ve moloküler morfolojisi'*nin özetini sağlamaktadırlar. Yazarlar insan spermatozonun temel anatomisini ışık ve elektron mikroskop yöntemi ile taslağını çizdiler. Ek olarak kromozomal düzenlenme ve sperm nükleer kromatinin ileri derecedeki organizasyonunu tartışmaktadırlar.

Kısım 2'de M Luconi ve E Baldi (İtalya) ve GF Doncel (ABD*) 'sperm hareketinin fizyolojisi ve patolojisi'*ni anlatmaktadırlar. Yazarlar sperm hareketinin makro kimyasal temelini sperm motilitesinin kazanılması ve devamı, kemotaksis ve hiperaktivasyonunu içeren düzenleyici faktörlerindeki özel önemini doğrulukla tarif etmişlerdir. Yazarlar ayrıca erkek infertilitesinin ana nedenlerinden bir tanesi olan moleküler defektle birlikteki astenozoospermili sperm patolojisini sistematik şekilde bu konuyla ilgili *in vitro* tedavi yaklaşımlarını tartıştılar.

Kısım 3'de CF Hoogendijk ve R Henkel (Almanya ve Güney Afrika), *'insan erkek üremesinin genetiği ve patofizyolojisi'*ni tarif etmişlerdir. Bu bölüm spermatogenezisin değişik basamakları, nükleer kromatin organizasyon düzeyleri ve spermatozoonun erken embriyogenezisindeki rolünde etkili genetik kontrollerin detaylarını incelemiştir.

Kısım 4'de G Barosso (Meksika) ve S Oehninger (ABD) *'Erkek gametin fertilizasyon ve embriyogenesise katılımı'* anlatılmıştır. Delillerin büyük çoğunluğu gösterdi ki: (1) fertilizasyonu sağlayan spermatazoon, paternal DNA ulaştırılmasını sağlayarak zigotun gelişiminde önemli bir rol oynar; ve (2) sperm disfonksiyonuna sahip, değişik 'klasik' semen parametreli olan veya olmayan infertil erkekler hatalı embriyogenezise neden olan sperm disfonksiyonuna sahiptirler. Bu inceleme embriyonik gen ekspresyonunun ana aktivasyon öncesi ve sonrasında ortaya çıkan paternal etkilerin incelenmesi üzerine yoğunlaşmıştır.

Kısım 5'de O Mudrak ve A Zalensky (ABD) *'İnsan sperm hücrelerindeki genetik yapı: erkek infertilitesi için muhtemel imalar ve tahmini gebelik ürünü'* üzerine yeni çalışmalar sunulmaktadır. Kromozom tretuarlarının yapısı, yoğunluğu ve pozisyonu, telomerlerin lokalizasyonu ve dinamik modifikasyonu, fertilizasyon boyunca, normal ve anormal durumlarda ciddi biçimde ayrıntılı olarak anlatıldı.

Kısım 6'da HE Chemes ve VY Rawe (Arjantin) *'Sperm patolojisi: yardımlı üremede patolojik mekanizmalar ve fertilite potansiyeli'* tariflendi. Yazarlar anormal spermatozoodaki yapısal ve fonksiyonel eksiklikleri karakterize eden bir disiplin şeklinde sperm patolojisini tanımlamaktadırlar. Sperm morfolojisi ve motilite bozuklukları ve nonspesifik anomaliler ile birlikteki fenotipleri detaylandırdılar.

Kısım 7'de N Jorgensen, C Asklund, K Bay ve NE Skakkebaek (Danimarka), *'Testiküler disgenesis sedromu: biyolojik ve klinik önemi'*ni anlatmaktadırlar. Testiküler kanserler, hipospadiasis, kriptoorşidizm ve düşük sperm sayısı genellikle fetal hayattan köken alan kompleks bir hastalığın, testiküler disgenesis sedromu (TDS), bulgularıdır. TDS'nin etiyolojisi hakkındaki bilgi halen sınırlıdır, fakat çevresel ve yaşam

tarzına ait faktörler katkıda bulunmaktadır. Yazarlar genetik polimorfizm veya aberrasyonların nasıl bazı özellikle bireysel ekzojen faktörlere hassas olduğunu sofistike bir tanımla sunmaktadır.

Bölüm 2'de '*Erkek infertilitesinin tanısı'* tartışılmaktadır. IVF ve ICSI temel etkilerine rağmen, erkek infertilitesini değerlendirme ve tedavisinde yaklaşım ART den daha basittir. İnfertil çiftlerin başlangıç taramasında geniş bir anamnez ve tam bir fizik muayene çok önemlidir. Androlojik değerlendirmedeki köşe taşı tüm vakalardaki tekrarlanan semen analizidir. Ürolojik, endokrin, genetik ve /veya görüntüleme yöntemleri uygun olarak uygulanmalıdır.

Kısım 8'de AP Cedenho (Brezilya), *'Subfertil erkeklerin değerlendirilmesi'*ni tarif etmektedir. Bu bölüm tamamen infertilite nedeniyle konsülte edilen erkek partnerin klinik değerlendirilmesini, anemnez ve fizik muayene bulgularına göre daha ileri bireyselleştirilmiş planlamaların nasıl olacağını tarif etmektedir.

Kısım 9'da R Menkveld *'Temel semen analizi'*nde labarotuvar performansı, sonuçların yorumunu ve kalite kontrol klavuzunu içeren mükemmel bir katkı sağladı.

Kısım 10'da K Coetzee (Yenizelenda) ve TF Kruger *'Otomatik sperm morfolojisi evalüasyonundaki gelişmeler'*deki geniş deneyimlerini anlatmaktadırlar. Otomatik sistemler objektiviteyi, doğruluğu ve sperm morfolojisinin üreyebilirliğini değerlendirebilmeyi güçlü şekilde artırdılar. Bu seçenek çekici gözüktüğü kadar rutin adroloji laboratuarlarında çok fazla yer almamıştır. Sistemlerin objektif biyolojik çözünürlüğü yüzünden, şuan ki operasyondaki sistemlerin çoğu daha deneysel alanlarda kullanılmaktadır.

Kısım 11'de DR Franken (Güney Afrika) ve TF Kruger niçin '*Sperm morfoloji eğitimi ve kalite kontrol programlarının anlamlı klinik sonuçlar için zorunludur'*a güçlü bir bakış sağlamaktadır. Yazarlar prospektif çalışmaların, devalı takibin programın bir parçası olduğu durumlarda, eksternal kalite kontrol programının başarılı olarak uygulanabileceğini net olarak göstermekte olduğunu anlatmaktadırlar.

Kısım 12'de R Menkveld '*Akrozom indeksinin fertilizasyon sonucunu tahminindeki rolü*'nü güncellemektedir. Eldeki kanıtlar, dikkatli akrozom morfolojisi değerlendirilmesinin sperm fertilizasyon kapasitesi hakkında artan bilgi sağladığı görüşünü desteklemektedir.

Kısım 13'de DR Franken, HS Bastian (Güney Afrika) ve S Oehninger '*Akrozom reaksiyonu: fizyoloji ve klinik kullanımdaki yeri'*ni bütün bir sunumunu aktarmaktadırlar. Basit ve yeni bir mikroassayin minimal volümlerde çözülebilir zona pellusida kullanılması vurgulanmaktadır. Yazarlar bu tarz testlerin, uygun klinik uygulamaya rehberlik etmesi için subfertil erkeklerin spermlerinin fonksiyonel değerlendirilmesinin uygulanması sonucuna varmaktadır.

Kısım 14'de S Oehninger, M Arslan (Türkiye) ve DR Franken '*Sperm-zona pellusida bağlanma çalışmaları*'nın detaylı gözden geçirmesini sağlamaktadır. Klinik data göstermiştir ki, başarılı *in vitro* fertilizasyon için başarılı sperm-zona bağlanması zorunludur ve bu bağlanma basamağındaki anormaliler sıklıkla subfertil erkeklerde izlenmektedir. İnsan sperm-zona pellusidasının in vitro durumlarda etkileşimi, kapasitasyon kazanımı ve tamamlaması, spesifik zona pellusida reseptörlerinin tanınma ve bağlanma ve fizyolojik akrozom reaksiyonunun başlamasını içeren bir çok sperm fonksiyonu yansıtır. Yazarlar sperm-zona pellusida bağlanması denemelerinin klinik kullanımı destekleyen belirsiz kanıtlar sağlamaktadırlar.

Kısım 15'de R Henkel (Almanya ve şimdi Güney Afrika) '*Spermdeki DNA hasarının tespiti*'ni özetlemektedir. Yazar, sperm DNA'sını incelemek için çeşitli teknikleri anlatmakta ve DNA bütünlüğü ve hasarı için testlerin rutin androlojik laboratuar çalışmalarına katılmasını zorlayıcı bir görüş anlatmaktadır.

Kısım 16'da P Patrizio, J Sepulveda ve S Mehri (ABD) *'Erkek infertilitesindeki kromozomal ve genetik anomaliler'* doğru olarak gözden geçirilmektedirler. Yazarlar infertil erkeklerde tanı alan genetik ve kromozomal bozuklukların tanı yöntemleri ve klinik öneminde olduğu gibi özetlemektedirler.

Değerlendirilen bilgilere dayanarak infertil erkek/çiftlerin ICSI öncesi ve sonrası genetik evalüasyon için bir algoritm tanımı taslağı çizmektedirler.

Kısım 17'de RJ Aitken ve LE Bennetts (Avustralya) hassas bir şekilde *'Reaktif oksijen radikalleri ve fertilite üzerine etkileri'*ni tanımladılar. Yazarlar reaktif oksijen türlerinin aşırı yapımı veya maruziyetinin, istatistiki ve nedensel olarak defektif sperm fonksiyonu ve DNA hasarı birlikteliğini gayet açık bir şekilde gösterdiler.

Kısım 18'de TI Siebert (Güney Afrika), TF Kruger (Güney Afrika) ve W Ombelet (Belçika) *'Erkek subfertilitesini nasıl tanımlamalıyız ve genel populasyondaki sıklığı nedir?*'i özetlediler. Yazarlar erkek subfertilitesi/infertilitesinin tanımı ve onların sorunlarını eleştirisel olarak tartıştılar ve dünya çapında elde edilen tecrübelere dayanan yeni eşik değerler anlatılmaktadır.

Kısım 19'da R Henkel (Almanya ve şimdi Güney Afrika) *'DNA fragmantasyonu ve fertilizasyon ve gebelik sonucuna etkisi'* hakkında detaylı bilgi sunulmaktadır. Geçen birkaç yıldan beri bilim adamları ve klinisyenlerin ilgisi, fertilizasyon ve gebelik üzerine ciddi etkisi bulunan parametreler olan, sperm DNA sının fragmantasyonunu içeren ve fertilizasyona etkisi üzerine yoğunlaştılar. Yazar spermatogenesiz ve sperm matürasyonu boyunca DNA hasarına neden olan potansiyel mekanizmaları tamamen tariflemiştir.

Kısım 20'de M - L Windt (Güney Afrika) *'Embriyo kalitesi ve gelişimindeki paternal faktörlerin etkisi: embriyolog bakış açıyla'* detaylı analiziyle bu konseptleri genişlettiler. Yazar IVF laboratuarında erkek faktörün etkisini hesaplamak, transfer ve embriyo seçmek için kullanılan güncel metodların sınırlarını belirledi. Embriyo seçimi üzerine birçok çalışma yoğunlaşmış ve özellikle çoğu ülkede tek embriyo transferinin başarıyla gerçekleşmesinden beri normal embriyo gelişimine katkı sağlama potansiyeline sahip genetik olarak normal spermatozoon seçim metodları güncel ve aktif araştırmadır.

Bölüm 3 '*Erkek infertilitesi için alternatif tedaviler'*i betimlemektedir.

Kısım 21'de M Arslan, S Oehninger ve TF Kruger '*Erkek infertilitesinin klinik yönetimi'*nin bütün bir tanımını oluşturdular. Yazarlar en yaygın klinik senaryoların nedeni, tanı ve tedavisini izole ve kombine oligoasteno- teratozoospermi üzerinde durarak incelediler. Bu bölüm en iyi tanısal tarama için takip edilecek tanımlanmaış yollar sağlar.

Kısım 22'de VM Brugh ve DF Lynch (ABD) '*Erkek infertilite tedavisi için ürolojik girişimler*' üzerine güncel veriler sunmaktadır. Bu ürolog takımı varikosel tamiri, kriptoorşidizm ve orşipeksi, ejekülasyon bozuklukları, duktal obstrüksiyon, ICSI ye karşı vazovazostomi, konjenital bilateral vas deferans yokluğu ve testis biyopsi teknikleri ince bir şekilde tariflediler.

Kısım 23'de G Haidl (Almanya) *'Erkek infertilitesinin tibbi tedavisi'* özetlenmektedir. Yazar kanıtlara dayanan tıbbi seçeneklerini (1) spesifik tedavi (gonodotropinler, gonodotropin salgılatıcı hormonlar (GnRH), androjenler gibi hormon desteği endike vakalar; emisyon ve boşalma bozukluklarının tedavisi ve antienfeksiyöz ajanlar) ve (2) ampirik tedavi (antiöstrojen, aromatoz inhibitörleri, pürifiye/rekombinant folikül stimülan hormon (FSH), antioksidanlar, karnitinler, mast hücre blokörleri, fosfodiesteraz inhibitörleri, çinko tuzu, kallidinojenaz, adrenoseptör antogonistleri ve antiflojisitik tedavi) ile ilişkili tıbbi seçenekleri dikkatlice sunmaktadır.

Kısım 24'de FH Comhaire ve AMA Mahance (Belçika) *'Erkek üreme yolları enfeksiyonları: tanı ve tedavi'* üzerindeki geniş tecrübeleri paylaşmaktalar. Aksesuar üreme bezlerinin enfeksiyonu ile azalmış infertilite arasındaki ilişkinin anlaşılması bilimsel olarak mümkün ve tanı yöntemleri yeterli fakat infertilitede antibiyotik tedavisinin sonucu halen hayal kırıklığı olarak devam etmektedir. Sonraki muhtemel kronik enfeksiyon/inflamasyonun fonksiyonel geri dönüşümsüz hasarına neden olmaya bağlıdır. Yazarlar her iki basit veya cinsel yolla geçen erkek üreme yolları enfeksiyonlarından korunma, erken tanı ve uygun tedavisinin esas olarak önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Kısım 25'de GS Nakhuda ve MV Sauer (ABD) *'HIV enfekte erkekler için sperm yıkama teknikleri'* tarif etmektedirler. Yazarlar HIV pozitif erkekler ve onların enfekte olmayan bayan partnerleri için doğurganlığın önemini sağlayan klinik görüşleri gözden geçirdiler ve sperm işleme teknik yönleri ve tedavi için uygun seçenekler üzerine odaklandılar.

Kısım 26'da AE Semprini ve L Hollander *'HIV uyumsuz çiftlerin tedavileri - İtalyan tecrübesi'* üzerine yoğun gözlemlerini sundular ve HIV konusundaki kayıtları ve HIV ile enfekte erkeklerdeki güvenli babalığı tartıştılar. Bu bireylere, üreme devamlılığı ve ART ile sperm yıkama yardımlı üreme için dönüm noktasıdır.

Kısım 27'de W Ombelet ve M Nijs (Belçika) *'homolog ve donör semen kullanılan artifisyel inseminasyonun güncel durumu'*nu özetlemektedir. Yazarlar düşük kompleksiteli terapinin hafif ve orta kabul edilebilir erkek faktörlü infertiliteli çoğu vakada yüksek gebelik hızı ile sonuçlanan, invaziv ve daha pahalı yardımcı üreme teknikleri olan IVF ve ICSI 'ye başlamadan önce ilk seçenek tedavi olarak önerildiğine dair literatürde kesin kanıt olduğunu tartışmaktadır. Endikasyonlar, teknikler, sonuçlar ve maliyetinin detaylı bir tarifi sunulmaktadır.

Kısım 28'de A van Steirteghern (Belçika) *'intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu: tekniğin güncel durumu ve sonucu'* gözden geçirmektedir. Kendi merkezinde yapılan öncül işlere dayanarak yazar, ICSI tekniğini için endikasyonları, sonuç ve çocukların sağlığı (gebelik komplikasyonları, majör malformasyonları, muhtemel yan etkileri ve multiple gebelikler) tartışmaktadır.

Kısım 29'da V Verneave (İspanya) ve H Tournaye (Belçika) *'İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için sperm geri alımı'*nın endikasyonlarını ve teknikleri incelemektedirler. Yazarlar obstrüktif ve nondestrüktif azospermili hastalarda cerrahi geri alma, başarı ve sonuç için öngörülen faktörleri sofistike olarak tanımlamaktadırlar. Açık biyopsi veya perkutan ince iğne aspirasyonu ile testiküler sperm ektraksiyonu (TESE), multiple testiküler biyopsi veya tek bir testiküler biyopsi, mikrocerrahi ve konvansiyonel testiküler sperm ekstraksiyonu, kaç TESE prosedürü ve testiküler sperm ekstraksiyonun yan etkilerini içeren klinik soruların derin bir tartışmasını anlatmaktadırlar.

Kısım 30'da G Huszar, A Jakab, C Çelik Özenci ve GL Sati (ABD) '*İnsan spermi ile bağlanan hyaluronik asit: erkek infertilitesinin androlojik evalüasyonu ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için sperm seçimi'*ni özenle tarif etmektedirler. Yazarların bu grubu bir testis ekprese eden şaperon protein, sperm hücresi matürasyonu ve fonksiyonu, üreme potansiyeli ve insan spermatozoosındaki anöploid sıklığı ile birlikteki yeni kavramları tartışmaktadırlar.

Kısım 31'de R Sa, M Sousa, N Cremades, C Alves, J Silva ve A Barros (Portekiz) *'Spermatozoonun in vitro matürasyonu'*nu özetlemektedirler. Günümüzde somatik hücre - üreme hücresi yardımcı kültür sistemlerin temel başarısı, kabul edilebilir bir zaman süresince sunî olarak daha uzun canlı veya daha az fonksiyonel epitelin tutulabilmesi için minimum şartların sağlanabilmesidir. Bu araştırma grubu *in vitro* hayvan ve insan spermiyogenosisli laboratuar deneyimlerini paylaşmaktadırlar. Objektflik sadece spermatid bulunmayan bu vakalarda *in vitro* gametlerin yapımını göstermez, ayrıca seminifer epitelinde toksinlerin, hormonların ve sinyal moleküllerin etki mekanizmasının daha kontrollü çalışmalarını yapabilmektir.

Kısım 32'de DA Paduch, M Goldstein ve Z Rosenvaks (ABD) *'infertil erkeğin değerlendirilmesinde ve yönetiminde yeni gelişmeler'* ile geleceğe bir bakış sunmaktadır. Yazarlar takip eden başlıklarının önemini vurguladılar: (1) erkek infertilitesinde genetik gelişmeler; (2) çocukluk çağı ve yetişkin malignitelilerin hayatta kalanlardaki üreme sağlığı; (3) idiyopatik infertilite tedavisinde hormonal maniplasyonlar; (4) erkek infertilitesinde alternatif ve birleştirici ilaçların kullanımı ve (5) erkek infertilitesinin tibbi tedavisidir. Bir sonraki dekad erkek üremesinin genetik ve fizyolojisini anlamamızda daha iler gelişmeler ve cerrahi tekniklerin sonuçlarının daha iyi yollarla ölçülmeleri yeni tedavi seçenekleri ile kombinasyonu bize bugünün standartlarında steril olarak değerlendirilen hastaların tedavilerini önermemize izin verecektir.

Biz kitabın içeriğinden ve iyi androloji disiplininden dolayı sevinçliyiz. İleride insan infertilitesini azaltacak tedavilerin gelişmesini sağlayan, insan spermatogenezisi, sperm kapasitasyonu ve dişi gametle birleşme işlemlerinin, embriyogenezise paternal katılımda olduğu gibi, hücresel-moleküler genetik araştırmalarının genişlemesi bizleri ayrıca ümitlendirmektedir. İnsan Genom Projesi, proteomik/metabonomiklerin alanları ve translasyon araştırma geliştirme gibi, onların sonuçları ve bu çalışmaların daha klasik üreme biyolojisiendokrinoloji teknikleri ile kombine yapılması, bizi bu hedefleri başarmaya yakınlaştıracaktır.

1. Fauser BC, Edwards RG. The early days of IVF. Hum Reprod Update 2005; 11: 437
2. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cer-vical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge:Cam-bridge University Press, 1999
3. Wood C. Selection of patients. in Wood C, Trounson A, eds. Clinical in Vitro Fertilization. Philadelphia: Springer-Verlag, 1984: 31
4. Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC. Estimation of aneuploidy levels in human spermacozoa using chromo-some specific probes and in situ hybridization. Hum Genet 1984; *66:* 234
5. Martin RH. Chromosomal abnormalities in human sperm. Basic Life Sci 1985; 36:91
6. Van Uem JF, et al. Male factor evaluation in in vitro fertilization: Norfolk experience. Fertil Steril 1985; 44: 375
7. Temple-Smith PD, et al. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epi-didymis. J in Vitro Fert Embryo Transf 1985; 2:119
8. Silber S, et al. New treatment for infertility due to con-genital absence of vas deferens. Lancet 1987; 2: 850
9. Kruger TF, et al. Sperm morphologic features as a prog-nostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118
10. Patrizio P, et al. Two births after microsurgical sperm aspiration in congenital absence of vas deferens. Lancet 1988; 2: 1364
11. AcostaA, Oehniger S, et al. Assisted reproduction and treatment of the male factor. Obstet Gynecol Surv 1989; 44: 1
12. Handyside A, et al. Pregnancies from biopsied preim-plantation embryos sexed by Y-specific DNA amplifica-tion. Nature 1990; 334: 768
13. Palermo A, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 34: 17
14. Oehninger S. Place of intracytoplasmic sperm injection in management of male infertility. Lancet 2001; 357: 2068
15. Schoysman R, et al. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. Lancet 1993; 342: 1237
16. Tournaye H, et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. Fertil Steril 1994; 61: 1445
17. Mortimer D. The essential partnership beuveen diag-nostic andrology and modern assisted reproductive tech-nologies. Hum Reprod 1994; 9: 1209
18. Ombelet W, Puttemans P, Bosmans E. Intrauterine insemination: a first-step procedure in the algorithm of male subfertility treatment. Hum Reprod 1995; 10 (Suppl 1): 90
19. Silber SJ, et al. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testide biopsy. Hum Reprod 1995; 10: 148
20. Devroey P, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1995; 10: 1457
21. Reijo R, et al. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet 1996; 347: 1290
22. Kent-First MG, et al. Infertility in intracytoplasmic-sperm-injection-derived sons. Lancet 1996; 348:332
23. Bonduelle M, et al. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. Hum Reprod 1996; 11 (Suppl 4): 131
24. Ombelet W, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpre-tation of semen testing. Hum Reprod 1997; 12: 987
25. Oehninger S, Franken D, Kruger T. Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? Fertil Steril 1997; 67: 434
26. Fraser L, et al. Consensus workshop on advanced diag-nostic andrology technicjues. ESHRE Andrology Special Interest Group. Hum Reprod 1997; 12: 873
27. Pang MG, et al. Detection of aneuploidy for chromo-somes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1999; 14: 1266
28. De Jonge C. Commentary: forging a partnership benveen total quality management and the andrology laboratory. J Androl 2000; 21: 203
29. Oehninger S, et al. Sperm function assays and their pre-dictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. Hum Reprod Update 2000; 6: 160
30. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod 2001; 16:972
31. Oehninger S, Gosden RG. Should ICSI be the treatment of choice for ali cases of in-vitro conception? No, not in light of the scientific data. Hum Reprod 2002; 17: 2237
32. Adashi EY, et al. Infertility therapy-associated multiple pregnancies (births): an ongoing epiderme. Reprod Bio-med Online 2003; 7: 515
33. van der Merwe FH, et al. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. Gynecol Obstet Invest 2005; 59: 86

Yazarlar

R. John Aitken PhD ScD FRSE
ARC Centre of Excellence in Biotechnology and Development and Discipline of Biological Sciences
University of Newcastle
Callaghan, NSW
Australia

Claudia Alves BSc
Department of Genetics
Faculty of Medicine
University of Porto
Portugal

Murat Arsian MD
Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology
Mersin University, Mersin, Turkey
and
The Jones Institute for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics & Gynecology Eastern Virginia Medical School
Norfolk, VA
USA

Camilla Asklund MD
University Department of Growth and Reproduction
Rigshospitalet
Copenhagen
Denmark

Elisabetta Baldi I'hD
Associate Professor in Clinical Pathology
'DENOthe' Andrology Unit
Department of Clinical Physiopathology
University of Florence
Florence
Italy

Alberto Barros MD PhD
Cathedratic Professor and Director, Department of Genetics
Faculty of Medicine
University of Porto
Centre for Reproductive Genetics A Barros
Porto
Portugal

Gerardo Barroso MD
Professor, Dcpartamcnto de Obstetricia y Ginecologia, and Director de la Division de Reproduction Asistida
Instituto Nacional de Perinatologia
Mexico DF
Mexico

Hadley S Bastiaan PhD
Reproductive Biology Unit
Obstetrics and Gynaecology Department
Tygerberg Hospital and Stellenbosch University
Tygerberg
South Africa

Katrine Bay MSc
University Department of Growth and Reproduction Rigshospitalet Copenhagen Denmark
Liga E. Bennetts
Discipline of Biological Sciences
University of Newcastle
Callaghan, NSW
Australia

Victor M Brugh III MD
Assistant Professor, Department of Urology
Eastern Virginia School of Medicine
and
Consultant Urologist
The Jones Institute for Reproductive Medicine
Norfolk, VA
USA

Agnaldo P Cedenho MD
Professor, Laboratory of Human Reproduction
Division of Urology
Paulista School of Medicine
Federal University of Sao Paulo
UNIFESP
Sao Paulo
Brazil

Ciler Celik-Ozenci PhD
The Sperm Physiology Laboratory
Department of Obstetrics and Gynecology
Yale University School of Medicine
New
Haven,
CT USA

Hector E Chemes MD PhD
Laboratory of Testicular Physiology and Pathology
Center for Research in Endocrinology
National Research Council (CONICET)
Buenos Aires Children's Hospital, Buenos Aires
Argentina

Kevin Coetzee PhD
Fertility Associates Ltd
Newtown, Wellington
New Zealand

Frank H Comhaire MD
Professor, Center for Medical and Urological Andrology and Reproductive Endocrinology
University Hospital Ghent
Ghent
Belgium

Nieves Cremades BSc
Chief Embryologist, IVF Unit
Department of Gynecology
General University Hospital of Alicante
Spain

Gustavo F Doncel MD PhD
Professor of Obstetrics and Gynecology and Director, CONRAD Preclinical Research
Department of Obstetrics and Gynecology
Eastern Virginia Medical School
Norfolk, VA USA

Daniel R Franken PhD
Professor, Department of Obstetrics and Gynaecology
Tygerberg Hospital
Tygerberg
South Africa

Marc Goldstein MD
Professor of Urology and Professor of Reproductive Medicine
Department of Urology
Weill Medical College of Cornell University
New York, NY;
The Population Council Center for Biomedical Research
New York,
NY
and
Center for Reproductive Medicine and Infertility Weill Medical College of Cornell University
New York, NY
USA

Gerhard Haidl MD PhD
Department of Dermatology/Andrology Unit
University of Bonn
Bonn
Germany

Ralf Henkel PhD
Department of Urology Friedrich Schiller University
Jena
Germany

Lital Hollander BSc
Clinica Ostetrica e Ginecologica
Universita di Milano
Milan
Italy

Christiaan F Hoogendijk MSc
Reproductive Biology Unit
Department of Obstetrics and Gynaecology
Tygerberg Hospital
University of Stellenbosch
Tygerberg
South Africa

Gabor Huszar MD
Professor, The Sperm Physiology Laboratory
Department of Obstetrics and Gynecology
Yale University School of Medicine
New Haven, CT
USA

Attila Jakab MD
The Sperm Physiology Laboratory
Department of Obstetrics and Gynecology
Yale University School of Medicine New
Haven, CT
USA

Niels Jorgensen MD PhD
Certified Clinical Andrologist
Specialist in Medical Endocrinology and
Consultant
University Department of Growth and
Reproduction
Rigshospitalet
Copenhagen
Denmark

Michaela Luconi PhD
Associate Professor, 'DENOthe' Andrology
Unit
Department of Clinical Physiopathology
University of Florence
Florence
Italy

Donald F Lynch Jr MD
Professor and Chairman, Department of
Urology and Professor of Obstetrics and
Gynecology
Eastern Virginia Medical School
Norfolk, VA
USA

Ahmed MA Mahmoud MD PhD
Center for Medical and Urological Andrology
and Reproductive Endocrinology
University Hospital Ghent
Ghent
Belgium

Sepideh Mehri MD
Research Fellow
Yale Fertility Center
Yale University
New Haven, CT
USA

Roelof Menkveld PhD
Andrology Laboratory
Reproductive Biology Unit
Department of Obstetrics and Gynaecology
Tygerberg Hospital and Stellenbosch
University
Tygerberg
South Africa

Olga Mudrak
The Jones Institute for Reproductive
Medicine
Notfolk, VA
USA
and
Institute of Cytology
Russian Academy of Sciences
St Petersburg
Russia

Gary S Nakhuda MD
Assistant Professor, Division of Reproductive Endocrinology
Department of Obstetrics and Gynecology
College of Physicians and Surgeons
Columbia University
New York, NY
USA

Martine Nijs Mas Sc
Department of Obstetrics and Gynecology
Genk Institute of Fertility
St Jans Hospital
Genk
Belgium

Willem Ombelet MD PhD
Professor, Department of Obstetrics and Gynecology
Genk Institute of Fertility Technology
ZOL Campus St Jan
Genk
Belgium

Darius A Paduch MD PhD
Assistant Professor of Urology and Assistant Professor of Reproductive Medicine
Department of Urology
Weill Medical College of Cornell University
New York, NY;
The Population Council
Center for Biomedical Research
New York, NY
and
Center for Reproductive Medicine and Infertility Weill Medical College of Cornell University
New York, NY
USA

Pasquale Patrizio MD
Professor of Obstetrics and Gynecology
and Director
Yale Fertility Center
Yale University
New Haven, CT
USA

Vanesa Y Rawe
Laboratory of Biology, Research and Special Studies
Center of Studies in Gynecology and Reproduction
CEGyR
Buenos Aires
Argentina

Zev Rosenwaks MD
Professor of Obstetrics and Gynecology
and
Revlon Distinguished Professor of Reproductive Medicine
Center for Reproductive Medicine and Infertility Weill Medical College of Cornell University
New York, NY
USA

Rosalia Sa BSc
Lab Cell Biology
Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar
and
Department of Genetics
Faculty of Medicine
University of Porto
Porto
Portugal

G Leyla Sati MS
The Sperm Physiology Laboratory
Department of Obstetrics and Gynecology
Yale University School of Medicine
New Haven, CT
USA

Mark V Sauer MD
Professor and Vice Chairman, Department of Obstetrics and Gynecology
Columbia University and Chief, Division of Reproductive Endocrinology
College of Physicians and Surgeons
Columbia University
New York, NY
USA

Augusto E Semprini MD
Clinica Ostetrica e Ginecologica
Universita di Milano
Milan
Italy

Jose Sepulveda MD
Clinical Assistant Professor, Instituto Estudio Concepcion Humana
Monterrey, Mexico
and
Yale Fertility Center
Yale University
New Haven, CT
USA

T Igno Siebert MD
Department of Obstetrics and Gynaecology
Stellenbosch University
Tygerberg
South Africa

Joaquina Silva MD
Chief Embryologist, Centre for Reproductive Genetics A Barros Porto Portugal

Niels E Skakkebaek MD PhD
Professor, University Department of Growth and Reproduction
Rigshospitalet
Copenhagen
Denmark

Mario Sousa MD PhD
Professor, Director Lab Cell Biology
Institute of Biomedical Sciences
Department of Genetics
Faculty of Medicine
University of Porto
and
Scientific Director
Centre for Reproductive Genetics A. Barros
Porto
Portugal

Herman Tournaye MD PhD
Professor, Centre for Reproductive Medicine
Brussels Free University
Brussels
Belgium

F Haynes van der Merwe MD
Department of Obstetrics and Gynaecology Stellenbosch University Tygerberg
South Africa

Valerie Vernaeve MD PhD
Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)
IVI - Barcelona
Barcelona
Spain
Marie-Lena Windt PhD
Reproductive Biology Unit
Department of Obstetrics and Gynaecology
Tygerberg Hospital and Stellenbosch University
Tygerberg
South Africa

Andrei Zalensky PhD
Associate Professor, The Jones Institute for Reproductive Medicine Norfolk, VA USA
and
Institute of Cytology Russian Academy of Sciences St Petersburg
Russia

Andre Van Steirteghem PhD
Professor and Director, Centre for Reproductive
Medicine and Research
Centre for Reproduction and Genetics
Vrije Universiteit
Brussels
Belgium

Valerie Vernaeve MD PhD
Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)
IVI - Barcelona
Barcelona
Spain

Marie-Lena Windt PhD
Reproductive Biology Unit
Department of Obstetrics and Gynaecology
Tygerberg Hospital and Stellenbosch University
Tygerberg
South Africa

Andrei Zalensky PhD
Associate Professor, The Jones Institute for Reproductive Medicine
Norfolk, VA
USA
and
Institute of Cytology Russian Academy of Sciences
St Petersburg
Russia

Çeviriye Katkıda Bulunanlar

- Doç.Dr. Ali Ayyıldız
- Doç.Dr. Bülent Akduman
- Doç.Dr. İlker Şen
- Doç.Dr. Mete Kilciler
- Doç.Dr. Erkan Demir
- Doç.Dr. Fikret Erdemir
- Dr. Ali Furkan Batur
- Op.Dr. Halilibrahim Çam
- Op.Dr. Ahmet Bostancı
- Op.Dr. Deniz Abat
- Op.Dr. Emir Şahbal
- Op.Dr. Emre Huri
- Op.Dr. Emre Ulukaradağ
- Op.Dr. Fatih Altunrende
- Op.Dr. Fikret Önol
- Op.Dr. İbrahim Dönmez
- Op.Dr. Koray Erten
- Op.Dr. Mehmet Öder
- Op.Dr. Murat Yıldız
- Op.Dr. Mutlu Kilciler
- Op.Dr. Onur Karslı
- Prof.Dr. Kaan Aydos
- Uzm.Dr. Sema Nur Ayyıldız
- Uzm.Dr. Uğur Boylu
- Yrd.Doç.Dr. Cabir Alan
- Yrd.Doç.Dr. E. Oğuz Güven
- Yrd.Doç.Dr. Güldem Kilciler
- Yrd.Doç.Dr. Sena Aydos

BÖLÜM 1

Temel Konseptler: Sperm Fizyolojisi ve Patolojisi

1

Spermatozonun Anatomisi ve Moleküler Morfolojisi

Christaan F. Hoogendijk, Thinus F. Kruger, Roelof Menkveld

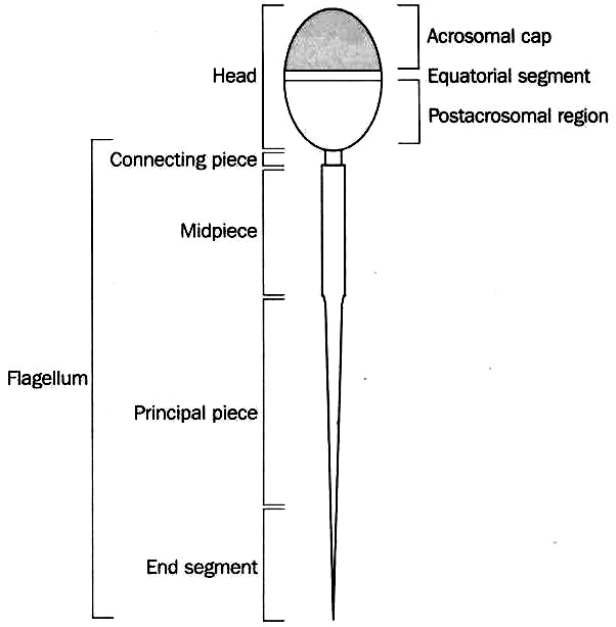
Çeviri: *Deniz Abat*[*], *Erkan Demir*[*]

GİRİŞ

Bu bölümde insan spermatozonunun anatomisinin temel karakteristiklerinin ışık ve elektron-mikroskopik özellikleri özetlenmiştir. Ayrıca, infertil erkeklerde gözlenen kromozomal aberasyonların sayısı ve anormal sperm morfolojisi sıklığının artması arasında potansiyel ilişkisi olan oldukça düzenli ve spesifik yapıları ve de kromatin paketleri olan sperm kromozomları tartışılmıştır.

SPERMATOZOANIN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK OLARAK MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Spermatozoalar oldukça özelleşmiş ve yoğunlaşmış hücreler olup büyümezler ya da bölünmezler. Bir spermatozon paternal herediter materyali (DNA) içeren bir baş ve motiliteyi sağlayan bir kuyruktan oluşur (şekil 1.1 ve 1.2). Pek çok somatik hücre özelliği gibi spermatozonun büyük bir nukleusu vardır ancak büyük sitoplazması eksiktir. Erkekler memeliler arasında ejekulatta bulunan spermatozoanın morfolojik heterojenite derecesi açısından tektir.



Şekil 1.1: *İnsan spermatozonunun ışık mikroskobundaki şematik çizimi*

Sperm Başı

Işık mikroskopi

İnsan spermatozoası ışık alanlı mikroskoplarda sabitlenmiş ve boyanmış örnekler kullanılarak sınıflandırılmıştır[2,3]. Boyanmış insan spermatozoasının başının şekli belirgin olarak farklı olmamakla birlikte orijinal semendeki canlı spermatozoanın

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Adana.

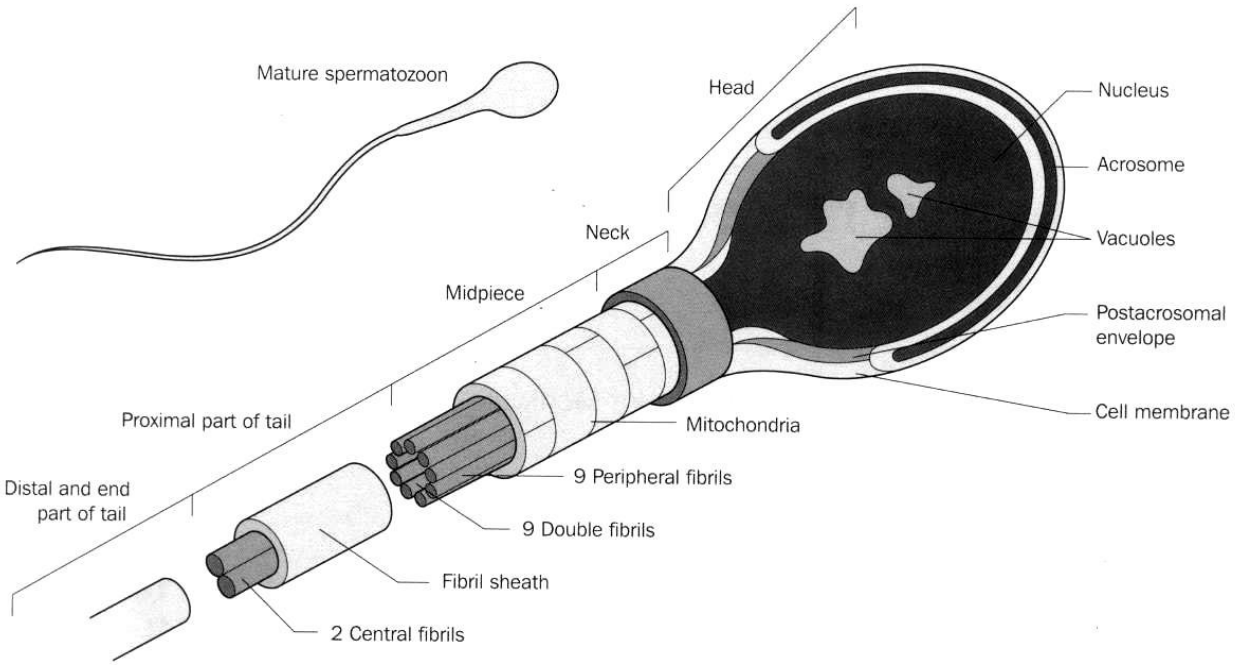
başından hafifçe küçüktür[4]. Normal baş şekil olarak oval olmalıdır. Fiksasyona ve boyanmaya bağlı olarak hafif büzüşme olmakla birlikte başın uzunluğu yaklaşık 3-5 μm ve genişliği 2-3 μm'dir. Bu değer aralığı canlı sperm başı ve Papanicolaou boyama için %95 oranında güven aralığı sağlar[4]. Koitus sonrası endoservikal kanalın mukusunda bulunan spermatozoalara dayanarak, normal spermatozoa başının birbirinden hafifçe farklı iki tipi tanımlanmıştır[3]. Birinci ve en sık görülen form ışık alan aydınlatmalı mikroskop altında tanımlanan şekliyle mükemmel düz oval şekildedir; ikinci form, oval düz veya düzgün kenarlı fakat postakrozomal uçta hafifçe incelmeye başlayan şekildedir[3]. Tüm biyolojik sistemlerde farklılık olmakla birlikte önemsiz farklılıklar normal olarak değerlendirilmelidir[3].

Büyük, küçük, gittikçe incelen, armut şekilli, şekilsiz, vakuollü (baş yüzeyinin %20'sinden fazlasını kaplayan boyanmayan vakuoler alanlar) çift başlı veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içeren baş şekil/boyut defektleri gözlenebilir[5]. İnsan spermatozoasının anterior baş bölgesinin yaklaşık üçte ikisini[2,3,5] oluşturan akrozomal bölgesi iyi tanımlanmıştır . Diğer türlerdeki gibi apikal kalınlaşma göstermez, fakat ekvatoryal kısımda oluşan, sona doğru giderken tek biçimde kalınlık/incelme gösterir. Bu incelme nedeniyle, bölge ışık mikroskobuyla değerlendirilirken daha yoğun boyanmış olarak görülür. Bu boyanma yoğunluğuna bağlı olarak akrozom sperm başının %40-70'ini kaplamış olarak görülür.

Elektron mikroskopi taraması

Elektron mikroskopi taraması (EMT) spermatozoanın yüzeysel yapılarının ayrıntılı biçimde ortaya konulması için kullanılır. Üç boyutlu görüntü özelliğine bağlı olarak, insan spermatozoasının karışık yapılarını görmek ve değerlendirmek ışık ya da transmisyon elektron mikroskobuna göre daha kolaydır.

Sperm başı, başı tam olarak çevreleyen bir çizgiyle eşit olmayan, akrozomal ve postakrozomal olarak adlandırılan iki parçaya ayrılır. Akrozomal bölge baş uzunluğunun üçte ikisi kadardır ve bazı olgularda morfolojik olarak normal kabul edilen bu bölgede bir çöküntü görülebilir. Ekvatoryal bölge her zaman EMT ile net olarak değerlendirilemez. Ekvatoryal segmentten hemen sonra spermatozoanın en kalın ve geniş yeri olarak görülen postakrozomal bölge başlar. Postakrozomal bölge iki eşit banttan oluşan posterior ring tarafından iki kısma ayrılır. Bant akrozoma yakın olarak çıkıntı yapar[1]. İnsan spermatozoasının yüzeyi, seminal plazma yıkanmadan kaba parçalar olmadan düzgün görünür. Akrozomun sadece özellikle anterior kısmı sıklıkla pürüzlü görünebilir[1].



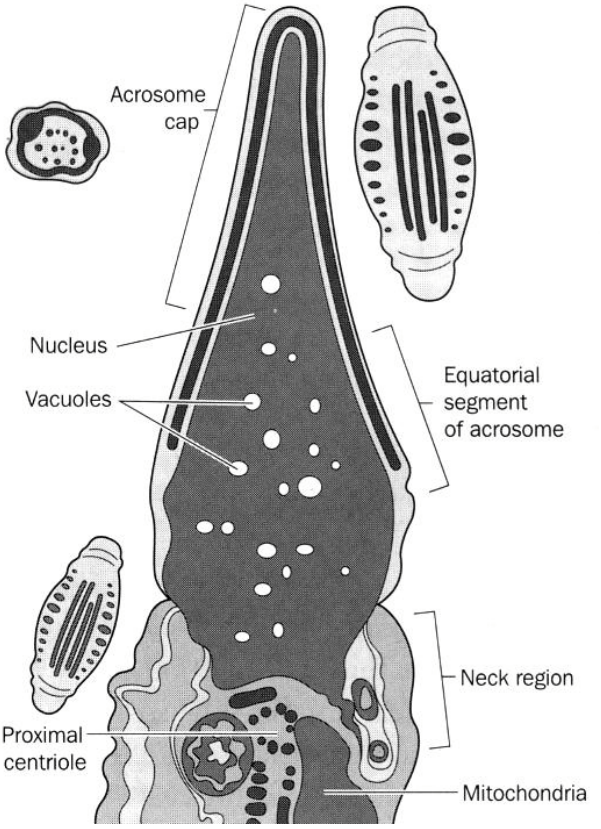
Şekil 1.2: *İnsan spermatozoasının ışık ve elektron mikroskopik şemaları*

Spermatozoanın ışık, elektron mikroskopik ve moleküler morfolojik özellikleri

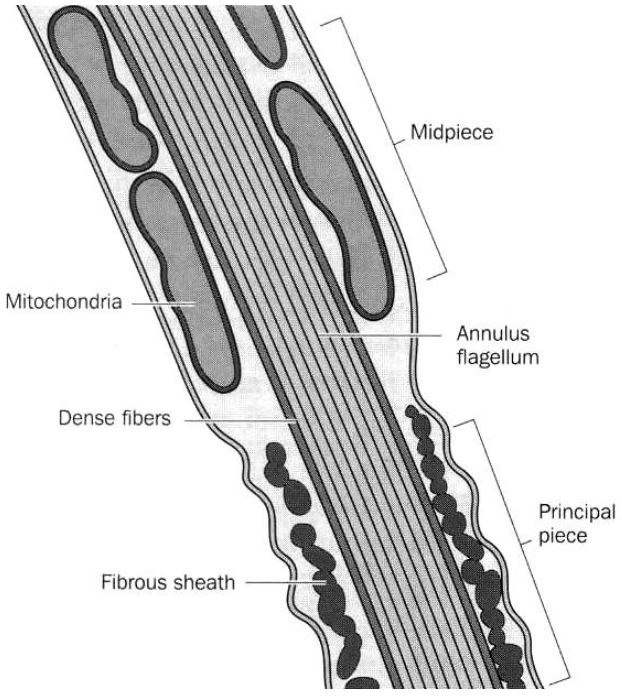
İnsan spermatozoasının elektron mikroskopik morfolojik özellikleri şekil 1.2 – 1.6'da gösterilmiştir. Sperm başı başlıca çekirdekten oluşmuş şekilde düzelmiş ovoid yapıdadır. Akrozom şapka benzeri şekilde sperm başı anteriorunun üçte ikisini sarar (şekil 1.2 ve 1.3), bu yapı spermatidin Golgi cisimciğinden oluşur ve spermatozoondan ayırır. Diğer memeli türlerinden farklı olarak, insan spermatozoasının akrozomu apikal kalınlaşma göstermez, fakat anterior kısmında tek düze kalınlaşma vardır. Akrozom fertilizasyon için gerekli hyaluronidase ve proacrosin içeren birkaç hidrolitik enzim içerir[1].

Yumurtanın fertilizasyonu sırasında akrozomun enzimden zengin içeriği akrozom reaksiyonu esnasında serbestlenir. Dış akrozomal membranın plazma membanı ile bir çok bölgeden birleşmesi sırasında akrozomal enzimler serbestlenir. Başın anterior yarı kısmı plazma ve dış akrozomal membrandan yoksun hale gelir ve sadece iç akrozomal membran kısmı sarar[6]. Akrozomun ekvatoryal kısmı akrozom reaksiyonuna katılmadığı için az veya çok intakt kalır (şekil 1.3).

Sperm başının posterior kısmı tek membran olan postnükleer şapka ile sarılmıştır. Ekvatoryal segment akrozom ve postnükleer şapkanın ile üst üstedir (şekil 1.3). Çekirdek (şekil 1.3), başın %65'ini oluşturur ve protein ile konjuge DNA içerir. Kromatinler çekirdek içinde çok yoğundur ve sıkı kromozomlar görülemezler. Sperm çekirdeğinde vakuoler görünümde tam olmayan yoğunluk olabilir. Spermatozoon tarafından taşınan genetik bilgi birçok nükleotidden oluşmuş DNA molekülü içinde şifrelenmiş ve depolanmıştır. Kalıtsal özellikler sperm çekirdekleri tarafından aktarılır[1].



Şekil 1.3: *Sperm başının longitudinal kesitinin şematik çizimi*



Şekil 1.4: *İnsan spermatozoasının orta kısmıyla baş kısmı arasındaki bölgenin longitudinal kesiti*

Moleküler morfoloji

Spermin kromozom yapısı çok karmaşıktır. Somatik hücre DNA organizasyonu ve diğerleri benzer şekilde spermatojenik hücreler için tektir. Sperm DNA paketlemesi dört evreye ayrılır.

- Evre 1: *Nükleer annulusla kromozomun sıkıca bağlanması*

Sperme has yapı olan nükleer annulusa birbirine sarılmış çıplak DNA içeren her bir kromozom sıkıca tutulmuştur. Bu yapı DNA organizasyonunun yeni bir tipi olup, kromozomal ankraj olarak adlandırılır ve yalnızca spermatojenik hücrelerde bulunur. Nükleer annulus eğri yüzük benzeri şekildedir ve yaklaşık 2 μm uzunluktadır. Şimdilik spermiogenezisin ilk olarak hangi evresinde oluştuğu bilinmemekle birlikte yalnızca sperm çekirdeklerinde bulunur. Şimdiye kadar somatik hücre tiplerinin hiçbirinde nükleer annulus benzeri yapı olduğuna dair bulgu yoktur. Aksine, hamster[7], insan[8], fare ve *Xenopus* sperm hücrelerinde olduğuna dair bulgular vardır. Bunun türlerin pek çoğunun sperm fonksiyonunda temel rol oynadığı düşünülmektedir.

Tek DNA sekanslarının nükleer annulus ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ward[9] bu sekansları NA-DNA olarak adlandırmıştır. Bu tek sekansların varlığı nükleer annulusların kromozomların özel sekanslarının uygun yerlerine ankraje olduğunu ve rasgele DNA bağlanması olmadığını düşündürmektedir. Her bir kromozomun NA-DNA bölgesi kromozomlar bir yapı üzerinde biriksin diye kromozomlar organize olurlar, nükleer annulus spermin nükleer şeklini etkileyebilir. Örneğin, hamster spermatozoonlarında, her bir kromozomun bir parçası nükleer annulusta yerleşmekle birlikte uzun kromozomlar nükleusun ince çengellerinin içine doğru uzanabilir. Bu hamster sperm nükleusunun baştan sona DNA dağılımının görüntülü analiziyle desteklenmiştir. DNA'nın yüksek konsantrasyonlarının nükleer annulusun yerleşik olduğu sperm nükleusunun alt kısmında bulunduğunu, aksine düşük konsantrasyondaki DNA'nın çengelli kısımlarda olduğu gösterilmiştir[10].

Bu hipotez spermiogenezis sırasında implantasyon çukurunun yanındaki kromatinin, yoğunlaşan ilk bölge olmasının elektron mikroskopla gösterilmesiyle daha da desteklenmiştir[11]. Sonuçta, nükleer annulus kişisel kromozom bölgeleri için özel sperm kromatin yoğunluğu açısından tek bilinen olarak görülebilir.

- Evre 2: *Sperm DNA loop bölge organizasyonu*

Ankraje olmuş kromozomlar DNA loop bölgeleri içinde organize olurlar. Nükleer matriksin kısımları, protein yapılı lifler matriks tutunma bölgeleri (MARs) olarak adlandırılan spesifik sekanslar aracılığıyla her 30-50 kb'de DNA'ya eklenirler. Bu düzenlemeyle kromozom iplikleri loop serilerinin içine dizilirler. Organizasyonun bu tipi deneysel olarak nükleer halos olarak bilinen düzenekle gözlenebilir. Halos çıplak DNA looplarından oluşur ve 25-100 kb uzunluğundadır, bunların tabanı matrikse tutunmuştur. Her bir loop bölgesi in vivo yoğunlaşmış formda kromatinin bir yapısal biriminden oluşan nükleer halo içinde görülebilir.

Loop bölgeleri içinde DNA'nın organizasyonu yapısal organizasyonunun tek tipidir ve somatik ve sperm hücrelerinde birlikte görülür. Somatik hücrelerde, DNA nükleozomların içinde kıvrılmıştır, sonraki daha fazla kıvrım 30 nm bobin biçimli lifler şeklinde ve daha sonra DNA loop bölgeleri içinde organize olmuşlardır. Sperm kromatinindeki uygun yapılar çok değişik görünümlere sahiptir. Protamin bağlanması kıvrılmanın farklı tiplerine neden olur ve DNA yoğun paketler halinde katlanmıştır fakat hala loop bölgeleri içinde organize haldedir. Memeli sperm çekirdekleri küçük miktarlarda olasılıkla nükleozomlar içinde organize olan histonları içerir[12,13] fakat DNA'ların çoğu protaminlerle tekrar organize olurlar. Bunun anlamı evrimsel baskı ile sperm DNA'sı yoğunlaşmış, kromatin yapısının loop bölgeleri içindeki DNA'nın organizasyonu dışındaki tüm yönleri kurban edilmiştir. Bu durum DNA loop bölgelerinin sperm DNA fonksiyonunda kritik rol oynadığını düşündürmektedir.

- Evre 3: *Protamin çözülmesi*

Protaminlerin bağlanması sıkıca paketlenmiş kromatinlerin içindeki DNA looplarını yoğunlaştırır. DNA protamin bağlantısı DNA'nın çok yoğunlaşabildiği toroidal veya tatlı çörek şeklini almasını sağlar[14]. Spermiogenezis sırasında somatik spermatogenik prekürsör hücrelerin DNA bağlayan proteinleri olan histonların, protaminler tarafından yeri değiştirilir. Histon bağlı DNA için protamin bağlı aynı miktar DNA'dan daha fazla hacme ihtiyaç gerek olduğundan[15], kromatin yapısındaki bu değişiklik spermiogenezis sırasında ortaya çıkan nükleer kondensasyonu biraz açıklayabilir. Protaminler DNA boyunca olan derin çukura bağlanırlar; bu DNA'yı van der Waals kuvvetiyle diğer

komşu DNA ipliklerine bağlanabilsin diye tam olarak nötralize eder. Protamin bağlanması yuvarlak spermatidde olan DNA loop bölge organizasyonunun yoğunlaşmasına ve korunmasına yol açar.

- Evre 4: *Kromozom organizasyonu*

Birkaç çalışmanın sonuçları[10,16,17] sperm nükleuslarındaki kromozomların gerçek pozisyonları üzerine sınırlı zorlukları olan tasarı modellerinin yapılmasını sağlamıştır. NA-DNA sekansları nükleusun tabanında, sentromerler merkezde ve telomerler periferal olarak yerleşmiştir. Bu üçü dışında kromozomal p ve q kollarının katlantıları esnektir.

Sperm kuyruğu

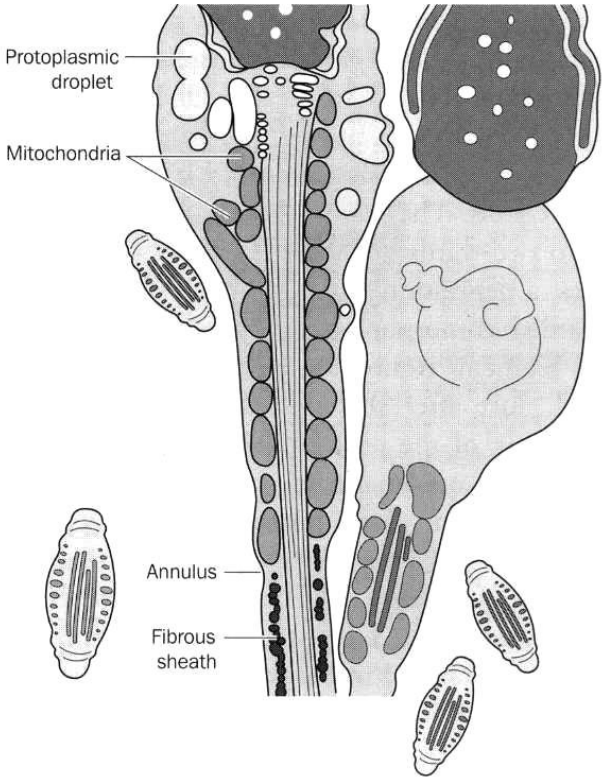
Işık mikroskobu

Sperm kuyruk oluşumu spermatid evresinde ortaya çıkar. Spermatogenezis sırasında sentriol üç parçaya farklılaşır: orta kısım, baş veya ilk kısım ve son kısım (şekil 1.1 ve 1.2). Orta kısmın uzunluğu başınkine yakındır ve bir boğumla, annulus, kuyruk kısmından ayrılır (şekil 1.5). Aşağıda kuyruk aberasyonları görülebilir:

- Boyun ve kuyruk aberasyonları yokluk (serbest veya gevşek başlar), yerleşmemiş veya eğri kuyruk (kuyruk başın uzun aksi boyunca 90° açı yapacak şekilde), gergin/düzensiz/eğri orta kısım, anormal ince orta kısım veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içerir[5].

- Kuyruk aberasyonları kısa, çoklu, keskin kıvrımlı, kırık (açılanma>90°) düzensiz genişlik, kıvrımlı kuyruk veya bunların kombinasyonunu içerir[5].

- Sitoplazmik damlaların normal sperm başı alanının üçte birinden büyük olması anormal olarak değerlendirilir. Bunlar genellikle kuyruğun boyun/orta kısım bölgesinde yerleşmekle birlikte bazı immatür spermatozoalarda kuyruk boyunca diğer lokalizasyonlarda sitoplazmik damlalar olabilir. Son kısım ışık mikroskobuyla net olarak görüntülenemez.



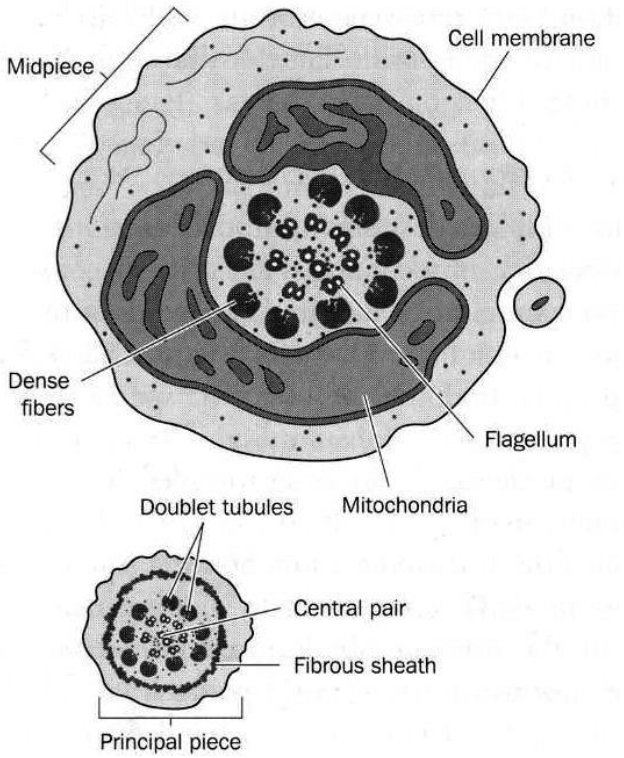
Şekil 1.5: *Orta kısmın longitudinal kesiti.*

Elektron mikroskopi taraması

EMT ile kuyruk üç parçaya ayrılır; orta kısım, baş kısmı ve son kısım. Orta kısımda mitokondriyal kıvrımlar net olarak görülebilir. Bu orta kısmın başlangıcında aniden sonlanır. Orta kısım posteriorda sona doğru daralır. Uzunlamasına kolon ve transvers dallar görülebilir. Dış liflerin yokluğu nedeniyle kısa son kısım küçük çapa sahiptir[1].

Transmisyon elektron mikroskobu

Orta kısım bir sitoplazmik parça ve helikal yapıda aksiyel filamanları saran birkaç spiral mitokondriden oluşan bir lipidden zengin mitokondrial tabaka içerir (şekil 1.2, 1.5 ve 1.6). Orta kısım sperme motilite için gerekli enerjiyi sağlar. Onbir fibrilin merkez aksiyel çekirdeği ek olarak dışarıdan halka şeklinde dokuz kaba lifle çevrelenmiştir (şekil 1.2 ve 1.6). Özel mitokondrinin etrafı, spermin oksidatif metabolizmasıyla ilişkili enzimleri içeren mitokonkondrial tabaka oluşacak şekilde dış fibrillerle sarılmıştır (şekil 1.2 ve 1.4-1.6). Orta kısmın mitokondriyal tabakası göreceli olarak kısadır, baş ve boynun birlikte uzunluğundan hafifçe uzundur[1].



Şekil 1.6: *İnsan sperm kuyruğunun enine kesiti.*

İlk kısım (ana kısım) kuyruğun en uzun kısmıdır, ileriye doğru hareket mekanizmasını sağlar. Dış halkadaki kaba dokuz fibrilin kalınlığı azalır ve sonunda biterler, ana kısmın uzunluğunun çoğunu oluşturan aksiyel merkezdeki iç fibriller yalnız olarak devam eder (şekil 1.2)[19]. Ana kısmın fibrilleri kuyruğun karşı tarafı boyunca da uzanan iki banda tutunmuş kısa kollar veya anastomoz yapmış semisirküler kollar veya dallardan oluşan fibröz kuyruk kılıfı ile sarılmıştır[1]. Kuyruk 4-10 μm uzunlukta <1 μm çapta olan son kısımla sonlanır. Çapın küçüklüğü dış liflerin, kılıfın ve mikrotübüllerin distalde yavaşça kaybolması nedeniyledir.

SPERM MORFOLOJİSİ VE KROMOZOMAL ANOPLOİDİLER

Pek çok araştırıcı anormal sperm şekli ile anoploidinin artmış sıklığı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmaların sonuçları tutarsızdır, bunun en olası nedeni, sperm aynı semen örneğinde değerlendirilmiştir aynı sperm değerlendirilmemiştir. 1991'lerde, Martin sperm karyotiplerini çalışmıştır[20]. Tüm kromozomların spermiogenezis sırasında nondisjunction olduğunu fakat G grup kromozomların (21 ve 22) ve seks kromozomlarının belirgin artmış anoploidi sıklığına sahip olduğunu göstermiştir. Florosans in situ hibridizasyon (FISH) kullanarak Spriggs ve arkadaşları[21] çoğu kromozomun yaklaşık olarak %0.1 (1/1000) sıklıkta dizomiye sahip olduğunu, aksine seks kromozomları ile 21 ve 22 kromozomların belirgin artmış anoploidi sıklığına sahip olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak seks kromozomları ile 21 ve 22. kromozomlar spermatogenezis sırasında nondisjunctiona daha yatkındırlar.

Bernardini ve ark.[22] genişlemiş başı olan spermatozoaları içeren semen örnekleriyle anoploidi ve diploidinin artmış sıklığı arasında bağlantı olduğunu düşünmüşlerdir. Diğer birkaç çalışmada morfolojik olarak anormal olan spermlerin anoploidi olması açısından belirgin artmış riske sahip olduğunu öne sürmüştür[23-27]. Farelerin oositlerine injekte edilen spermlerin değerlendirildiği ilginç bir çalışmada, şekilsiz, yuvarlak ve elonge sperm başlarının çok olduğu semen örneklerinde kromozom ve kromatid parçaları ve disentrik ve halka kromozomlar gibi yapısal kromozom anormalliklerinin arttığını ancak sayısal kromozomal aberasyonların artmadığını belirtmiştir. Ayrıca, Ryu ve ark.[29] sekiz erkeğin her birinden alınan 120 normal ve anormal spermi (Tygerberg kriterlerine göre) çalışmış, haploid çekirdeği olan spermlerin seçiminde normal morfolojinin değerli bir göstergeç olmadığını öne sürmüştür. Rives ve ark.[30] infertil erkeklerde dizomi sıklığı direk olarak oligozoosperminin ciddiyeti ile ilişkili olmakla birlikte, anoploidi sıklığı ile anormal morfoloji arasında ilişki olmadığını göstermişlerdir. Globozoospermi, kısalmış flajella sendromu veya akrozomal anormalliği olan sperm seviyeleri artmış erkeklerde, sperm şekli ve sayısal kromozomal aberasyonları arasında ilişki yoktur[31].

Başka bir çalışmada, De Vos ve ark.[32] fertilizasyona, embriyo morfolojisine ve intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) sonrası gebelik sonuçlarına özel sperm morfolojisinin etkisini değerlendirmişlerdir. Farklı morfolojik defekt bakımından gözlenmiş, şu fertilizasyon sonuçları görülmüştür; elonge başı olan spermler için %63,4 (82'de 52), sitoplazmik damlaları olan spermatozoalar için %63,3 (196'da 124), şekilsiz başı olan spermatozoalar için %59,6 (374'de 223) ve kırık boyunlu spermatozoalar için %34,1 (44'de 15). 101 injekte edilen spermatozoa iki morfolojik defektin kombinasyonunu göstermiştir (tüm fertilizasyon oranı %57,4). 6 akrozomu olmayan yuvarlak başlı spermatozoadan fertilizasyon sağla-

namamıştır ve akrozomlarında vakuoller gösteren 12 spermatozoa ile %66,6 oranında fertilizasyon sağlanmıştır. Bu yazarlar ICSI sırasında sperm morfolojisini değerlendirmenin fertilizasyon sonuçlarıyla korelasyonunun iyi olduğunu fakat embriyo gelişimini etkilemediğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca implantasyon oranları anormal spermatozoanın injeksiyonundan oluşan embriyoda düşüktür.

Son dönemde Çelik-Özenci ve ark.[33] FISH kullanarak ve Tygerberg katı kriterlerine göre objektif morfometri ve sperm boyutu ve şekil değerlendirmesi yaparak, spermatozoalarda sperm şekli ile sayısal kromozomal aberasyonlar arasındaki ilişkiyi çalışmışlardır. Sonuçlar sperm başının herhangi bir boyut veya şekilde sayısal kromozomal aberasyonların olabileceğini ancak riskin şekilsiz spermlerde arttığını göstermiştir. Normal sperm boyutu ve şeklinde diploidi daha az olmakla birlikte çoğu normal baş ve kuyruk boyutuyla normal görünümlü sperm dahi dizomik veya diploid olabilir.

SONUÇ

Özellikle elektron mikroskobik çalışmalara dayanan ultrastrüktürel özellikler olmak üzere çoğu burada açıklanan yapılar standart ışık mikroskobuyla görülemez, bu yapıların temelinin bilinmesi sperm morfolojisinin doğru değerlendirilip yorumlanması açısından çok önemlidir. Erkek fertilite potansiyelinin değerlendirilmesinde bu bilgi klinisyene yardımcı olur.

Spermin moleküler yapısı sperm DNA'sının nukleus içinde oldukça kompleks ve sıralı biçimde paketlendiğini gösterir, bununla birlikte bu organizasyonun biraz esnekliği vardır. Sperm çekirdeği içinde kromozomların nasıl paketlendiğini gösteren bilgilendirici modele şiddetle acil ihtiyaç vardır ve bu bilginin özellikle ICSI için çekirdek hazırlanması, semen örneklerinin tanısı ve fertilizasyon sonrası sperm DNA'sının kaderinin belirlenmesi gibi fertilite çalışması üzerine etkisi vardır. Sperm kromatini hakkında bilgilerimiz arttıkça görsel değerlendirmenin ICSI için sperm seçiminde güvenilir olmayan bir yöntem olduğu daha belirgin hale gelmektedir. Hyaluronik asit bağlanması gibi sperm seçimi için daha özel yöntemler ICSI sırasında spermin genetik doğruluk ve matüritesinde bozulma gibi fertilizasyon problemlerini azaltabilir.

KAYNAKLAR

1. Hafez ESE. Human Semen and Fertility Regulation in Men. St Louis: CV Mosby, 1976
2. Kruger TF, et al. Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118
3. Menkveld R, et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 4: 586
4. Katz DF, et al. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. J Androl 1986; 7: 203
5. World Health Organization. WHO Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 2nd edn. London: Cambridge University Press, 1992
6. Barros C, Franklin LE. Behavior of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg. J CellBiol 1986; 37: 13
7. Ward WS, Coffey DS. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. Biol Reprod 1989; 41: 361
8. Barone JG, et al. DNA organization in human spermatozoa. J Androl 1994; 15: 139
9. Ward WS. DNA loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. Riol Reprod 1993; 48: 1193
10. Ward WS, et al. Localization of the three genes in rhe assymctric hamster sperm nucleus by fluorescent in situ hybridization. Biol Reprod 1996; 54: 1271
11. Loir M, Courcens JL. Nuclear reorganization in ram spermatids. J Ultrastruct Res 1979; 67: 309
12. Tanphaichitr N, et al. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. Exp Cell Res 1978; 117:347
13. Choudhary SK, et al. A haploid expressed gene cluster exists as a single chromatin domain in human sperm. J Biol Chem 1995; 270: 8755
14. Hud NV, Downing KH, Balhorn R. A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensares. Proc Natl Acad Sci USA 1995:92:3581
15. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells [Review]. Biol Reprod 1991; 44: 569
16. Zalensky AO, et al. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. Chromosoma 1995; 103: 577
17. Haaf T, Ward WS. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. Exp Cell Res 1995; 219: 604
18. Ward WS, Zalensky A. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. Grit Rev Eukaryeft Gene Expr 1996; 6: 139
19. White IG. Mammalian sperm. In Hafez ESE, ed. Reproduction of Farm Animals, 3rd edn. Phtlidel-phia: Lea&Febiger, 1974

20. Martin RH. Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(3)(p25q21).AmJ Hum Genet 1991; 48: 856
21. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: the use of mulicolor FISH to test various theories of nondisjunction. Am J Hum Genet 1996; 58:356
22. Bernardini L, et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. Hum Reprod 1998; 13: 3406
23. Colombero LT, ec al. Incidence of sperm aneuploidy in relation to semen characteristics and assisted reproductive outcome. Fertil Steril 1999; 72: 90
24. Calogero AE, et al. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. Hum Reprod 2001; 16: 1172
25. Rubio C, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. Hum Reprod 2001; 16: 2084
26. Yakin K, Kahraman S. Certain forms of morphological anomalies of spermatozoa may reflect chromosomal aneuploidies. Hum Reprod 2001; 16: 1779
27. Templado C, et al. Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. Mol Reprod Dev 2002; 61:200
28. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. Hum Reprod 1 996; 11: 1942
29. Ryu HM, et al. Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology: implication for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2001; 76: 879
30. Rives N, et al. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. Hum Genet 1999; 105: 266
31. Viville S, er al. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? Case report. Hum Reprod 2000; 15: 2563
32. De Vos A, et al. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2003; 79: 42
33. Celik-Ozenci C, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. Hum Reprod 2004; 19: 2052
34. Huszar G, et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. Fertil Steril 2003; 79: 1616

2

Sperm Motilitesinin Fizyolojisi ve Patofizyolojisi

Michaela Luconi, Elisabetta Baldi, Gustavo F. Doncel

Çeviri: *Onur Karslı*[*], *Erkan Demir*[*]

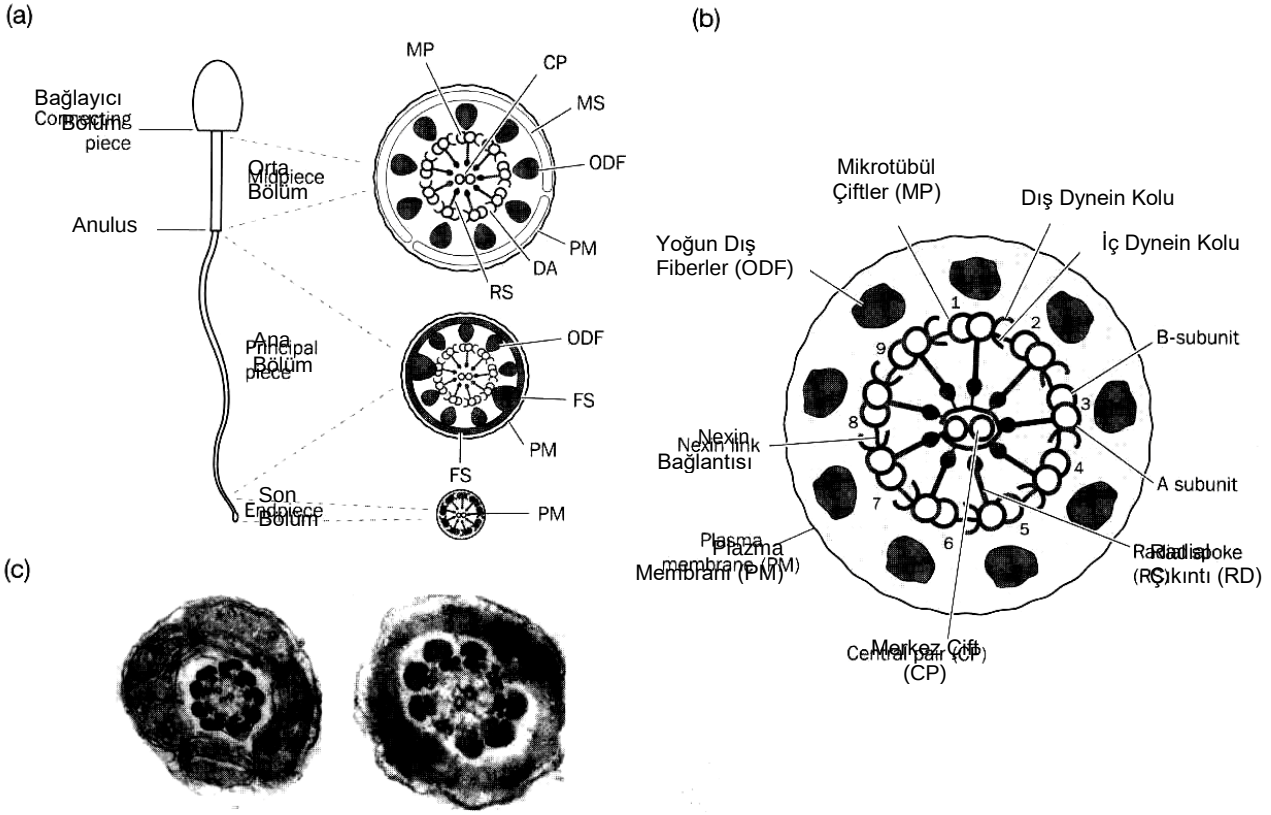
GİRİŞ

Memeli spermatozoası, testisten tubalara geçişi sırasında motil hale gelir ve yüzme kabiliyeti kazanır. Bu değişiklikler birkaç ekstra ve intraselüler faktör tarafından başlatılır ve kontrol edilir. Bu faktörlerin aynı zamanda hiperaktive edilmiş motilite ve kemotaksi elde etmeyi düzenleyen çok önemli rolleri vardır. Bu bölüm, sperm motilitesinin, hiperaktivasyonunun ve kemotaksisinin kazanılması ve korunmasını içeren düzenleyici faktörler üzerinde özel önemi olan sperm hareketinin mekanokimyasal temellerini özetlemektedir. Ayrıca erkek infertilitesinin ana sebeplerinden biri ve sperm motilitesinin azalmasıyla karakterize bir sperm patolojisi olan astenozoosperminin moleküler temellerini kapsamaktadır. Sonuç olarak bu bölüm, sperm motilitesini uyarabilen farmakolojik ve fizyolojik moleküllerdeki son bulgular ışığında astenozoospermiye sistemik ve in vitro terapotik yaklaşımları sunmaktadır.

SPERM MOTİLİTESİNİN MEKANOKİMYASAL TEMELLERİ

Spermin yüzüşü, flagellumun ritmik, üç boyutlu, asimetrik hareketi ile karakterizedir. Bu benzersiz hareket flagellumun kompleks organizasyonu tarafından temin edilir (Şekil 2.1). Sadece mikrotübüllerin merkezi çiftini içeren distal (son parça) kısım dışında bütün flagellum, aksonem olarak adlandırılan silindirik yapıda organize olmuştur. Aksonem, neksin kollarıyla birbirine bağlanan ve radial çıkıntıların merkezinde çiftleşen 9 çift tubulin A ve B mikrotübüllerinden oluşmaktadır. Her mikrotübül çifti, dışarı doğru dokuz asimetrik sık liflerle (ODF) sıkıca bağlanmıştır. Bu lifler, sperm kuyruğunun ana parçasında fibröz bir kılıfla çevrelenmiştir ve sperm kuyruğunun orta parçasında mitokondri tarafından paketlenmiştir (Figür 2.1). Flagellumun tabanı, distalde kendisine karşılık gelen ODF[2]'lerle birleşen, dokuz adet bölünmüş kolon içeren bağlayıcı bir parça ile kalınlaştırılmıştır ve bu, kuyruk hareketinin başa iletilmesinden sorumludur. Her mikrotübül çiftinin karşılıklı kayması, dynein kollarının komşu çifte sıralı bağlanmasından ve adenozin trifosfat (ATP) bağımlı kayma kuvvetinin oluşmasından ortaya çıkmaktadır. Bu kayma, kuyruk boyunca titreşim üreten karşılıklı yönlerde bükülme ile sonuçlanır. Aksonem yapısındaki asimetri, dış mikrotübüllerin merkez çifte bağlantısında ve ODF-fibröz kılıf kompleksinde olduğu gibi, üretilen flagellar ritme helikal bir şekil verir. ODF'ler matür spermde ileri hareketin gelişmesi için şarttır ve yapıları ve sayıları evrim boyunca yüksek derecede korunmuştur. Özellikle kesitsel alanları, flagellumun uzunluğuyla doğru orantılıdır[3].

[*] Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Adana.



Şekil 2.1. *İnsan spermatozoasının şematik gösterimi. (a) Dikey kesit başı, orta parçayı, ana parçayı ve son parçayı göstermektedir. Sağdaki şekiller farklı seviyelerdeki transvers kesitlerde sperm kuyruğunun hücresel iskeletinin organizasyonunu göstermektedir: orta (üst), ana (orta) ve son parça (alt). Sperm kuyruğunun transvers kesitlerdeki elektron mikroskopisi görüntüleri, orta (solda) ve ana parça (sağda) (c)'de gösterilmiştir. (B) Şekli aksonemin organizasyonunu göstermektedir. CP, merkez çift; MS, mitokondri; ODF, dış fiberler; PM, plazma membranı; DA, dynein kolları; RS, radial çıkıntı; MP, mikrotübül çiftleri; FS, fibröz kılıf. (Referans 1'den modifiye edilmiştir).*

Titreşimler flagellumun farklı bölgelerinden kaynaklanabilir. Bununla birlikte ritmin frekansı pacemaker gibi görev yapan bazal bölge tarafından kontrol edilir. Değişik modeller önerilmekle birlikte, flagellumun tabanındaki her yeni bükülmeyi başlatan mekanizma hala bilinmemektedir[4]. Fonksiyonel dynein ağır zincirleri için yapılmış fare modelli bir yayında, sperm motilitesinin gelişmesinde bu kolların önemini göstermiştir[5]. Gerçekten de dynein iç kolları ağır zincir geni silinmiş olan fareler, spermatozoaların büyük kısmında ileri progresif hareketin yokluğuyla birlikte astenozoospoermik özellik göstermektedirler. Bu gibi spermatozoalarda, dış sıkı lifler (ODS) bağlarıyla mitokondrilerin iç yüzeyine tutunmaktadır. Bu bağlantılar normal spermatozoada orta parçanın gelişimi için şarttır fakat epididimden salgılandıklarında yüzme kabiliyeti kazanınca bu bağlantılar kaybolur. Aksine, farelerde dynein iç kolları ağır zincirlerinin ayrılması bu köprüleri yıkmak için yetersiz kuvvetle sonuçlanır ve spermatozoa normal kuyruk hareketini yapamaz. Mikrotübüllerin kayması için gerekli enerji desteği ATP tarafından sağlanır. ATP, mikrotübüllerin dış çiftleriyle ilişkili olan dynein ATPaz kolları tarafından hidrolize edilir. ATP'nin major kaynağının orta parçadaki mitokondrilerde gerçekleşen oksidatif fosforilasyon olduğu düşünülmesine karşın, flagellar hareket için gerekli enerjinin asıl kaynağının alternatif bir glikolitik enzim yoluyla sperm ana parçasında lokal enerji üretimiyle olduğu son zamanlarda ileri sürülmektedir. Gerçekten de (her ne kadar azalsa da) spermde mitokondriyal oksidatif fosforilasyon durduğu zaman hareket hala devam etmektedir[6]. Dahası, bu metabolik süreçler kesin bir biçimde sperm flagellumunun orta ve ana parçasına bölünmüşlerdir ve ATP üretiminde oksidatif fosforilasyonun glikolizden daha etkin olmasına karşın flagellumun

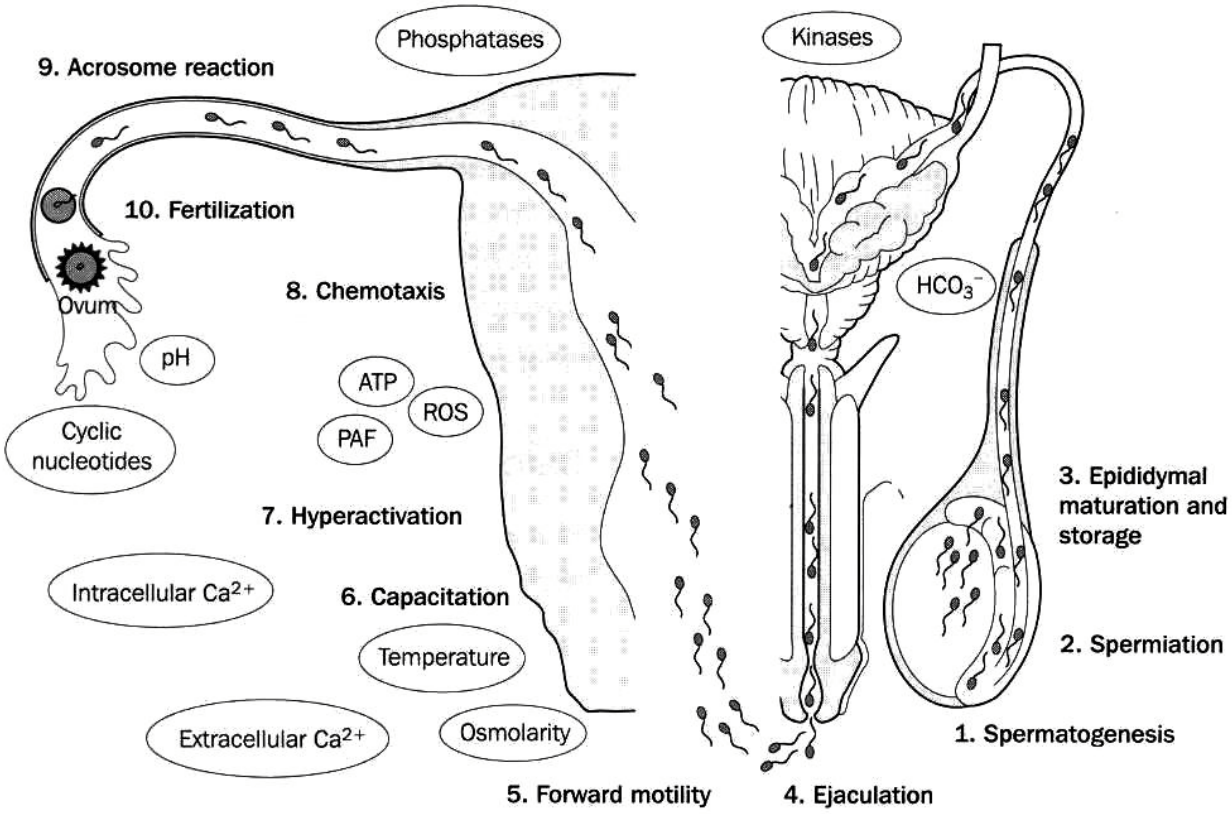
distal bölgesindeki hareketi destekleyecek ATP'nin ilk bölümden sonraki bölüme difüzyonu olası değildir. Miki ve ark., sperme özgü bir glikolitik enzim olan gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz-S'nin (GAPDS ve insan ortologu olan GAPD2) sperm motilitesi ve fertilite için gerekli olduğunu hassas bir biçimde göstermiştir[7]. GAPDS (-/-) defektif farelerin spermlerinde oksidatif fosforilasyon durduğu zaman ATP'nin sadece %10,4'ü üretilmiştir. Dahası gerçek ileri hareketin yokluğuyla birlikte sperm motilitesi bozulmuştur ve fareler infertildir[7]. Bu yüzden glikoliz, sperm motilitesi için ATP üretiminde temel metabolik yol olarak görülmektedir. Spermin ana parçasında selektif olarak üretilen hekzokinaz ve laktat dehidrogenaz gibi glikolitik enzimlerin sperme özgü izoformlarının varlığı bu kavramı güçlendirmektedir[8].

SPERM MOTİLİTESİNİN DÜZENLENMESİ

Testisten salındığı zaman insan ve bütün memeli spermatozoası hareketsizdir. Oosite ulaşıp fertilize edene kadar, epididim ve kadın genital traktına taşınması sırasında spermler yüzme kabiliyeti kazanırlar. Sperm motilitesinin gelişmesi ve korunması için bir çok ekstra ve intraselüler önemli faktör vardır (Şekil 2.2). Bu iki süreç benzer yollarla düzenleniyor gibi görünmektedir. Bununla birlikte, sperm motilitesinin korunmasına odaklanmış in vitro çalışmaların çoğunda ejakule edilmiş veya epididim kuyruğundaki spermatozoalar kullanılmaktadır. Aşağıda sperm hareketlerini düzenleyen ana faktörlerin bazıları anlatılmaktadır.

Kalsiyum

Fizyolojik şartlar altında kalsiyum, insan sperm motilitesini düzenleyen en önemli iyonlardan biridir[10]. Bununla birlikte spermatozoanın aktivasyonunda kalsiyumun rolü genellikle tartışmalıdır. Gerçekten de voltaj kapılı, siklik nükleotid kapılı ve geçici reseptör potansiyelli kalsiyum kanallarının bütün flagellumun plazma membranı boyunca yer aldığı tanımlanmıştır. Bu, hareket için kalsiyum girişinin önemini düşündürmektedir. Geçici reseptör potansiyelli kalsiyum kanallarının sperm kuyruğunda olduğu son zamanlarda gösterilmiştir ve bu kanallar, kapasitasyon bağımlı kalsiyum girişi tarafından sperm hareketinin uyarılmasıyla ilgilidir[13]. Yeni keşfedilen ve kuyrukta spesifik olarak eksprese edilen CatSper kalsiyum kanalı olan fareler, progresif hareketin kaybına bağlı olarak infertildirler[14]. Artmış intraselüler kalsiyum seviyeleri aynı zamanda inozitol 1, 4, 5 trifosfat sinyali yoluyla hücre içi kalsiyum depolarının aktivasyonuyla indirek olarak ilgilidir[15,16]. Giriş sonrası kalsiyum, fosfolipazları aktive eder ve bir çok enzim aktivitesini düzenler. Özellikle, aktive olmuş kalsiyum-kalmodülin kompleksinin (CaM), çözülebilir adenilat siklaz (sAC)[17,18], protein kinaz[19,20], fosfataz[21] ve fosfodiesterazlar[22] ile direk etkileşim yoluyla sperm motilitesini uyardığı gösterilmiştir. Bu etkileşimin sonucu olarak siklik adenozin monofosfatın artışı (cAMP) ve proteinlerin fosforilasyonu gerçekleşir. CaM, sperm aksoneminde tanımlanmıştır ve motilitesi düzenleyici hücre içi kalsiyum sensörü olduğu ileri sürülmüştür[23]. Astenozoospermik hastaların spermlerinde CaM seviyeleri düşüktür[24] ve bu enzimin inhibitörleri sperm motilitesine olumsuz etki eder[25]. Marin Briggiler[19], CaM hedef enzimleri arasında CaM bağımlı bir protein kinaz tanımlamıştır. Bu kinazın izoform 4'ünün inhibisyonu, sperm yaşayabilirliğine, protein tirozin fosforilasyonuna ve akrozom reaksiyonuna[19] etki etmeksizin hareket parametrelerinde ve ATP seviyelerinde spesifik bir azalmayla sonuçlanır. Kalsiyum yokluğunda hareketli spermin inkübasyonunda hareket parametrelerinde[19] dramatik bir düşüş gözlenir ve bu da insan sperm motilitesinin korunmasında kalsiyumun önemini göstermektedir. Hücre dışı kalsiyumun sperm motilitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Kanıtlar ayrıca hücre içi konsantrasyonlarının, sperm aktivasyonunun doğru zamanlamasına izin verecek şekilde sıkı bir biçimde düzenlenmesi gerektiğini düşündürmektedir[26,27]. Epididimin kaput ve kaudası arasında eksternal kalsiyum düzeylerinin azalması, sperm motilitesinin progresif gelişimi ile ve protein tirozin fosforilasyonunun artmasıyla ilişkilidir[28,29]. Demembrane edilmiş insan spermlerine kalsiyum eklenmesi hareketliliği baskılar[30] ve dondurulup saklama sonucu oluşan artmış hücre içi kalsiyum düzeyleri sperm hareketi ve dölleme yeteneğini olumsuz etkiler[31].



Şekil 2.2. *Testisten (sağ) overe (sol) kadar sperm yolculuğu boyunca sperm motilitesini düzenleyen faktörler. Spermatozoanın erkek ve dişi üreme yolları arasındaki transiti boyunca aktivasyon süreci ile birlikte sperm motilitesini kontrol eden eksternal ve intraselüler faktörler gösterilmiştir (oval şekiller). ATP, adenozin trifosfat; PAF, platelet aktive edici faktör; ROS, reaktif oksijen ürünleri (Referans 9'dan modifiye edilmiştir).*

Birçok yayının kalsiyum giriş kanallarının rolü üzerine odaklanmasına karşın hücreden kalsiyum çıkışı hakkında çok az şey bilinmektedir. Son günlerde hücre içi kalsiyum homeostazisini korumak için plazma membranı Ca/kalmodülin bağımlı Ca ATPaz'ın (PMCA) gerekli olduğu gösterilmiştir[32]. Gerçekten de sperm kuyruğunda zengin olan PMCA izoform 4 için hedeflenmiş gen delesyonu yapılan homozigot erkek fareler, şiddetle bozulmuş sperm motilitesine bağlı olarak infertil hale gelmiştir. Dahası, bu zararlı etki vahşi hayvanlarda enzimin inhibisyonuyla taklit edilebilir. Böylece PMCA 4'ün sperm fonksiyonunun ve hücre içi kalsiyum seviyelerinin düzenlenmesinde çok önemli rolü olduğu hipotezini desteklemektedir[32].

Kalsiyumun sperm motilitesi üzerine göze çarpan uyarıcı ve zararlı etkisinin altta yatan moleküler mekanizması hala net değildir. Bununla birlikte protein kinaz ve fosfatazları içeren eşzamanlı sinyal yollarının aktivasyonuna bağlı gibi görünmektedir. Gerçekten de sperm motilitesiyle ilişkili kuyruk proteinlerini defosforile ve inaktive eden kalsinörin[27] gibi fosfatazların aktivasyonunu korumak için kalsiyum seviyeleri düşük tutulmalıdır[27,33]. Aitken grubu tarafından geliştirilen alternatif bir hipoteze göre, yüksek hücre dışı kalsiyum varlığında internal kalsiyum homeostazisini korumak, tirozin fosforilasyonu ve sperm hareketi için ATP elde edilebilirliğini azaltmaktadır[34].

Bikarbonat ve adenilat siklaz

Bikarbonatın, farklı türlerde in vitro ve in vivo sperm motilitesini geliştirdiği gösterilmiştir[35,38]. Spermatozoanın testisten fertilizasyon alanına yolculuğu sırasında artmış milimolar HCO3 gradienti ile karşılaşması, in vivo sperm aktivasyonunun düzenlenmesinde bu molekülün önemini düşündürür. Epididimal sıvıyla karşılaştırıldığında seminal

plazmada artmış bikarbonat düzeyleri ejakulatta motilitenin gelişmesine izin verebilir. Okamura[39], zayıf sperm motilitesi olan infertil erkeklerin semeni düşük bikarbonat düzeyleri ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bununla birlikte erkek üreme sıvılarında, spermatozoayı prematür aktivasyondan ve hiperaktif motiliteden korumak için HCO3 düzeyleri düşük tutulmalıdır. Bu süreçler, HCO3 konsantrasyonu 3-4 kat daha yüksek olan kadın genital sisteminde uyarılmaktadır[40].

HCO3 tarafından uyarılan sperm motilitesinin moleküler mekanizması, hücre içi pH'dan[41] bağımsız olarak sperm sAC'nin direk uyarılmasıyla ilişkilidir. Forskolin ve G proteini regülasyonuna duyarsız olan sAC, selektif olarak HCO3 tarafından aktive edilir[42,44] ve farklı membran adenilat siklaz (mAC) izoformları tanımlandığı halde matür spermatozoada var olan ana adenilat siklaz gibi görünmektedir[45,47]. Somatik hücrelerde sAC'nin farklı subselüler mikroalanlardaki kesin kompartımanlara ayrılmış olması, farklı hücresel kompartımanlarda aktive protein kinaz A'ya (PKA) spesifik olan lokalize cAMP yükselmesini sağlar[48,49]. Aslında mAC'den farklı olarak sAC diffüze olabilir ve hedef enzimi olan PKA'nın lokalize olduğu yerde cAMP oluşturabilir[50]. Sperm sAC aktivitesi, ağırlıklı olarak ayrı partiküllerden oluşmuş sperm fraksiyonları ile ilişkili gibi görünmektedir[51].

sAC defektif fareler sperm motilitesindeki bozulmaya bağlı olarak infertildirler[52]. İlginç bir şekilde, farelerde cAMP verilmesiyle motilite yeniden kazanılabilir[52]. Bununla birlikte böyle tedaviler hiperaktivasyonu ve tirozin fosforilasyon defektlerini veya sperm fertilizasyonunu geri döndüremez. Böyle olması, sAC'nin aynı zamanda uygun spermatogenez ve/veya epididimal matürasyon için gerekli olduğunu düşündürür[53]. sAC inhibitörü, KH7, ile sperm muamele edildiğinde aynı yazarlar, fare spermi kapasitasyonu boyunca sAC bağımlı ve bağımsız süreçler arasında ayrım yapabilmişlerdir ve akrozom reaksiyonu olmadığı zaman proteinlerin tirozin fosforilasyonu, sperm motilitesi ve hiperaktivasyonunda olduğu gibi sAC tarafından düzenlenir[53]. Bununla birlikte sperm motilitesinin kontrolünde mAC'nin rolü yadsınamaz. Aslında membran olfaktör adenilat siklaz 3'ün selektif blokajı, spermin zona pellusidaya penetre etme yeteneğindeki kayıba bağlı olarak infertilite ile sonuçlanır. Bu spermatozoalar motilite ve akrozom reaksiyonunda anlamlı bir azalma gösterirler[54].

Kinaz ve fosfatazlar

Motiliteyi sağlayan uyarıcı sinyallerin iletiminde protein fosforilasyonunun anahtar süreçlerden biri olduğunun önemine dair bol kanıt olmasına karşın, ilişkili spesifik kinaz ve fosfatazlarla ilgili çok az şey bilinmektedir. Genel olarak sperm motilitesinin, tirozin ve serin-treonin kinaz aktivasyonunu takip eden spesifik sperm kuyruğu proteinlerinin artmış tirozin fosforilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dahası, sperm motilitesi fosfataz aktivasyonu ile negatif ilişkilidir. Sperm kapasitasyonuna cevap olarak tirozin fosforilasyonu olmuş proteinler esas olarak sperm kuyruğunda lokalize olmuşlardır[56,58]. Astenozoospermik hastalarda motilite ve hiperaktivasyon kapasitesindeki azalmayla ilişkili olan, sperm kapasitasyonuna cevap olarak spesifik sperm proteinlerinin fosforilasyonundaki defekt tanımlanmıştır[59,60]. Protein tirozin fosforilasyonundaki bu defekt, astenozoospermik hastaların[60] ve varikoselli infertil erkeklerin spermatozoalarındaki membran akışkanlığına bağlı gibi görünmektedir[61]. İlginç bir şekilde, normospermik erkeklerin semenlerinde bile, plazma membran akışkanlığı ve protein tirozin fosforilasyonu yeteneği ve kapasitasyona cevap olarak hiperaktivasyonda farklılık gösteren ayrı sperm alt popülasyonları vardır[62].

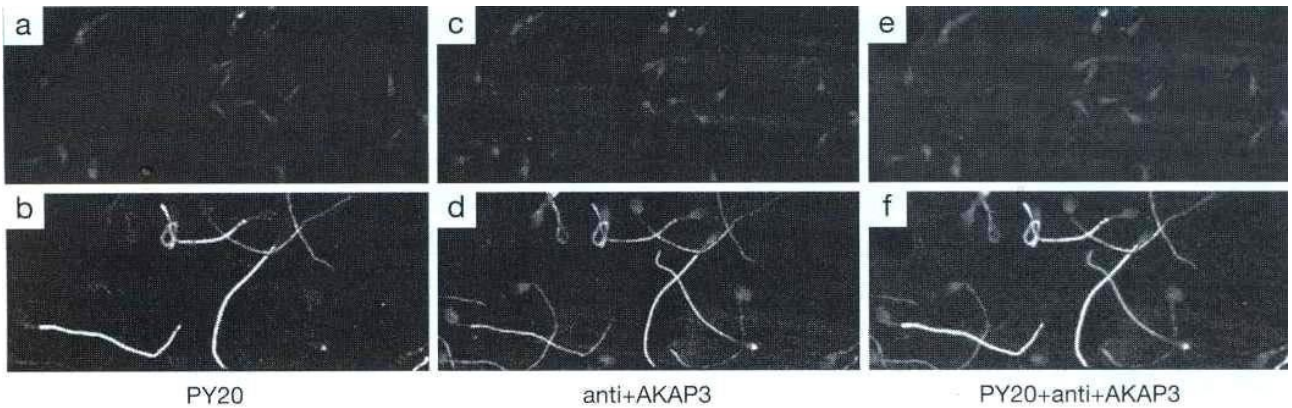
Sperm protein fosforilasyonu, kinaz ve fosfataz aktiviteleri arasındaki ince ayar tarafından düzenlenir[33,63]. Özellikle adenilat siklaz/cAMP/PKA sistemi, motiliteyle ilişkili farklı sperm proteinlerinin tirozin fosforilasyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir[27,56,63-66]. Adenilat siklazın aktivasyonu sonucu üretilen cAMP, PKA holoenzimini bağlar ve katalitik subünitenin salınımını ve aktivasyonunu uyarır. Hücre içi cAMP ve PKA aktivitesini arttıran işlemler motiliteyi uyarırlar[64,67]. Protein kinaz A'nın bir serin-treonin kinaz olduğunun anlaşılmasından beri, bazı ara tirozin kinazları aktive eden tirozin fosforilasyonunu uyardığı varsayılmaktadır. PKA yönünde ilerleyen, tirozin kinaz aktivasyonuyla ilişkili alternatif bir yol, son günlerde gruplarımız tarafından rapor edilmiştir[55,68,69]. Aslında fosfatidil 3-kinaz'ın (PI3K) LY294002 tarafından inhibisyonu ve bikarbonat tarafından sAC aktivasyonu, hücre içi cAMP seviyelerindeki artışı uyarır. Bu artış, kuyruk iskelet proteinlerinin (kinaz bağlayıcı protein 3,AKAP3) artmış tirozin fosforilasyonuyla eş zamanlıdır. Fiske edilmiş ve geçirgen hale getirilmiş spermatozoanın aynı odaklı mikroskopisi, sperm proteinlerinin kapasitasyonla indüklenen tirozin fosforilasyonunun esas olarak kuyrukta ve özellikle

AKAP3 üzerinden olduğunu onaylamıştır (Şekil .3). AKAP3'ün uyarılmış fosforilasyonu, PKA düzenleyici alt ünitesi R2B'nin bağlanmasında artışla sonuçlanır. R2B selektif olarak bağlanır ve hedefleriyle etkileştiği sperm kuyruğunda aktive olur. Sonuçta sperm motilitesinde artış meydana gelir. PKA-AKAP3 etkileşiminin bozulması, sperm motilitesinde inhibisyonla sonuçlanır[68]. Spermin PKA inhibitörü H89 ile muamele edilmesi, sperm motilitesinde inhibisyonla sonuçlanır fakat AKAP3 tirozin fosforilasyonunu etkilemez[55,68]. Bu da PKA'nın, sperm motilitesinin tirozin kinaza doğru olan yolağının regülasyonuyla ilgili olduğunu düşündürür. Spermin H89 ile muamelesini takip eden motilite inhibisyonu ve tirozin fosforilasyonu başka yazarlar tarafından da rapor edilmiştir[70-72]. Fakat PKA'nın aksi yöne doğru olan etkisinden bahsetmişlerdir. Bu gibi farklılıklar, H89 konsantrasyonlarındaki ve H89 eklenme zamanlamasındaki farklılıklarla açıklanabilir veya tirozin fosforilasyonu farklı hedeflerde PKA aktivasyonunun aşağı veya yukarı doğru yönlenmesine yol açabilir. Sperm motilitesini düzenleyen AKAP iskelet proteinlerinin önemi, Akap4 geninin hedeflenmiş ayrılması tarafından vurgulanmıştır. Akap4 geninin ürünü olan AKAP4, AKAP3 ile yakın bir şekilde ilişkilidir. Bunların mutant olduğu fareler, infertiliteyle sonuçlanan sperm flagella ve motilitesinde defekt gösterirler[73]. Fibröz kılıfın displazisi sonucu etkilenen erkekerde AKAP geninin değişiklikleriyle ilgili çelişkili raporlar vardır[74,75]. Bununla birlikte, PKA bağlanmasına etki eden, bu gibi iskelet proteinlerinin tirozin fosforilasyonuna uğrama kabiliyetindeki defekt dışlanmamıştır.

Hücre hacmi ve osmalarite

Epididime taşınması ve matürasyonu sırasında spermatozoalar, motilitenin uygun gelişimi için çok önemli bir süreç olan hücre hacmini düzenleme kabiliyeti kazanırlar. Aslında, lüminal sıvının osmolaritesi, testisten epididime doğru artar ve normal spermatozoa, epitelyumdan salgılanan L-karnitin ve aminoasitler gibi organik osmolatların alımını arttırarak aksi bir büzülme oluşturur[76]. Tersine, ejakülasyon sonrası spermatozoa, kadın genital sisteminin görece hipoozmotik ortamına taşınır (ozmotik basınç epididimin kaudasından uterusa gittikçe 420'den 300 mmol/kg'a düşer[76,77]) ve şişmeyi önlemek için spermatozoa epididimde kazanılan su ve ozmolatları kaybeder. Volüm regülasyonunun bu hassas mekanizmasındaki defektler, sperm motilitesinde ve fertilitesinde kayıba yol açan sperm başında volüm artması ve kuyrukta açılanma olması ile sonuçlanır[76].

Sperm kuyruğunda benzer bir saç tokası şekli ve bunun motilite üzerine zararlı sonuçları, c-ros hasarlı farelerde ve iyon kanal blokörü olan quinine ile muamele edilmiş spermlerde gösterilmiştir[78]. İlginç olarak seminal plazma ozmolaritesi (epididim ve uterus arasındaki), astenozoospermik hastalarda astenozoosperminin sebebine bakılmaksızın önemli oranda daha yüksektir[79]. Ayrıca, seminal ozmolarite, spermin progresif hareketi ve kinetik özellikleriyle[80] ters orantılıdır. Bu da astenozoospermik vakaların sperm motilitesinin azalmasında seminal hiperozmolaritenin potansiyel patolojik bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Spermlerin duktal veya uterin sıvılar gibi düşük osmolar ortama maruz



Şekil 2.3. *Fikse edilmiş ve geçirgen hale getirilmiş spermatozoanın immünofloresan analizi. Tirozinle fosforile proteinlerin immün yolla işaretlenmiş halinin mikroskopisi ((b),PY20 antikoru, yeşil) ve A kinaz bağlayıcı protein 3 (AKAP3) ((d), anti AKAP antikoru, kırmızı). Sperm kuyruğunda bu antikorların pozitifliğini göstermektedir. Eş zamanlı çift floresan analizi kuyrukta AKAP3'e uyan tirozin fosforilasyonunu teyit eder. ((f), çift floresan, sarı). (a), (c), (e), primer antikorsuz negatif kollar (Referans 9'dan alınmıştır).*

kalması, ozmolariteye duyarlı kalsiyum kanalları boyunca kalsiyum akışını aktive eder[79]. Epididimin apikal bölgesindeki sperm matürasyonunda sıvı rezorpsiyonunun rolü ayrıntılı bir şekilde keşfedilmiştir[81]. Östrojenler, Na^+/H^+ değiştiricilerinin farklı çalışmasını kontrol eder ve epididimin başlangıç segmentinde ve kaput epididimde östrojen reseptör a yoluyla akuaporin kanallarını[83] kontrol eder. Akuaporin kanalları (ör:AQ7) aynı zamanda sperm kuyruğunda da bulunur ve hücre volümü, motilitesi ve fertilitenin kontrolü için önemli gibi görünmektedir[84]. Bu nedenle epididimdeki sperm matürasyonunun iki seviyede aktif su transportu ile düzenlendiği düşünülebilir: siliyasız epididim epiteli ve sperm plazma membranı. Epididime transferi boyunca sperm tarafından yakalanan ana ozmolatlardan biri olan L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondride β-oksidasyonunda açil taşınması için gereklidir ve ayrıca sperm DNA'sını ve reaktif oksijen ürünlerinin yaptığı membran hasarını önler. Gerçekten de oligoastenoteratospermik ve astenospermik hastalarda klinik deneylerle gösterilen, oral karnitin alımının semen kalitesini arttırmada özellikle de sperm ileri hareketinde pozitif etkisi vardır[85,86].

Reaktif oksijen ürünleri

Spermatozoa veya seminal lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen ürünleri (ROS), özellikle hidrojen peroksitin, motiliteyi de içeren farklı sperm fonksiyonlarına etkisi olduğu tanımlanmıştır[87]. Bu etkiler ROS'un konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Düşük seviyeler, kapasitasyonla ilişkili proteinlerin tirozin fosforilasyonunu ve sperm motilitesini arttıran cAMP-PKA sinyal kaskadını uyarırken yüksek seviyeler inhibitör etki gösterirler[88,89]. ROS'un sperm motilitesi üzerine zararlı etkisi, plazma membranındaki artmış lipid peroksidasyonuyla ilişkilidir[90].

Antioksidan kapasite kadar yüksek ROS üretimi belirli tip sperm patolojilerini özellikle astenozoospermiyi açıklar[91]. Bazı olgularda antioksidan kullanımı endike olabilir[92,93]. Bununla birlikte insan spermatozoasındaki ROS'lara karşı daha fazla genel korumayla sorumlu olan glutatyon bağımlı seleno enzimler, normospermik ve astenozoospermik hastaların spermlerinde benzer olarak rapor edilmişlerdir[94].

HİPERAKTİVE EDİLMİŞ MOTİLİTE

Hiperaktivasyon, kadın genital yolundaki kapasitasyon süreciyle ilişkili gelişen özel bir tip sperm motilitesidir. Aynı zamanda in vitro seminal plazmanın alınıp, kapasitasyon ortamında spermin inkübe edilmesiyle de başarılabilir[95]. Bu hareket daha enerjik ve daha az simetrik flagellar ritimden oluşur ve bu hareket servikal mukusu, tubaları ve sonuç olarak oositi çevreleyen kümülüs ooforusu ve zona pellusidayı geçmeye yardım eder[96-98]. Ayrıca, tubal istmusunda sperm için rezervuarı olan türlerde, duktal epitelyumun kıvrım ve kriptalarında hapsolmuş spermlerin salınmasında bu özel yüzme şekli önemli gibi görünmektedir[98]. Bu olgularda ovülasyon, hiperaktivasyon geliştirmiş olan tam aktive sperm salınımıyla sonuçlanan, oviduktal epitelin karbonhidrat kısmında bir modifikasyonu uyarır. Bu fenomen, sperm fertilizasyon potansiyelinin kazanılması için uygun zamanlamayı sağlar[99]. Foliküler sıvının sperm hiperaktivasyonundaki doz bağımlı uyarıcı etkisi gösterildiğinden beri hiperaktivasyonun gelişmesi, özellikle de tubalarda, ovülasyon tarafından düzenlenmektedir[100,101]. Sperm motilitesine direk etki eden spesifik komponent henüz izole edilememiştir[102,103].

Hiperaktivasyon için uygun zamanlamanın önemi, spermatozoaları kadın genital sisteminde prematür hiperaktivasyona uğrayan infertil t-haplotip farelerde gösterilmiştir[104]. İlginç olarak ileri progresif motilite ve hiperaktivasyon, spermin bir paternden diğerine geçişine izin veren, devamlılık arzetmeyen ve geri döndürülebilir bir süreç gibi görünmektedir[105].

Kapasitasyon ve hiperaktivasyon, sperm aktivasyonunun iki tamamlayıcı işlemidir ve fizyolojik şartlar altında kendiliğinden gelişir. Eğer kapasitasyon, spermin fertilize edebilmesi için kompleks fizyolojik değişiklikler olarak canlandırılırsa, hiperaktivasyon bu sürecin bir parçası olarak değerlendirilmelidir[95]. Bununla birlikte bu işlemler birbirinden bağımsız oluşan fenomenlerdir. T-haplotip farelerde spermatozoa prematür hiperaktivasyon gösterir fakat in vitro normal kapasitasyon zamanlaması gösterir. Benzer sinyal yolaklarını paylaşmalarına rağmen kapasitasyon ve hiperaktivasyon, aktive eden faktörler için farklı başlangıç gösteren farklı süreçlerdir. Gerçekten de hiperaktivasyon için gerekli olan kalsiyum ve bikarbonat konsantrasyonları, kapasitasyon için gerekenden çok daha yüksektir[16,97].

Hiperaktivasyonun altta yatan moleküler temelleri farklı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Özellikle aksonem yapısını sağlam ve fonksiyonel kılan, plazma ve mitokondriyal membranları TritonX 100 ile uzakaştırılmış demembrane sperm modeli ile çalışmışlardır[97]. Hiperaktive ve aktive motilitenin gelişimi benzer sinyal yolaklarını ve moleküler elemanları paylaşır. Bununla birlikte farklı aktivasyon başlangıçları da içerir. Özellikle ATP ve cAMP'nin demembrane spermatozoada motiliteyi uyarma kabiliyeti olmasına rağmen hiperaktivasyon sadece kalsiyum eklenmesini takiben başlar[106]. Bu da bu iyonun süreçte anahtar düzenleyici olduğunu düşündürür[97].

Hiperaktivasyonla ilişkili hücre içi kalsiyum seviyelerinin artması için eksternal kaynaklar ve hücre içi depolar önemlidir. İnozitol 1,4,5 trifosfat reseptörlerini gösteren hücre içi kalsiyum depoları sadece akrozomda değil[15] sperm boynunda da gösterilmiştir[16]. Sperm boynunun distal bölgesinde aksonem, mitokondriyle ilişkilidir ve fazladan bir nükleer zarfla çevrilidir. Bu zarfın genişlemiş sisternası, flagellumun hücre içi kalsiyum deposunu oluşturur[16]. Bu yapıdan IP3 kapılı kanallarla kalsiyum salınımı, muhtemelen kalmodülin bağımlı kinaz yoluyla sperm hiperaktivasyonunu direk başlatır gibi görünmektedir. Kalmodülin kinaz 2 spermatozoadaki keşfedilmiş birkaç kalsiyum hedefinden biridir. Kalsiyum-kalmodülin kompleksi tarafından bu kinazın aktivasyonu spesifik olarak hiperaktivasyonu uyarır[20].

Hiperaktivasyon aynı zamanda voltaj kapılı kanallar gibi plazma membranı spesifik kanalları boyunca kalsiyum girişi tarafından düzenlenir. Son zamanlarda keşfedilen sperm spesifik voltaj aracılı kalsiyum kanalı ailesi olan CatSper ailesi, sperm motilitesinin gelişmesinde ve korunmasında kilit bir rol oynar. Bu ailenin 4 üyesi kuyruk boyunca ayrı ayrı eksprese edilirler. CatSper1, sperm aktivasyonunu düzenler gibi görünürken[14], CatSper2 hiperaktivasyon için önemlidir. CatSper2 hasarlı fareler hiperaktivasyon geliştirme ve zona pellusidaya penetre etme kabiliyeti olmamasına bağlı olarak infertildirler. Bununla beraber kapasitasyon, motilite ve akrozom reaksiyonu normaldir[108]. İlginç olarak CatSper2 mutant olan bir ailede erkek infertilitesi son günlerde tanımlanmıştır[109].

Aktive edilmiş motiliteye benzer bir şekilde hiperaktivasyon, kinaz ve fosfataz aktivitesi arasındaki karmaşık bir ayar sonucu düzenlenmektedir. Kuyruktaki bir çok sperm proteininin artmış tirozin fosforilasyonu, fizyolojik[59,66,69,110] ve ısının indüklediği hiperaktivasyonla ilişkili olarak tanımlanmıştır[111]. Hücre içi cAMP'deki artış bu motiliteyi kuvvetlendirirken[55,69,112], tirozin ve cAMP bağımlı kinazın inhibisyonu hiperaktive motiliteyi azaltır[55,69,113].

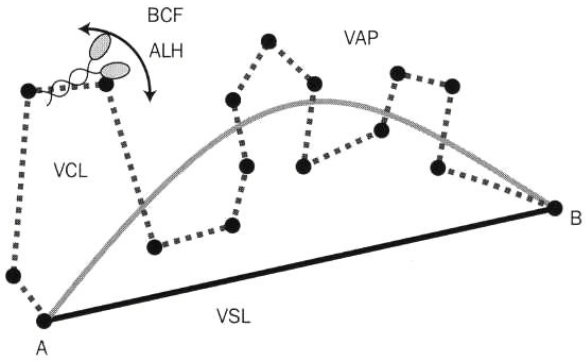
KEMOTAKSİ VE SPERM MOTİLİTESİ

Omurgasız ve memelilerin spermatozoası, yumurta tarafından salgılanan kemoatraktanlara karşı çekim gösterir. Eksternal döllenme yapan türler için özellikle önemli olan bu mekanizma, spermin oosite doğru kılavuzluğunda kilit bir rol oynar. Sperm spesifik reseptörlere bağlanma yoluyla bu moleküller sperm motilitesine etki eder ve kemoatraktanların kimyasal yoğunluğu boyunca direk bir hareket uyarır (kemotaksi). Deniz kirpisinde, yumurta tarafından salgılanan ve türe spesifik bir yoldan etki eden sperm aktivatörü, flagella boyunca yerleşen K kanalları ile ilişkili transmembran guanilat siklaz reseptör kompleksini uyararak hücre içi cAMP ve kalsiyum artışını sağlar[114,115]. Foliküler sıvı tarafından (FF) in vitro kemotaksi indüksiyonu, insan sperminde geniş bir şekilde gösterilmiştir[116]. Steroidlerin sperm üzerindeki major etkisi kemotaksiden çok hiperaktivasyonmuş gibi görünse bile, progesteron ve RANTES (T)[118] gibi kemokinler, sperm kemotaksisiyle ilişkili aktif bileşikler olarak düşünülmüştür[119]. Ayrıca, koku molekülleri, insan spermatozoasından eksprese edilen spesifik koku reseptörleri yoluyla bir membran adenilat siklaz bağımlı hücre içi kalsiyum artışını uyarır ve sperm bu koku molekülünün artan yoğunluğu doğrultusunda yeniden yönlendirilir[120,121]. Matür oosit ve çevreleyen kümülüste olduğu gibi preovülatuar oosit tarafından salgılanan sperm kemoatraktanları spermin fertilizasyon alanına doğru kılavuzluğuna katkıda bulunurlar[122]. Bununla beraber insan spermatozoasında kemotaksinin fizyolojik rolü hala tartışmalıdır. Spermin oosite doğru olan kılavuzluğundaki öneminden ziyade, insanlardaki kemotaksi, seçilmiş aktive spermatozoa alt popülasyonunun yönlendirilmesinde daha önemli gibi görünmektedir[123,124].

SPERM MOTİLİTESİNİN BİLGİSAYAR DESTEKLİ DEĞERLENDİRİLMESİ

Klasik olarak sperm motilitesi faz kontrast mikrosopi kullanılarak değerlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü'nün insan semen ve sperm-servikal mukus etkileşimi inceleme kılavuzuna göre ileri progresyon (a ve b), in situ (c) ve immotil (d) gibi sperm yörüngelerine göre subjektif olarak sınıflandırılmışlardır[125]. Astenospermi tanımı %50 ileri hareketli spermi normal sınır değer olarak kabul eden bu sınıflamaya dayanır. Sperm hareketinin bilgisayar yardımlı analizi, bu değerlendirmenin objektifliğini önemli oranda arttırır. Bu değerlendirme klasik subjektif mikroskopik değerlendirmeyle elde edilemeyecek, sperm hızı, başın yer değiştirme genişliği ve flagellar ritmin frekansı gibi bir seri ölçüm de sağlar. Ayrıca, bilgisayar yardımlı sperm analiz (CASA) sistemlerinin sperm alt popülasyonlarını, saptanmış eşik değerlerine göre sıralama kabiliyeti vardır. Bu da hiperaktive motilite gösteren spermatozoanın yüzdesini doğru tespit etmeyi sağlar (inceleme için Mortimer 1997'ye bakınız)[126].

Bu araçların sensitivitesi ve güvenilirliği son birkaç yılda büyük gelişme gösterdi. Araştırmalarda ve klinik araçlarda, temel parametreleri ve hiperaktivasyon parametrelerini ölçmek için artık başvurulan bir yöntem olmuştur[1]. Aslında CASA kısa zamanda fazla sayıda spermatozoanın hareket parametrelerini aynı anda değerlendirmeye olanak tanır. CASA kullanılarak ölçülen bütün parametrelerde spermin kuyruğu yerine başı kullanılır (kitle merkezli üretilmiş hareket). Baş hareketi pasif olarak flagellar ritmi yansıttığı için hareketin frekansının daha az olmasına bağlı olarak daha kolay takip edilebilir. Hız değerleri için eğrisel hız (VCL), düz çizgisel hız (VSL) ve ortalama yol hızları (VAP) temel alınır. VCL, sperm başının gözlenme süresi boyunca ilerlediği gerçek mesafe olarak tanımlanır. VAP, sperm başının katettiği ortalama yol olarak tanımlanır. VSL, spermin katettiği yolun başlangıç ve bitiş noktaları arasındaki düz çizginin uzunluğudur. Kesin bir biçimde sperm başı özellikleri ile ilişkilidir. Bu özellikler, başın laterale yer değiştirmesi (ALH) ve çapraz hareket frekansının (BCF) ölçümü, sırasıyla lateral hareketin genişliği ve sperm başının hareket yönünü çaprazlama sayısıdır.



Şekil 2.4. *CASA sistemi (bilgisayar destekli sperm analiz sistemi) tarafından sperm hareketinin dijital ortamdaki şematik gösterimi. VCL, eğrisel hız; VSL, düz çizgisel hız; VAP, ortalama yol hızı; BCF, ritim frekansı; ALH, lateral baş yer değişimi; LIN, çizgisellik: VSL/VSL; STR, doğrusallık: VSL/VAP (Referans 9'dan alınmıştır).*

Yukarıda gösterildiği gibi, CASA sistemleri hiperaktivasyon gösteren spermatozoa yüzdesini, sıralı fraksiyon datalarından elde edebilir. 60 Hz'de hiperaktive spermleri sınıflamak için gerekli kriterler manuel olarak belirlenebilir ve VCL>150 μm/sn, ALH_{max}>7.0 μm/sn, doğrusallık LIN<%50 olarak tanımlanır. Modern CASA araçları saniyede 60 görüntü yakalar ve bu, spermin hiperaktive motilitesini tam anlamıyla belirlemek için idealdir. Engellenmemiş üç boyutlu sperm hareketine izin vermek için motilite 30μm'den büyük alanda ve 37°C'de analiz edilmelidir[128].

Ayrıca araştırmalar için tartışılmaz faydalarının yanında CASA klinik kullanımda da genişçe benimsenmiştir. Bir çok çalışma, CASA parametrelerini yardımcı üreme teknikleri (ART) sonuçlarıyla ilişkilendirmiştir[129-131]. Tek parametre iyi öngörücü değere sahip olmasa da bazılarının fertilizasyon potansiyelini öngören çok parametreli denkleme değerli katkıları vardır.

ASTENOZOOSPERMİNİN ETYOLOJİSİ VE PATOFİZYOLOJİSİ

Flagellar yapıdaki sperm hareketini ve metabolizmasını düzenleyen daha önceden tanımlanan dış ve iç faktörlerdeki değişiklikler, sperm motilitesinde ve infertilitesinde bozuklukla sonuçlanabilir. İnfertil olgulardan analiz edilen 1085 sperm örneğinin rapor edildiği bir çalışmada, %81'inin motilitesinde bozukluk olduğu, bunların da %20'sinde saf astenozoospermi olduğu görüldü[132]. Böylece astenozoospermi erkek infertilitesinde altta yatan ana seminal patolojilerden biridir.

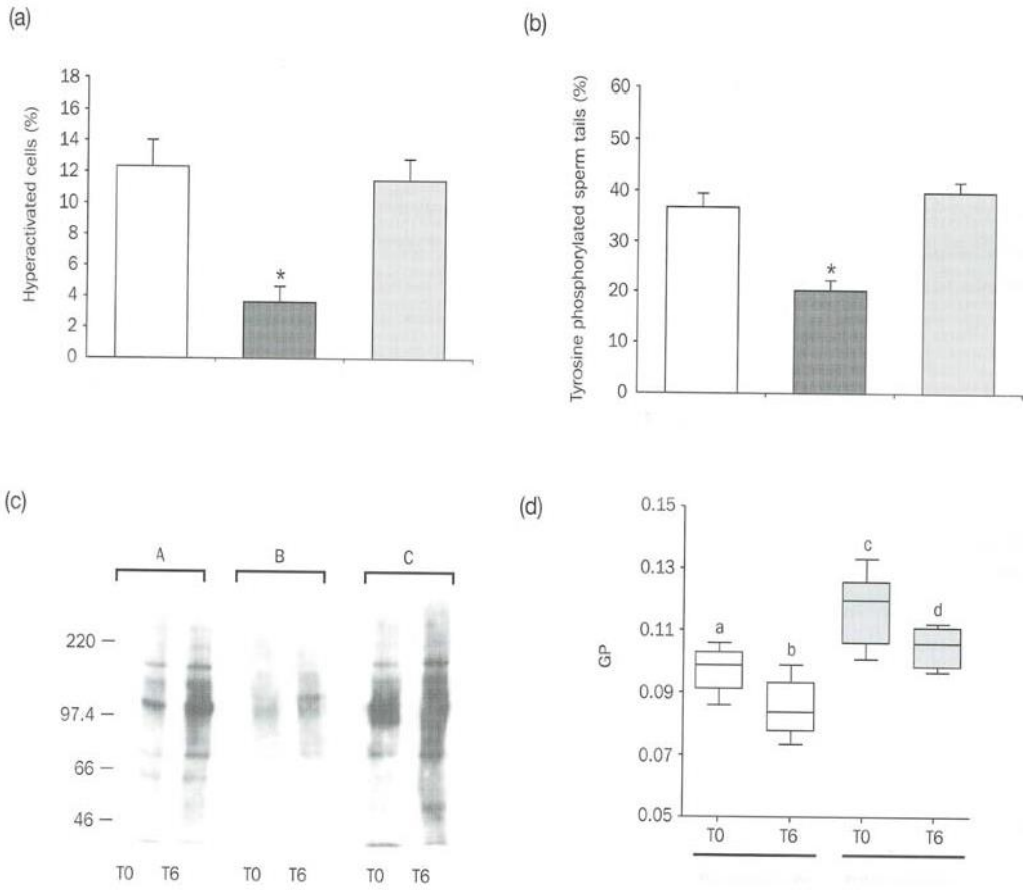
Bir çok astenozoospermi sıklıkla flagellar değişiklik nedeniyle oluşur[133]. Şiddetli astenozoospermik erkeklerin mikroskopik yapısal incelemelerinde iki tip kuyruk anomalisi ortaya çıkarıldı. Birincisi, değişik örneklerde değişken sperm sayılarına etkiyen gelişigüzel ikincil varyasyonları olan non spesifik flagellar anomalilerdir. Diğeri ise spermatozoaların çoğuna etkiyen ve solunum patolojisi ve ailesel insidansla ilişkili olan fibröz kılıfın displazisinin yol açtığı sistemik primer bir anomalidir[134,135].

Non spesifik flagellar anomaliler, astenozoosperminin altında yatan en sık flagellar patolojiyi oluştururlar. Gelişigüzel mikrotübüler değişikliklerin yapısal fenotipi karakteristik olarak heterojendir ve bazen başka androlojik bozukluklarla (ör:varikosel) ilişkilidir. Bu hastaların bazıları konservatif tedaviye cevap verirken bazıları ART'ye ihtiyaç duyar[136].

Fibröz kılıfın displazisi, aşırı astenozoospermiyle veya total sperm immobilitesiyle ilişkili olan farklı bir durumdur. Fibröz kılıfın ve diğer aksonemal ve periaksonemal yapıların bükülmesiyle karakterize homojen ve farklı bir fenotipi vardır[135,136]. İmmotil siliya sendromunun bir varyantı olduğu düşünülmektedir. Solunumsal hastalık ve erkek infertilitesiyle seyreden, primer siliyer diskinezi olarak da bilinen konjenital bir anomalidir. Solunum sistemindeki siliya ve sperm flagellasının aksoneminde dynein kollarında, radial çıkıntılarda ve merkezi mikrotübüllerde kayıp ve genel mikrotübüler translokasyonlar gözlenir[137]. Kartagener sendromunda siliyer/flagellar immotiliteye dekstrokardi eşlik eder. Bu sendromların ailesel kümelenmesi, hastalığın genetik orijinli olduğunu kuvvetli bir biçimde düşündürür[134]. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu bir tedavi seçeneğidir fakat genetik danışmanlık gereklidir[138].

Astenozoospermik vakaların küçük bir kısmı, özellikle çok şiddetli olmayanlar flagellumun yapısal anomalileriyle ilişkilidir. Bizim çalışmalarımız, daha az şiddetli astenozoospermik hastaların spermatozoalarında, motilitede ve hiperaktivasyon geliştirme kapasitesinde net bir zayıflık gösterdi. Bu zayıflık, düşük membran akışkanlığı ve protein tirozin fosforilasyonundaki eşlik eden yetersizlikle ilişkiliydi[59,60]. Bu, özellikle spermatozoa kapasitasyon inkübasyonuna tabi tutulunca belirgindi (6 saat 37°'de, %5 CO_2 ve protein ilavesinde) (Şekil 2.5).

Membran hareketlerindeki değişiklikler, sperm fonksiyonu ve fertilizasyon yeteneğinde olduğu gibi tirozin fosforilasyonuyla ilişkilidir[139,140]. Astenozoospermik hastaların spermatozoası, normospermik hastalarla ve proven-fertil donörlerle karşılaştırılınca, kapasitasyondan önce ve sonra önemli oranda daha az akışkan membran özelliği gösterir[60]. Membran akışkanlığındaki bu farklılık spermatozoanın peroksidatif hasara[91] artmış duyarlılığına bağlı olabilir[141,142]. Membran akışkanlığındaki azalmayla ilişkili membran lipid hidroperoksitlerinin üretimi artmaktadır. Astenozoospermik spermlerin bu duyarlılığı kısmen, rapor edilmiş yüksek oksidasyon katsayısından sorumlu olan membran yapısıyla açıklanabilir[91]. Astenospermik örneklerin sperm membranları, yüksek poliansatüre yağ asidi seviyeleri içerir. Bu da onları reaktif oksijen türleri saldırısına dayanıksız hale getirir. Sperm kapasitasyonu süresince okside edici şartların normal olmasından ve sinyal iletimi ve tirozin fosforilasyonuna bağlı olmasından dolayı, astenozoospermik örneklerin predispozisyonu, membran disfonksiyonundan kaynaklanan oksidatif hasara bağlı olabilir[87,143]. Bu da tirozin fosforilasyon eksikliği ve motilite değişiklikleriyle sonuçlanır.



Şekil 2.5. *Astenospermik hastaların normospermik ve proven-fertil erkeklerle karşılaştırılmasında, tirozin fosforilasyonu, hiperaktivasyon ve membran akışkanlığındaki defektler. Spermatozoa 0 (TO çizgisi) veya 6 saat kapasitasyon koşulları altında inkübe edildi. Hiperaktive edilmiş motilite (a) insidansı, tirozin fosforilasyonunun insidansı (immünofloresan) ve yoğunluğu (western blot) (b) ve (c) ve sperm membran akışkanlığı (florometri) (d) gösterilmiştir. Yukarıdaki harfler istatistiksel öneme işaret eder. Western blot şeklinde (c), A: normospermik, B: astenospermik, C: proven fertil. Membran akışkanlığı grafiğinde (d) GP, Laurdan'ın genel polarizasyonunu gösterir (Referans 60'dam alınmıştır).*

ASTENOZOOSPERMİNİN TEDAVİSİ

Sistemik modaliteler

Herhangi bir tedaviyi dikkate almadan önce doğru bir teşhis konulmalıdır. Bu nedenle, subfertil erkeklerin değerlendirilmesi ayrıntılı bir hikayeyle ve fizik muayene ile başlar. Hikaye, gebelik için çaba harcanan zamanı, cinsel ilişki zamanlamasını ve frekansını, erektil fonksiyonu, ejakulasyonu, yaşam tarzı faktörlerini (alkol, sigara vs.) ve her medikasyonu aydınlatmalıdır[144]. Diğer ilgili ayrıntılar, önceki kabakulak orşitini, kemoterapi ve/veya kanser için yapılmış radyoterapiyi, kriptoorşidizmi, önceki cinsel yol enfeksiyonlarını, geçirilmiş hastalıkları ve herhangi bir sistemik hastalığı kapsar. Fizik muayene, her hipogonadizm işaretini (virilizasyon, vücut orantısı, jinekomasti vs.) araştırmalıdır. Testis boyutlarını, kıvamını ve kitle varlığını ve penil patolojiyi (hipospadiyas vs) değerlendirmek için ve erkek infertilitesiyle ilişkili en yaygın durum olan varikoseli aydınlatmak için dikkatli bir genitoüriner muayene yapılmalıdır[145,146]. Fibröz kılıf displazisi gibi şiddetli mikro yapısal anomaliler ayrıca dışlanmalıdır.

İnfertilitenin hipogonadizm, varikosel, enfeksiyonlar, immünolojik infertilite, obstrüksiyonlar ve kriptoorşidizm gibi tedavi edilebilir bir erkek faktörü varsa bu faktör bulunduğu zaman geçerli medikal ve/veya cerrahi tedavilerle düzeltilmelidir. Eğer idiyopatik astenozoospermi tanısı konduysa, kanıta dayalı destek çerçevesinde birkaç tedavi seçeneği vardır[147].

İdiyopatik astenozoospermik erkeklerde yapılan plasebo kontrollü çift kör randomize çalışmalar, L-karnitin ve analoglarının özellikle L-asetil karnitinin günlük kullanımı sonrası sperm motilitesi ve kinematik parametreleri artmıştır[85,148,149] . Bütün bu çalışmaların net bir tartışma yaratacak kadar istatistiksel gücü olmamasına rağmen, bu çalışmaların hepsi motiliteyi geliştirmek için net eğilimler göstermektedir. Bu özellikle motilite ve hareket parametrelerinde düşük değerlerle başlayan hastalar için özellikle önemlidir.

Oral karnitin yönetimi ile birlikte modifiye edilmiş etyopatogenetik mekanizmaların net olarak belirlenmemesine rağmen mitokondriyal enerji üretiminde artma ve total antioksidan kapasitede artma olduğu düşünülmüştür[85,86,149,150]. Glutatyon ve koenzim Q10 kullanımının idiyopatik astenozoopermi tedavisinde yararlı etkileri olabilir[151,152].

Oligospermi veya kombine oligoastenoteratospermi ile başvuran ART hastalarının sistemik tedavisinde test edilmiş bir diğer yöntem ise saf folikül uyarıcı hormondur (FSH). Sonuçların hala tartışmalı olmasına rağmen bir çok çalışma in vitro fertilizasyon (IVF) sonuçlarında gelişme göstermiştir[153-157].

Yardımcı üreme teknikleri

Bu güne kadar, küratif olmamasına rağmen, astenozoosperminin en etkin tedavisi ART'dir. İnseminasyon öncesi in vitro ortamda sperm motilitesini geliştirmek orta dereceli astenozoospermik olgularda yaygın bir yaklaşımdır. İn vitro sperm motilitesini geliştirebilen belirli moleküller gösterilmiştir. Bunların arasında spermden fizyolojik olarak üretilen ve salgılanan pentoksifilin (PF) gibi fosfodiesteraz inhibitörleri, cAMP analogları ve plazma membran fosfolipidleri, platelet aktive edici faktör (PAF) vardır[158]. PF sıklıkla ART'de fertlilizasyon oranını ve erkek faktörlü infertil çiftlerde sonuçları geliştirmek için kullanılır[159,160]. Bu bileşik astenozooseprmik olgulardan elde edilen spermlerde sadece motiliteyi uyarmaz aynı zamanda sperm kapasitasyonuna, zona pellusidaya bağlanmaya ve akrozom reaksiyonuna da olumlu etki eder[161]. IVF'den önce PF ile sperm tedavisinin gelişen embriyo için teratojenik olmadığı gösterilmiştir[160]. Bununla birlikte potansiyel toksik etkiler kesin olarak dışlanamaz[162]. Ayrıca cevapsız olguların varlığı tedavinin genel etkinliğini azaltır[163]. Bu bileşiklerin çoğunun yaptığı en çarpıcı olumsuz yan etki, PF de dahil, akrozom reaksiyonunu indükleme olasılığıdır[102]. Maalesef akrozom reaksiyonu olmuş spermatozoa oositin zona pellusidasını bağlayamaz. Böylece konvansiyonel IVF'in etkinliğini azaltır.

Bu bağlamda, geçmiş birkaç yıl boyunca araştırmalarımız, astenozoosperminin potansiyel yardımcı in vitro tedavisi için çok iyi bir aday gibi görünen iki molekül üzerine odaklanmıştır. LY294002, fosfatidilinozitol 3 kinazın farmakolojik inhibitörüdür. Bu kinaz plazma membranının fosfoinozitidlerinin inozitol halkasını 3-OH pozisyonunda fosforlar[164]. Bu enzimin sperm motilite kontrolünde negatif bir rol oynadığı gösterilmiştir[68,165-167]. Bu enzimin LY294002 tarafından inhibisyonu, seçim için kullanılan teknikten bağımsız olarak ejakule edilmiş veya seçilmiş insan spermatozoasında ileri ve hızlı harekette önemli bir artışı stimüle etmiştir[10,68,166] . Bu uyarıcı etki, normospermik olgularla karşılaştırılan oligospermik olgularda daha belirgindi[10,165,166]. Özellikle LY294002'nin şiddetli astenospermik olguların seminal örneklerine direk eklenmesi, ART için yıkama ve seçim yapılmış spermlerde ileri hareketli sperm sayısında artış görülür[166]. LY294002 tarafından PI3K inhibisyonu, sperm kuyruğunun fibröz kılıfında AKAP3'ün tirozin fosforilasyonunu uyarır[10,68,167]. PKA'nın düzenleyici subuniti olan RIIβ'nin AKAP'ın fosforile formuna bağlanmasını arttırarak PKA'nın lokal alımı ve aktivasyonunu sağlar. PKA aktivasyonu sonuç olarak sperm motilitesi ve hiperaktivasyonunun uyarılmasıyla sonuçlanır. İlginç olarak yukarıda bahsedilen moleküllere karşı LY294002'nin sperm motilitesine etkisi, akrozom reaksiyonunda artmayla ilişkili değildir[165]. Ayrıca fare modellerinde LY294002 ile sperm, oosit veya embryo tedaviyi takiben hiçbir toksik etki gösterilememiştir. Bütün bu bulgular bu ilacın ART'de sperm hareketini geliştiren diğer PI3K inhibitörleri gibi potansiyel bir araç olduğunu gösterir.

Bu farmakolojik ajanın kullanımına ek olarak bizim grubumuz (Floransa Üniversitesi), sperm motilitesine bikarbonat üzerinden fizyolojik bir uyarıya dikkat çekmiştir. Son günlerde yapılan çalışmalarda yıkanmış seçilmiş spermatozoalarda bikarbonatın fizyolojik konsantrasyonlarının (15-75 mmol/l) hücre içi cAMP seviyesinde ve AKAP3'ün tirozin fosforilasyonunda artış sağladığı gösterilmiştir. PKA'nın artmış miktarıyla sonuçlanan sonraki fenomen ise PKA bu iskelet proteinine,

LY294002'ye benzer tarzda bağlanmasıdır. Sperm motilitesinde ve AKAP3 fosforilasyonunda bikarbonatın uyarıcı etkisi, iyonun hücre içine girmesi ve sAC'yi aktive etmesiyle ilgili gibi görünmektedir. Bu işlem bikarbonat taşıyıcısının spesifik blokörü olan 4,4'-diizotiyosiyanostilben-2,2'-disülfonik asit ve sAC'nin selektif inhibitörü olan 2OH-estradiol tarafından inhibe edilir. Böylece bizim bulgularımız $HCO3^-$ ve LY294002'nin sperm kuyruğunda sAC tarafından cAMP üretimi ve AKAP3'ün tirozin fosforilasyonuyla aynı sinyal yolaklarını kullanarak sperm motilitesini arttırdığını güçlü bir şekilde düşündürür. AKAP3 fosforilasyonuna giden sinyal yolaklarının fazlalığı, bu işlemin sperm motilitesini düzenlemedeki önemini vurgulamaktadır. Fosforilasyonu artırmada rol alan moleküller, ART için seçilmiş motil spermatozoa sayısını arttırmak için kullanılabilir. Bu da infertil çiftlere daha az invaziv ve daha az pahalı teknikler için iyi bir şans sunmaktadır.

Sonuç ve gelecekte beklenenler

Önemli bir ilerleme olmasına rağmen sperm motilitesini koruyan ve düzenleyen biyokimyasal yolaklarla ilgili açıklama getirecek fazlaca konu bulunmaktadır. Özellikle spermin nasıl testisten salındıktan sonra ve epididime transferini takiben hareket etmeye başladığı ve bu aktivasyon için hangi sinyallerin gerekli olduğu hala net değildir. Bununla birlikte sperm motilitesinin kontrolüyle ilişkili moleküllerin aydınlatılması zor gibi görünmektedir. Farelerdeki genetik çalışmalar, sperm motilitesinin gelişmesi ve korunmasıyla ilgili bir çok genin olduğunu göstermiştir. Bazıları ana parçadaki fibröz kılıfa ait olan testis spesifik genlerdir. Sperm motilitesinin başlangıcıyla ilişkili moleküler mekanizmaları açıklığa kavuşturmanın, mümkün terapötik stratejileri geliştirmek için büyük yararı olacaktır. Aslında bazı sistemik tedavilerin (karnitin ve antioksidanların oral verilmesi gibi) göreceli olarak yararlı olduğu kanıtlanmasına rağmen, mevcut in vitro tedaviler astenozoospermi tedavisi için en iyi seçenek olarak kalacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mortimer, S.T. CASA - practical aspects, J. Androl 21; 515:2000
2. Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. Dev Biol 1975; 44: 394
3. Baltz JM, Williams PO, Cone RA. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. Biol Reprod 1990; 43: 485
4. Vernon GG, Woolley DM. Basal sliding and the mechanics of oscillation in a mammalian sperm flagellum. Biophys J 2004; 87: 3934
5. Woolley DM, Neesen J, Vernon GG. Further studies on knockout mice lacking a functional dynein heavy chain (MDHC7). A developmental explanation for the asthenozoospermia. Cell Motil Cytoskeleton2005;6l:74
6. Narisawa S, et al. Testis-specific cytochrome c-nuil mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. Mol Cell Biol 2002; 22: 5554
7. Mild K, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 16501
8. Visconti PE, e: al. Properties and localization of a tyrosine phosphorylated form of hexokinase in mouse sperm. Mol Reprod Dev 1996; 43: 82
9. Luconi M, Fort! G, Baldi E. Pathophysiology of sperm motility. Front Biosci 2006; in press
10. Luconi M, Baldi E. How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility. Cel! Mol Biol (Noisy-le-grand) 2003; 49: 357
11. Darszon A, et al. Ion ttanspott in sperm signalling. Dev Biol 2001; 240: 1
12. Darszon A, et al. Calcium channels and Ca2+ fluctuations in sperm physiology. Int Rev Cycol 2005; 243: 79
13. Castellano LE, et al. Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. FEBS Lett 2003; 541: 69
14. Ren D, et al. A sperm ion channel required for sperm moriliry and male fertility. Nature 2001; 413: 603
15. Walensky LD, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the aerosomes of mammalian sperm. J Cell Biol 1995; 130: 857
16. Ho HC, Suarez SS. An inositoi 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca(2+) store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. Biol Reprod 2001; 65: 1606
17. Gross MK, Toscano DG, Toscano WA Jr. Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. J Biol Chem 1987; 262: 8672
18. Jaiswal BS, Conti M. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. Proc Narl Acad Sci USA 2003; 100: 10676

19. Marin-Briggiler CI, et al. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and irs involvement in motility regulation. J Cell Sci 2005; 118: 2013
20. Ignotz GG, Suarez SS. Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembranated bovine sperm. Biol Reprod 2005; 73:519
21. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. Physiol Rev 2000; 80: 1483
22. Wasco WM, Orr GA. Function of calmodulin in mammalian sperm: presence of a calmoduiin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase associated with dernembranared rar caudal epididymal sperm. Biochem Biophys Res Commun 1984; 118: 636
23. Lindemann CB, et al. The calcium-induced curvature reversal of rat sperm is potentiated by cAMP and inhibited by anti-calmodulin. Cell Modi Cytoskeletonl991;20:3l6
24. Reyes A, et al. Concentrations of calmodulin in sperm in relation to their motility in fertile euspermic and infertile asthcnozoospermic men. Int J Androl 1987; 10: 507
25. Aitken RJ, et al. Analysis of calmodulin acceptor proteins and the influence of calmodulin antagonists on human spermatozoa. Gamete Res 1988; 21: 93
26. Luconi M, et al. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. Biol Reprod 1996; 55: 207
27- Carrera A, et al. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by *a* calcium/catrnodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. Dev Biol 1996; 180: 284
28. Lewis B, Aitken RJ. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. Biol Reprod 2001; 64: 1545
29. Vijayaraghavan S, Hoskhis DD. Changes in the mitochondrial calcium influx and efflux properties are responsible for the decline in sperm calcium during epididymal maturation. Mol Reprod Dcv 1990; 25: 186
30. Williams KM, Ford WC. The motility of dcmembranated human spermatozoa is inhibited by free calcium ion activities of 500 nmol/L or more. Int J Androl 2001; 24: 216
31. McLaughlin EA, Ford WC. Effects of cryopreservation on the intracellular calcium concentration of human spermatozoa and its response to progesterone. Mol Reprod Dev 1994; 37: 241
32. Schuh K, et al. Plasma membrane Ca2+ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. J Biol Chem 2004; 279: 28220
33. Tash JS, et al. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. J Cell Biol 1988; 106: 1625
34. Baker MA, et al. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. J Cell Sci 2004; 117: 211
35. Holt WV, Harrison RA. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. J Androl 2002; 23: 557
36. Osheroff JE, et al. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. Mol Hum Reprod 1999; 5: 1017
37. Rathi R, et al. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. Biol Reprod 2001; 65: 462
38. Visconti PE, et al. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. Biol Reprod 1999; 61: 76
39. Okamura N, et al. Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients. Fertil Steril 1986; 45: 265
40. David A, Frenke! G, Kraicer PP. Chemical composition of rabbit follicular fluid. Fertil Steril 1973; 24: 227
41. Okamura N, et al. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyciase. J Biol Chem 1985; 260: 9699
42. Chen Y, et al. Soluble adenylyl cyciase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. Science 2000; 289: 625
43. Sinclair ML, et al. Specific expression of soluble adenylyl cyciase in male germ cells. Mol Reprod Dev 2000; 56: 6
44. Litvin TN, et al. Synergism between calcium and bicarbonate. J Biol Chem 2003; 278: 15922
45. Leclerc P, Kopf GS. Mouse sperm adenylyl cyciase: general properties and regulation by the zona pcllucida. Biol Reprod 1995; 52: 1227
46. Baxendale RW, Fraser LR. Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyciase isoforms in mammalian spermatozoa. Mol Reprod Dev 2003; 66: 181
47. Harrison RA. Cyclic AMP signalling during mammalian sperm capacitation — still largely terra incognita. Reprod Domest Anim 2003; 38: 102
48. Zjppin JH, et al. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyciase in distinct signaling microdomains. FASEB J 2003; 17: 82
49. Zippin JH, et al. Bicarbonate-responsive 'soluble' adenylyl cyciase defines a nuclear cAMP microdomain. J Cell Biol 2004; 164: 527

50. Lefievre L, et al. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. J Androl 2002; 23: 709
51. Braun T, Dods RF. Development of a Mn-2+-sensitive, 'soluble' adenyiate cyclase in rat testis. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 1097
52. Esposito G, et al. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 2993
53. Hess KG, et al. The 'soluble' adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. Dev Cell 2005; 9: 249
54. Livera G, et al. Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. Mol Endocrinol 2005; 19: 12770
55. Bajpai M, Doncel GE Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. Reproduction 2003; 126: 183
56. Ficarro S, et al. Phosphoproteorne analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and val-osin-containing protein/p97 during capacitation. J Biol Chem 2003; 278: 11579
57. Mandal A, et al. FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. Biol Reprod 1999; 61: 1184
58. Petrunkina AM, et al. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. J Androl 2003; 24: 423
59. Yunes R, Doncel GF, Acosta AA. Incidence of sperm-tail tyrosine phosphorylation and hyperactivated motility in normozoospermic and asthenozoospermic human sperm samples. Biocell 2003; 27:29
60. Buffone MG, et al. Capacitation-associatcd protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. Reproduction 2005; 129: 697
61. Buffone MG, et al. Decreased protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity in spermatozoa from infertile men with varicocele. Mol Reprod Dev 2006; in press 6 [review]
62. Buffone MG, et al. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. Hum Reprod 2004; 19: 139
63. Vijayaraghavan S, et al. A tyrosine-phosphorylated 55-kilodalton motility-associated bovine sperm protein is regulated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and calcium. Biol Reprod 1997; 56: 1450
64. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. Biol Reprod 1996; 55:684
65. Patil SB, et al. Reactivation of motiliry of demembranated hamster spermatozoa: role of protein tyrosine kinase and protein phosphatases. Andrologia 2002; 34: 74
66. Si Y, Okuno M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. Biol Reprod 1999; 61: 240
67. Visconti PE. Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. Dev Biol 1997; 192: 351
68. Luconi M, et al. Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. J Cell Sci 2004; 117: 1235
69. Luconi M, et al. Tyrosine phosphorylation of the A kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenyiate cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. Biol Reprod 2005; 72: 22
70. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. Biol Reprod 1997; 56:707
71. Visconti PE, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. Development 1995; 121: 1139
72. O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Phosphorylation of the arginine-X-X-(serine/threonine) motif in human sperm proteins during capacitation modulation and protein kinase A dependency. Mol Hum Reprod 2004; 10: 355
73. Miki K, et al. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. Dev Biol 2002; 248: 331
74. Turner RM, et al. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. J Androl 2001; 22: 3025
75. Baccetti B, et al. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. Hum Reprod 2005; 20: 2790
76. Yeung CH, Sonnenberg-Riethmacher E, Cooper TG. Infertile spermatozoa of c-ros tyrosine Idnase receptor knockout mice show flagellar angulation and maturational defects in cell volume regulatory mechanisms. Biol Reprod 1999; 61: 1062
77. Yeung CH, et at. The cause of infertility of male c--ros tyrosine kinase receptor knockout mice. Biol Reprod 2000; 63: 612
78. Yeung CH, et al. Sperm volume regulation: maturacional changes in fertile and infertile transgenic mice and association with kinematics and tail angulation. Biol Reprod 2002; 67: 269

79. Rossato M, et al. Role of seminal osmolarity in the reduction of human sperm motility. Int J Androl 2002; 25: 230
80. Rossato M, Di Virgilio F, Foresta C. Involvement of osmo-sensitive calcium influx in human sperm activation. Mol Hum Reprod 1996; 903 O'Donnell L, et al. Estrogen and spermatogenesis. EndocrRev2001;22:289 Zhou Q, et al. Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. Proc NatlAcadSciUSA2001;98: 14132
83. Oliveira CA, et al. Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididyrnis. Biol Cell 2005; 97: 385
84. Saito K, et al. Localization of aquaporin-7 in human testis and ejaculated sperm: possible involvement in maintenance of sperm quality. J Urol 2004; 172: 2073
85. Lenzi A, et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. Fertil Steril 2003; 79: 292
86. Garolla A, et al. Oral carnitine supplemenration increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide, glutathione peroxidase levels. Fertil Steril 2005; 83: 355
87. Aitken RJ, et al. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. J Cell Sci 1998; 111: 645
88. Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon -not waving but drowning. Adv Exp Med Biol 2003; 518: 85
89. Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. Hum Reprod Update 2004; 10: 387
90. Williams AC, Ford WC. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. Fertil Steril 2005; 83: 929
91. Calamera J, et al. Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenozoospermic, and polyzoospermic semen samples. Mol Reprod Dev 2003; 66: 422
92. Martin-Du Pan RC, Sakkas D. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? Hum Reprod 1998; 13: 2984
93. Lenzi A, Gandini L, Picardo M. A rationale for glutathione therapy. Hum Reprod 1998; 13: 1419
94. Tramer F, et al. Native specific activity of glutathione peroxidase (GPx-1), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) and glutathione reductase (GR) does not differ between normo- and hypomotile human sperm samples. Int J Androl 2004; 27: 88
95. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. Tn Knobil E, Neill JD, cds. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994: 189
96. Suarez SS, Dai X. Hyperacrivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. Bio! Reprod 1992; 46: 686
97. Ho HC, Suarezs SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. Reproduction 2001; 122: 519
98. Demott RP, Suarez SS, Hyperactivated spetm progress in the mouse oviduct. Biol Reptod 1992; 46: 779
99. Guakieri R, Talevi R. Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. Reproduction 2003; 125: 251
100. Fabbri R, et al. Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction. Fertil Steril 1998; 69: 112
101. Yao Y, Ho P, Yeung WS. Human oviductal cells produce a factor(s) that maintains the motility of human spermatozoa in vitro. Fertil Steril 2000; 73: 479
102. Kay VJ, Coutts JR, Robertson L. Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction. Hum Reprod 1994; 9: 2318
103. Sueldo CE et al. Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. Fertil Steril 1993; 60: 137
104. Olds-Clarke P, Johnson LR. t haplotypes in the mouse compromise sperm flagellar function. Dev Biol 1993; 155: 14
105. Tessler S, Olds-Clarke P. Linear and nonlinear mouse sperm motility patterns. A quantitative classification. J Androl 1985; 6: 35
106. Lindemann CB, Goltz JS. Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in criton X-100-extracted rat sperm. Cell Motil Cytoskeleton 1988; 10:420
107. Ho HC, Suarez SS. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivatcd motility. Biol Reprod 2003; 68: 1590
108. Quill TA, et al. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 12527
109. Avidan N, et al. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. Eur J Hum Genet 2003; 11:497
110. Nassar A, et al. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. Fertil Steril 1999:71:919
111. Si Y. Hyperactivation of hamster sperm motility by temperature-dependent tyrosine phosphorylation of an 80-kDa protein. Bioi Reprod 1999; 61: 247

112. Bajpai M, Asin S, Doncel GF. Effect of tyrosine kinase inhibitors on tyrosine phosphorylation and motility parameters in human sperm. Arch Androl 2003; 49: 229
113. Yunes R, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition increases tyrosine phosphoryiation and hypermotiliry in normal and pathological human spermatozoa. Biocell 2005; 29: 287
114. Cook SP, et al. Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. Dev Biol 1994; 165: 10
115. Wood CD, et al. Real-time analysis of the role of Ca(2+) in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. J Cell Biol 2005; 169: 725
116. Villanueva-Diaz C, et al. Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. Fertil Steril 1990; 54: 1180
117. Vilianueva-Diaz C, et al. Progesterone induces human sperm chemotaxis. Fertil Steril 1995; 64: 1183
118. Isobe T, et al. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. Hum Reprod 2002; 17: 1441
119. Jaiswal BS, et al. Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant? Biol Reprod 1999; 60: 1314
120. Spehr M, et al. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. Science 2003; 299: 2054
121. Spehr M, et al. Particulate adenylate cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. J Biol Chem 2004; 279: 40194
122. Sun F, et al. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. Hum Reprod 2005; 20: 761
123. Eiscnbach M, Rah D. Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilization. Am J Physiol 1992; 262: C1095
124. Cohen-Dayag A, et al. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. Proc Natl Acad Sci USA 1995:92: 11039
125. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press, 1999
126. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Hum Reprod Update 1997; 3: 403
127. Morrimet ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 2139
128. Mortimer ST, Swan MA. Variable kinematics of capacitating human spermatozoa. Hum Reprod 1995; 10:3178
129. Paston MJ, et al. Computer-aided semen analysis variables as predictors of male fertility potential. Arch Androl 1994; 33: 93
130. Hirano Y, et al. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. J Assist Reprod Genet 2001; 18: 213
131. Shibahara H, et al. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. IntJ Androl 2004; 27: 63
132. Curi SM, et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. Arch Androl 2003; 49: 343
133. Chemes H, The significance of flagellar pathology in the evaluation of asthenozoospermia. In Baccetti B, ed. Comparative Spermatology 20 years later. Serono Symposia Publications. New York: Raven Press, 1991; 75: 815
134. Chemes HE, et al. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. Hum Reprod 1998; 13: 2521
135. Chemes HE, et al. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. Fertil Steril 1987; 48: 664
136. Chemes HE. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. J Androl 2000;21:799
137. Afzelius BA, et al. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. J Cell Biol 1975; 66: 2252
138. Olmedo SB, et al. Pregnancies established through intracytoplasmic sperrn injection (ICSI) using spermatozoa with dysplasia of fibrous sheath. Asian J Androl 2000; 2: 1252
139. Gadella BM, et al. Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. Vet Q 1999; 21: 142
140. Flesch FM, et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. J Cell Sci 2001; 114: 3543
141. Aitken RJ, et al. Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. J Androl 1993;14:132
142. Windsor DP, White 1C. Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation. Mol Reprod Dev 1993; 36: 354
143. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays 1994; 16: 259
144. Isidori A, Latini M, Romanelli F. Treatment of male infertility. Contraception 2005; 72: 314
145. Redmon JB, Carey P, Pryor JL. Varicocele - the most common cause of male factor infertility? Hum Reprod Update 2002; 8: 53

146. Fretz PC, Sandlow JI. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. Urol Clin North Am 2002; 29: 921
147. Liu PY, Handelsman DJ. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. Hum Reprod Update 2003; 9: 9
148. Lenzi A, Gandini L. Characterization of human sperm. Hum Reprod 2002; 17: 842
149. Balercia G, et al. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. Fertil Steril 2005; 84: 662
150. Costa M, et al. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. Italian Study Group on Carnitine and Male Infertility. Andrologial994;26: 155
151. Lenzi A, et al. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Hum Reprod 1993; 8: 1657
152. Balercia G, et al. Coenzyme Q(10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia; an open, uncontrolled pilot study. Fertil Steril 2004; 81: 93
153. Acosta AA, Khalifa E, Oehninger S. Pure human follicle stimulating hormone has a role in the treatment of severe male infertility by assisted reproduction: Norfolk's total experience. Hum Reprod 1992; 7: 1067
154. Ashkenazi J, et al. The role of purified follicle stimulating hormone therapy in the male partner before intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 72: 670
155. Dirnfeld M, et al. Pure follicle-stimulating hormone as an adjuvant therapy for selected cases in male infertility during in-vitro fertilization is beneficial. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 93: 105
156. Caroppo E, et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone as a pretreatment for idiopathic oligoasthenoteratozoospermic patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2003; 80: 1398
157. Foresta C, et al. Treatment of male idiopathic infertility with recombinant human follicle-stimulating hormone: a prospective, controlled, randomized clinical study. Fertil Steril 2005; 84: 654
158. Krausz C, et al. Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. Hum Reprod 1994; 9: 471
159. Yovich JL. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. Hum Reprod 1993; 8: 1786
160. Rizk B, et al. Successful use of pentoxifylline in male-factor infettility and previous failure of in vitro fertilization: a prospective randomized study. J Assist Reprod Genet 1995; 12: 710
161. Paul M, Sumpter JP, Lindsay KS. The paradoxical effects of pentoxifylline on the binding of spermatozoa to the human zona pellucida. Hum Reprod 1996; 11: 814
162. Centola GM, Cartie RJ, Cox C. Differential responses of human sperm to varying concentrations of pentoxyfylline with demonstration of toxi-city.J Androl 1995; 16: 136
163. Tournaye H, et al. Use of pentoxifylline m assisted reproductive technology. Hum Reprod 1995; 10 (SuppI 1): 72
164. Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. Biochim Biophys Acta 1998; 1436: 127
165. du Plessis SS, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition enhances human sperm motility and sperm-zona pellucida binding. Int J Androl 2004; 27: 19
166. Luconi M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition enhances human sperm motility. Hum Reprod 2001; 16: 1931
167. Aparicio IM, et al. Inhibition of phosphatidylino-sitol 3-kinase modifies boar sperm motion parameters. Reproduction 2005; 129: 283
168. Luconi M, et al. Enhancement of mouse sperm motility by the PI3-kinase inhibitor LY294002 does not result in toxic effects on preimplantation embryo development. Hum Reprod 2005; 20: 3500

3

Erkek Üreme Sisteminin Patofizyoloji ve Genetiği

Christian F. Hoogendijk, Ralf Henkel

Çeviri: *Fikret Önol*[*]

GİRİŞ

Erkek germ hücreleri olan spermatozoalar spermatogenez adı verilen özel bir işlem sonucu meydana gelirler. Bu işlem sırasında spermatojenik kök hücreleri genom miktarında azalma ile morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere uğrar ve diploid hücrelerden haploid hücrelere dönüşürler. Spermatozoa sadece gövde olarak en küçük (sperm baş uzunluğu: 4-5 µm) ve en polarize (sperm başı önde, flajellum arkada) hücre olmakla kalmayıp kadın üreme sistemi gibi başka bir vücut dışı ortamda bile işlev görebilen tek hücredir. Bu nedenle spermatozoalar görevi basitçe "genetik bilginin erkekten dişiye, yani oosite transferini sağlayan" ileri derecede özelleşmiş hücrelerdir. Sperm hücrelerinin bu görevi yerine getirebilmeleri için spermatozoanın morfolojik ve fizyolojik gelişimden geçmesi gerekmektedir. Ek olarak uygun bir kromozomal ve genetik yapılanma şarttır, yani kromozom ve DNA bütünlüğü bulunmalıdır.

Spermatogenez sırasında spermatozoalar ileride normal sperm fonksiyonu için gerekli epididimal olgunlaşma sürecine katılacak olan morfolojik ve fizyolojik gelişimde bulunurlar. Bu nedenle spermatogenez basamaklarında gerçekleşen işlemlerde bir problem olduğu taktirde bu durum kusurlu ve işlev görmeyen erkek germ hücreleriyle sonuçlanacaktır. Dolayısıyla üreme fizyolojisini iyi anlayabilmek için spermatogenez ile morfolojik ve genetik olayların detaylı öğrenilmesi büyük önem taşımaktadır.

SPERMATOGENEZİN GENETİK KONTROLÜ

Yapısal olarak anormal ve genetik olarak kusurlu spermatozoa arasındaki ilişki önemli bir bilinmeyen olarak karşımıza çıkmaktadır. Germ hücre farklılaşmasından olgun spermatozoa oluşumuna kadar süren spermatogenezdeki uzun olaylar zinciri hem yapısal hem de genetik hasarlara açık bir yolculuk haline gelmektedir. Spermatogenez 3 belirgin fazdan oluşmaktadır: (1) diploid spermatogonya kök hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması, (2) kromozomal eşleşme ve genetik rekombinasyonun meydana geldiği mayoz bölünme, (3) haploid, yuvarlak spermatidlerin bir dizi spesifik olayla türe özgü şekilli spermatozoaya dönüştüğü spermiyogenez. Bütün olarak tüm bu evreler çok sayıda gelişimsel basamaklardan oluşup erkek gametin genomuna hasar verebilecek sayısız fırsatlara zemin hazırlamaktadır. Bu kaygılar bilim adamları ve embriyologların fertilizasyon için spermatogenezi tamamlanmamış, olgunlaşması devam eden erkek germ hücrelerini kullanması sonucunda daha da artmaktadır. Sonuçta "oositlerin içine eksik/kusurlu erkek gametlerini vermiyor muyuz?" sorusu gündeme gelmektedir.

Spermatogonia Farklılaşması

Kök hücrelerinin çoğalan ve farklılaşan bir hücre popülasyonunu korumasını sağlayan karmaşık mekanizmalar günümüzde çözülmeye başlanmıştır.

[*] Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, Sakarya.

Memeli testisinde tip A spermatogonya kök hücreleri çoğalarak 3 tip spermatogonya oluşturur: (1) bir grup muhtemel benzer spermatogonya kök hücreler, (2) bir grup farklılaşan spermatogonyalar, (3) büyük miktarlarda apoptoz ile hücre ölümüne giden hücreler.[2] Bu gelişimsel kaskadın temeli olan tip A spermatogonyalar tip A_0, A_1, A_2, A_3 ve A_4 popülasyonlarından oluşan karışık bir topluluğu temsil etmektedir. Bu hücreler arasında "gerçek" kök hücrelerin kesin kimliği ve yapısı araştırılmayı beklemektedir. Çok sayıda kök hücre yenileme modelinin ortaya konulmasına karşılık üzerinde sıklıkla anlaşılan bir model tip A_0 spermatogonyaların yavaş bölünen ve testis hasarında tekrar çoğalabilen rezerv bir kök hücre topluluğu olduğunu ileri sürmektedir.[3] Bu nedenle tip A_1-A_4 spermatogonyaların yenilenen kök hücre spermatogonyalar olduğu ve erkekte fertiliteyi sağladığı düşünülmektedir.

Tip A spermatogonyalar ara spermatogonya ve tip B spermatogonyalara farklılaşırlar ki bunlar da bölünerek spermatozoa oluşumuyla sonuçlanan farklılaşma yolağına girerler. Bu hücresel programlama olayı geri dönüşümsüz gibi gözükmektedir, çünkü bir kez farklılaşmaya girdiklerinde spermatogonyalar kök hücre oluşumuna neden olan yolağa tekrar girememektedirler. Genetik olarak kusurlu spermatogonyalar tartışmasız önem taşımaktadır, çünkü kişinin hayatı boyunca spermatozoaların kökeni vazifesini görecek hücreler bunlardır. Yüksek sayıda spermatogonya kök hücrelerin apoptoza uğraması "kusurlu" kök hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlayan ileri düzenleyici mekanizmaların olduğunu düşündürmektedir. Bu dönemde somatik hücrelerde apoptoz mekanizmalarını açıklayan çalışmalar konusunda ciddi bir çaba bulunmaktadır. Araştırma gayretleri spesifik kök hücre gruplarının hangi mekanizmalarla hücre ölümü için hedef seçildiği konusunda derinleştirilmelidir. Özellikle testiste, (muhtemelen özgün monitörizasyon sistemleriyle) farklılaşan germ hücrelerinin hangi mekanizmalarla sürekli değerlendirildiğinin anlaşılması genetik olarak kusurlu germ hücre oluşumunun engellenmesinde önemli rol oynayacaktır.

Mayoz Bölünme

Mayoz bölünme, genetik hasarı da kapsayan genetik değişimlerin bilinçli olarak genoma yerleştirildiği, sonuçta türlerin evrimsel değişimine katkıda bulunan spermatogenezin olağanüstü bir evresidir. Diploid kök hücrelerden haploid gametlerin oluşumunda oynadığı önemli rolün ötesinde uzamış mayotik profaz evresi eksiksiz genetik rekombinasyon için gerekli hücresel ortamı sağlar.[4]

Mayotik profaz erkek germ hücresinin son yarıkonservatif DNA bölünmesinin gerçekleştiği preleptoten primer spermatositlerle başlar. Farklılaşan erkek germ hücrelerinde süren tüm DNA sentezi DNA hasarının sentezini belirtir. Leptoten ve zigoten spermatositlerin bazal membran bölgesinden seminifer tübüllerin lüminal kompartmanına göçüyle birlikte kromozom kondensasyonu başlar. Pakiten spermatositlerde homolog kromozomların hizalanması ve eşleşmesi tamamlanır. Kromozomlar kondensasyona uğradıkça her homolog kromozomun ikiz kromatidleri arasında aksiyal elemanlar belirmeye başlar. Kromozomlara görülebilir merkezi elemanın ilave olmasıyla synaptonemal kompleks oluşur ki bu küften insana kadar geniş bir yelpazadeki organizmaların mayotik hücrelerinde efektif sinaps için gerekli iyi korunmuş bir yapıdır. Kromozomların sinapsının genetik rekombinasyon için gerekli kritik bir olay olmasından dolayı mayotik hücreler kromozom ve DNA sıralanması, DNA kırılması, rekombinasyonu ve DNA tamiri için gerekli çok sayıda yeni yapısal protein ve enzim ihtiva eder.

Yakın zamanda genetik rekombinasyonda rol oynayan en önemli proteinler arasında bir bakteriyel rekombinan proteinin insan homoloğu olan Rad 51,[5] ailevi meme ve over kanserlerinde rol oynayan bir tümör baskılayıcı gen olan BRCA1,[5] DNA hasarını engellediği önerilen bir grup gen ailesine üye ATM-türevi genler,[6-8] protein yıkımında rol oynadığına inanılan bir ubiquitin-bağlayıcı tamir enzimi,[9,10] mayoza özgü DNA çift-sarmal kırıcı bir memeli homoloğu, [11] DNA rekombinasyon genleri,[12,13] ve mayoza özgü ısı şok proteinleri [14] gösterilmektedir. Mayoz bölünmenin türlerin devamı için gerekli olmasından dolayı kromozomal DNA'nın eşleşmesi, kırılması ve tamiri için özelleşmiş bir dizi düzenleyici mekanizma oluşmuştur. Böylesi düzenleyici mekanizmaların varlığına rağmen mayotik bölünme sırasında translokasyonların ve anöploidinin sık şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Bunun ötesinde, büyük sayıdaki bir infertil erkek popülasyonunda germ hücre farklılaşması mayoz sırasında durmaktadır.[15] Eşleşme ve kromozomal ayrılma anomalileri muhtemelen bu grup infertil hastalarda rol oynamaktadır. Ayrıca, mayoz için gerekli çok sayıdaki özgün moleküler aşama germ hücre oluşumunun durmasına neden olan genetik hasar ve yapısal defektlerin gelişmesine hedef oluşturmaktadır. Er-

kek ve kadında mayoz bölünme mekanizmalarıyla ilgili hızla artan bilgimiz erkek infertilitesinin nedenlerine yönelik önemli açılımlara olanak tanıyacaktır.

Spermiyogenez

Spermiyogenez, spermatogenezin olgunlaşan erkek gamette genetik ve yapısal defekt oluşumuna özellikle hassas olduğu bir dönemi belirtir. Yuvarlak spermatid azalmış tamir kapasitesinin bulunduğu bu süreçte uzamış ve polarize (önde sperm başı, arkada flejellum) spermatozona dönüşür. Ayrıca, spermiyogenez sırasında hücrede major bir yeniden yapılanma görülür. Nukleus uzar ve bir grup proteolitik enzim içeren akrozom oluşur. Kromozom düzeyinde somatik hücrelerin en yaygın kromatin proteinleri olan histonlar ileri derecede bazik geçiş proteinleriyle ardından protaminlerle yer değiştir ki bunlar da çok sayıda disülfit bağlarıyla sıkı bir şekilde yoğunlaşmış çekirdeği oluşturur. Aslında spermiyogenez sırasında oluşan sperm kromatin yoğunlaşması sperm çekirdeğinin tüm hacminin yaklaşık %90'unu oluşturan DNA alımıyla sonuçlanır. Normal somatik hücrelerde tam tersine DNA çekirdek hacminin yalnız %5'ini oluştururken mitotik kromozomlarda yaklaşık %15'ini oluşturur.[16]

Histonların spermiyogenez sırasında nükleozomdan yer değiştirmesi haploid genom DNA'sını özellikle tamir yeteneğinin kısıtlı olduğu bir dönemde hasara açık durumda bırakır. Spermatid gelişiminin erken evrelerinde program dışı DNA tamirinin olabileceğinin gösterilmesine karşın[17] spermiyogenez ilerledikçe program dışı DNA tamiri azalmakta ve mayozda yer alan üst düzey tamir mekanizmalarının işlev görüp görmediği bilinmemektedir. Spermiyogenezde meydana gelen majör çekirdek yeniden yapılaşmasına ilaveten gelişen germ hücresinde aksonem ve kuyruk oluşmakta ve bu fibröz kılıf[18] ve yoğun dış tabaka lif[19] proteinleri gibi çok sayıda yapısal proteinin sentezini gerektirmektedir. Bu hücresel değişiklikler genetik olarak stabil bir çekirdek oluşmadan önce aktif transkripsiyona uğrayan haploid genomdan yoğun bir gen ekspresyonunu gerektirmektedir. Gerçekte RNA transkripsiyonu spermiyogenez ortalarında kaybolmaktadır[20] ve spermatozoa oluşumu için gerekli olan spermiyogenezin ikinci yarısı boyunca yoğun protein sentezini translasyonel regülasyon kontrol etmektedir.[21-23]

Diferansiye olan spermatidde oluşan majör yapısal değişikliklere hücrenin enerji sağlayıcısı olan mitokondrilerdeki önemli değişiklikler eşlik etmektedir. Mitokondriler germ hücre farklılaşması ilerledikçe belirgin morfolojik değişiklikler gösterir. [24] Spermatogonyalar ve testiküler somatik hücreler çoğu somatik dokularda bulunan "puro şekilli" mitokondrileri bulundurur. Mayoz sırasında geniş ve vaküollü matrikse sahip mitokondriler "somatik" mitokondrilerle yer değiştirmeye başlar. Spermiyogenezin başlamasıyla "somatik" mitokondriler tamamen "germ hücre" mitokondrileriyle değiştirilmiş olur, ardından spermatozoanın hilal şekilli mitokondrileri hakim olur. Mitokondrideki bu yapısal değişiklikler protein kompozisyonundaki önemli değişikliklerle birliktedir[25,26]. Spermatid ve spermatositlerin 103 milyonun üzerinde mitokondri bulundurduğunun tahmin edilmesine karşılık her spermatozoa sadece yaklaşık 75 özgün helikal şekilli mitokondri taşır. Bu durum germ hücreler farklılaştıkça mitokondrilerin azalmasını, muhtemelen seleksiyonunu gerektirir.[27] Spermiyogenez sonunda artık parça uzaklaştıktan sonra elonge spermatidlerin sitoplazmasının çoğu ayrılmıştır ve sitoplazmik ribozom taşımamaktadır. Spermatozoalarda sitoplazmik protein sentezi olmamasına karşılık sitoplazmik mitokondrial protein sentezi devam eder.[28]

Spermiyogenez sırasında meydana gelen yoğun değişiklikler dikkate alındığında spermiyogenez sırasında germ hücre blokajı olan durumların erkekte infertiliteye yol açması sürpriz değildir. Orta kısım, aksonem, mitokondri veya kuyruk sentezi sırasında meydana gelebilecek kusurlar genellikle zayıf motiliteye sahip anormal spermatozoa gelişimine yol açacak, sperm çekirdeği veya baş kısmının yoğunlaşması için gerekli proteinlerin sentezinde oluşacak mutasyonlar anormal başlı spermlerle sonuçlanacaktır. Anormal görünümlü spermatozoaların varlığının bilinmesine karşın morfolojik alterasyonlarla genetik aberasyonları eş tutmak için henüz erkendir. Daha ötesi kritik genlerde spermatozoon morfolojisini bozmayacak minör bazçift yer değiştirmeleri genetik olarak kusurlu fakat görünüş olarak normal spermatozoalarla sonuçlanmaktadır.

Spermatogenezi tamamlayamamış erkeklerde sterilite tedavisinde yuvarlak spermatid çekirdeği (''ROSNI'') ve yuvarlak spermatid enjeksiyonlarının (''ROSI'') kullanıldığı dikkate alındığında genetik olarak kusurlu gametleri henüz saptayamıyor olmamız büyük önem taşımaktadır.[29,30] ROSNI ve

ROSI yöntemlerinin başarısı spermiyogenezin erkek germ hücresinin yeniden düzenlenmesi ve motil bir hücre oluşabilmesi için gerekli olduğu halde fertilizasyon için gerekli olmadığına işaret etmektedir. Böylece fertilizasyonla sonuçlanan normal fizyolojik seleksiyon işlemleri farelerde ve insanlarda ''bypass'' edilebilmektedir. Ancak spermatidlerin morfolojik incelemesi enjeksiyon için seçilen spermatidin olası genetik kusurları hakkında çok sınırlı bilgi verebilmektedir. Faredeki gibi ROSNI ve ROSI ile çok sayıda öncül hücrenin meydana gelip incelenebildiği memeli modelleriyle araştırma konusunda yoğun çaba harcanmalıdır. Bu işlemlerin öne çıkardığı merak konularından bir tanesi de erkek genomunda gen baskısının (''imprinting'') önlenip önlenmediğidir. Spermatozoada DNA metilasyonunun epididimde saptanmış olması da bazı soruları açığa çıkarmaktadır.[31] Bu yaklaşımların hayvan modellerinde detaylı analizleri yapılmadığı için ROSNI ve ROSI tekniklerinin yol açabileceği majör genetik tehlikelerle karşı karşıya olma ihtimalimiz mevcuttur.

SPERMATOZOONUN GENETİĞİ

Son birkaç yıl içinde sperm DNAsının yapısı ve işlevi konusunda daha önceleri bilim adamlarının ummadığı heyecan verici buluşlar olmuştur. Örneğin, paternal genomun muhtemelen spermiyogenezin normal bir kısmı olan endojen çentikler içerdiği saptanmıştır.[32] Bu çentiklerin spermiyogenezin son evrelerinde onarılmamış olduğu hastalarda fertilite azalmaktadır.[33] Bu çentiklerden sorumlu olduğu düşünülen topoizomerazlar tüm spermatogenez boyunca görülmekle beraber spermatozoada yer almamaktadır.[34,35] Evenson ve arkadaşları sperm DNA'sının belirli şartlar altında denatürasyon kabiliyetini ölçen sperm kromatin yapı analizini (SCSA) geliştirmişlerdir.[36-38] Bu kabiliyet ayrıca azalmış fertiliteyle korelasyon göstermektedir.[39] Muhtemelen en şaşırtıcı olanı Spadafora ve arkadaşları tarafından yayınlanan ve tam olarak olgunlaşmış fare spermatozoasının peternal genoma egzojen DNA parçaları yerleştirme potansiyelini gösteren çalışmasıdır.[40,41] Son olarak, erişkin hücreden bir koyun klonlanabildiğine göre[42], ve bu teknik sığır, fare, keçi, domuz, kedi ve tavşan gibi memeli hayvanlar, hatta rhesus maymunu ve primatlarda da başarılı olduğuna göre paternal genomun önemi ve embriyogenezdeki özel rolü gündeme gelmektedir.

Yukarıda bahsedilen buluşlar bizleri paternal genomun kristal yapısında sıkıca paketlenmiş olarak algıladığımız sperm DNA yapısı hakkında aslında fertilizasyon sırasında açılana kadar eylemsiz bir yapıya sahip olduğu konusunda düşünmeye sevketmiştir. Sperm kromozom yapısı aslında oldukça karmaşıktır, öyle ki bazı nitelikleri somatik hücrenin DNA organizasyonuna benzer iken diğerleri spermatogenik hücrelere özeldir.

Sperm kromatin paketlenmesi tartışılırken yapısının birkaç değişik özelliği vurgulanmalıdır. Bunlar söz konusu DNA'nın uzunluğuna göre farklı karmaşıklık seviyelerine ayrılabilir. Her kromozom her iki uçta telomerik tekrarlar ve uzunluğu boyunca sentromerik tekrarlar içeren bir çift sarmal DNA molekülünden oluşmaktadır. Kromozomlar uzunluk olarak birkaç milyon baz çiftinden oluşmaktadır ve tam olarak açıldığında her biri sperm nukleusunun kendisinden birkaç kat uzundur. Spektrumun diğer ucunda sadece birkaç DNA baz çiftine bağlanabilen sperm spesifik protaminler bulunmaktadır.

Sperm DNA paketlenmesi dört evreye ayrılabilmektedir. Aşağıdaki paragraflarda olgun sperm çekirdeğinde DNA paketlenmesinin farklı evrelerinin yapısal ilişkileri tartışılacaktır.

- *Evre I: Çekirdek Annulus ile Kromozomal Tutunma*

Sperm kromatin yapılaşmasının ilk basamağında kromozomu oluşturan iki çıplak DNA dizisi çekirdek anulusu adı verilen sperme spesifik bir yapıya tutunur. Bu yalnız spermatojenik hücrelerde bulunan ve kromozomal tutunma adı verilen yeni bir DNA organizasyon şekline işaret eder. NP-40 gibi noniyonik deterjanlarla yıkanan ve protaminlerin ayrıştırılması için yüksek tuzlu ve redaktan ajanlarla işlem gören spermatozoalar tamamen açılır (dekondensasyon) ve geriye çekirdek yapısından eser kalmaz. Ancak DNA kuyruğun tabanına tutunur kalır ki böylece sperm kromatini kuyruğu sap görevi gören bir süpürgeye benzer.[43] Bu kromozomal tutunma içinden protaminlerin uzaklaştırıldığı sperm çekirdeklerinde muhafaza edildiği için protamin bağlanmasından bağımsızdır. Ward ve Coffey sıçan spermatozoalarının implantasyon girintisine yerleşik, açılmış çekirdeklerde DNA'nın tutunduğu çekirdek anulusu adını verdikleri küçük bir yapı izole etmişlerdir.[43] Çekirdek anulusu bükülmüş halka şeklinde ve yaklaşık 2 μm uzunluğundadır. Sadece sperm çekirdeklerinde bulunur, ancak henüz spermiyogenezin hangi evresinde oluştuğu bilinmemektedir. Günümüze kadar herhangi bir so-

matik hücre tipinde çekirdek anulusuna benzer bir yapıya dair kanıt bulunamamıştır. Aksine, bu yapının sıçan,[43] insan,[44] fare ve *Xenopus* sperm çekirdeğinde bulunduğunu gösteren deliller mevcuttur. Geniş türler yelpazesinde bulunması sperm fonksiyonunda temel bir rol oynadığına işaret etmektedir.

Özel DNA sekanslarının çekirdek anulusuna eşlik ettiği saptanmıştır. Ward ve Coffey bu sekansları NA-DNA olarak isimlendirmiştir.[43] Bu özel sekansların varlığı çekirdek anulusunun kromozomlara rastgele DNA bağlanmasına değil özel DNA sekanslarına göre tutunduğunu düşündürmektedir. Yazarlar ayrıca farklı kromozomlar üzerindeki NA-DNA'ların spermiyogenezin erken evrelerine eşlik ederek her kromozomun spesifik bir bölgede kümeleşerek kromatin oluşumunu başlattığını ileri sürmektedir.

Bu hipotez Zalensky ve arkadaşlarının, sperm kromozomlarının çekirdek boyunca uzamış lifler halinde paketlendiğini ileri süren çalışmasıyla desteklenmektedir.[45] Şu ana kadar incelenen her kromozom çekirdek tabanında çekirdek anulusunun bulunduğu sadece bir bölgeye sahiptir. Kromozomları, her kromozomun NA-DNA bölgelerinin tek alanda kümeleşecek şekilde organize edilmesiyle çekirdek anulusu ayrıca sperm çekirdek şeklinin belirlenmesini de etkileyebilir. Örneğin, sıçan spermatozoonunda daha uzun olan kromozomlar çekirdeğin ince kancasına uzanabilirken her kromozomun bir kısmı çekirdek anulusuna yerleşiktir. Bu bulgu, DNA'nın sıçan sperm çekirdeğinde en yüksek konsantrasyonda tabanda, yani çekirdek anulusun bulunduğu bölgede paketlendiğini gösteren görüntüleme analizleri tarafından da desteklenmektedir. Tam aksine en düşük DNA konsantrasyonu kancalı kısımdadır[46].

Bu hipotez implantasyon boşluğunun yanındaki kromatinin spermiyogenez sırasında ilk yoğunlaşan alanlardan olduğunu gösteren elektron mikroskopisi çalışmalarıyla daha da desteklenmiştir[47]. Böylece çekirdek anulusu ayrı kromozom alanlarına spesifik sperm kromatin yoğunlaşmasının tek bilinen yönünü oluşturmaktadır.

- *Evre II: Sperm DNA İlmik Alanı (Loop Domain) Organizasyonu*

DNA ilmik alanı ('oop domain) organizasyonu

Bu evrede tutunmuş kromozomlar DNA döngü alanlarına organize olurlar. Çekirdek matriks kısımları, yapısal protein lifleri matriks yapışma kısımları (MARs) adı verilen DNA'ya her 30-50 kb'lik spesifik sekanslarla yapışırlar. Bu kromozom dizinlerini bir seri ilmik haline dönüştürür. Bu tip organizasyon preperasyonlarda deneysel olarak izlenebilir ve çekirdek halesi olarak bilinir. Her çekirdek halesi çekirdek matriksini çevreleyen bir DNA halesinden oluşur. Bu hale 25-100 kb uzunluğundaki tabanlarında matrikse bağlanmış çıplak DNA'dan oluşan ilmikleri içerir. Çekirdek halesinde izlenen her ilmik alanı in vivo koşullarda yoğunlaşmış halde bulunan bir kromatin yapısal ünitesinden meydana gelir.

Kromozomal tutunmada olduğu gibi DNA ilmik alan oluşumu da protamin bağlanmasından bağımsızdır. DNA'nın ilmik alanlarına organizasyonu şu ana kadar hem somatik hem sperm hücrelerinde çözülebilmiş tek yapısal organizasyondur. Somatik hücrelerde DNA nukleozom şekline sargılanır, bunlar da 30 nm'lik solenoid benzeri liflere sargılanarak DNA ilmik alanlarına organize olurlar. Sperm kromatinindeki eşdeğer yapı farklı bir görünüm arz etmektedir. Protamin bağlanması farklı bir sargılanma tipine yol açar, DNA sıkıca paketlenmiş toroidlere katlanır, fakat hala ilmik alanları şeklindedir. Memeli sperm çekirdekleri muhtemelen nukleozomlara dönüşen az miktarda histon ihtiva ederler[48,49], fakat DNA'nın büyük kısmı protaminler tarafından reorganize edilmektedir. Bu, sperm DNA'sını yoğunlaştırmak için olan evrimsel baskıyla kromatin yapısının tüm yönlerinin DNA'nın ilmik alanlarına organizasyonu dışında feda edildiği anlamına gelmektedir. Bu da DNA ilmik alanlarının sperm DNA fonksiyonunda önemli işlev gördüğünü belirtmektedir.

DNA ilmik alanı (loop domain) fonksiyonu

Somatik hücrelerde DNA ilmik alan organizasyonu hem gen ekspresyonun kontrolünde hem de DNA replikasyonunda rol almaktadır. Her DNA ilmik alanı çekirdek matriksinde ilmiğin tabanındaki enzimatik mekanizma tarafından sarıldıktan sonra sabit bir alanda replike olur.[50,51] DNA replikasyon bölgeleri memelilerde çekirdek matriksine lokalize edilmiştir[52], bu bölgelerin (replicon) değişik türlerde değişen boyutları ilmik alanlarının boyutuyla korele edilmiştir[53]. Bir replicon iki replikasyon bölgesi arasındaki mesafe olarak düşünülebilir. Farklı genlerin çekirdek matriksine yapışma noktaları hücre tipleri arasında farklılık gösterir ve ayrıca transkripsiyonda da rol alırlar. Aktif genler çekirdek matriksiyle sıkı bir ilişki içinde iken inaktif genler genellikle DNA ilmiğinin uzamış bölgelerinde yer alırlar[54-58]. Bu

anlamda, DNA'nın üç boyutlu organizasyonu DNA fonksiyonunda önemli rol oynar.

Sperm DNA ilmik alanlarının (loop domain) muhtemel fonksiyonu

DNA ilmik alanlarının spesifik konfigurasyonu sperm ve somatik hücreler arasında belirgin farklılık göstermektedir.[44,59] Somatik hücrelerde DNA replikasyon ve transkripsiyonu DNA ilmik alan yapılarının katıldığı en önemli görevlerdir.[48-53, 56-58] Ancak, olgun sperm çekirdeklerinin bu işlevlerden hiçbirisini görmediğinden dolayı[60] sperm DNA ilmik alan organizasyonun görevi net değildir. İki olasılık bulunmaktadır. Birincisi, spermatozoadaki DNA ilmik alan yapıları spermatogenez sırasında transkripsiyon veya DNA replikasyonu için gerekli artık yapılar olabilir. İkincisi, bu yapılar embriyoda kalıtsal olduğu takdirde embriyojenik gelişim sırasında yukarıda bahsedilen işlevleri düzenleyici role sahip olabilirler. Örneğin, yeni fertilize olmuş yumurtanın erkek pronükleusundaki paternal genler sperm çekirdeğinde olduğu gibi aynı DNA ilmik konfigürasyonuna organize olsa bu organizasyonun erken embriyolojik gelişimde DNA replikasyon ve transkripsiyonunda düzenleyici etkisinin olduğu düşünülebilir. Bu da sperm çekirdeğinin embriyoya embriyogenez sırasında işlev gören spesifik bir kromozomal mimari sunduğunu gösteren heyecan verici bulgulara delalet edecektir.

- *Evre III: Protamin Dekondensasyonu*

Sperm kromatin yapısı oluşumunun üçüncü evresinde protamin bağlanması DNA ilmiklerini sıkıca paketlenmiş kromatin haline getirir. Hud ve arkadaşları protaminlerin DNA'ya bağlandığında yarımay şekilli, DNA'nın ileri derecede konsantre olduğu yapılar oluşturduğunu göstermişlerdir.[61] Spermiyogenez sırasında somatik spermatojenik prekürsör hücrelerin DNA bağlayıcı proteini olan histonlar protaminlerle yer değiştirir. Histona bağlı DNA aynı miktarlarda protamine bağlı haldekinden daha çok hacim kapladığından dolayı kromatin yapısındaki bu değişim muhtemelen spermiyogenez sırasında oluşan çekirdek yoğunlaşmasının bir kısmından sorumludur. Histonlar DNA'yı, DNA'nın histomer proteinlerinden oluşan oktamer etrafına sarıldığı nukleozom yapısına organize ederek paketler. Diğer taraftan protaminler DNA'ya belirgin olarak farklı bir biçimde bağlanırlar. Bu pozitif yüklü proteinler DNA'ya büyük çentik boyunca bağlanarak DNA'yı komşu DNA dizinleri biribirine van der Waals kuvvetleriyle bağlanacak şekilde tamamen nötralize ederler. Protaminlerin DNA'yı kristale yakın bir halde bulunduğu yarımay şekilli yapılara sargıladığına inanılmaktadır.[61] Her yarımay bir DNA ilmik yapısı olduğunda protamin bağlanması yoğunlaşmaya ve yuvarlak spermatiddeki DNA ilmik alan yapısının korunmasına yol açacaktır.[62]

- *Evre IV: Kromozom Organizasyonu:*

Sperm kromatin paketlenmesinin sonraki aşaması olgun sperm çekirdeğindeki yoğunlaşmış kromozomların uzaysal yerleşimidir. Bu pek çok farklı açılardan incelenmiştir. İlk olarak Zalensky ve arkadaşları insan sperm çekirdeklerinde bütün kromozomların sentromerlerinin çekirdek merkezinde kümelenirken telomerlerin de periferde yerleştiğini göstermişlerdir.[45] Haaf ve arkadaşları da tam kromozomları analiz etmiş ve benzer sonuçlara ulaşmışlardır.[63] Son olarak Ward ve arkadaşları sıçan sperm çekirdeğindeki üç genin lokasyonunun 3 boyutlu haritalandırmasını yapmış ve her birinin çekirdeğin üçte birlik dış kısmında yerleşme eğiliminde iken genlerin pozisyonunda başka bir nitelikli farklılık saptamamışlardır[64]. Bu veriler kromozomların sperm çekirdeğindeki gerçek pozisyonunun sınırlı önem taşıdığı bir modelin öne sürülmesine yol açmıştır[65]. NA-DNA sekansları çekirdek tabanına, sentromerler merkezde ve telomerler perifer yerleşimlidir. Bu üç yapının haricinde kromozomun p ve q kollarının katlanması esnek bir olaydır. İlginç olarak bu tip bir organizasyon memeli spermatozoasında bulunmamaktadır. Bu türlerde kromozomlar uç uca hizalanmıştır[66]. Ancak incelenen çoğu ötaryen memelilerde sentromerler buna benzer uçuca yerleşmeyi imkansız kılacak şekilde merkezi organizasyondadır.

SPERMATOZOONUN EMBRİYOGENEZDEKİ ROLÜ

Yıllarca erkek fertilitesi in vitro olarak spermin oositi dölleyebilme kabiliyeti ve erken parçalanabilir-evre embriyoların elde edilebilmesi olarak tarif edildi. İnsan in-vitro fertilizasyonunda (IVF) spermin dölleyici potansiyeli için altın standart test döllenmiş yumurtanın 2-4 hücreli embriyoya dönüşebilme kabiliyetinden oluşmaktaydı. Tüm embriyoların spermin kalitesinden bağımsız olarak aynı gelişimsel potansiyele sahip olduğu varsayılıyordu. Daha sonraları birkaç yazar kötü morfolojik embriyo kalitesi ve zayıf embriyonik gelişim kabiliyetinin ileri

sperm morfoloji kusurları ve oligoastenozoospermi ile birlikte olduğunu gözlemledi.[67-69] Ek olarak Janny ve Menezo sperm kalitesi ve blastosist evresine ulaşabilme kabiliyeti arasında negatif bir ilişki saptadı.[70] Şu an bilmekteyiz ki sperm fertilitesindeki farklılıklar sadece sperm penetrasyon başarısızlığına bağlı değildir. Aşağıda bu embriyojenik kusurlarda yer alan kronolojik basamakların bir analizi yapılmaktadır.

Fertilizasyon sırasındaki erken kusurlar

Sentrozom

Spermatozoonun ilk epigenetik katkısı hücrenin mikrotübül yapıcı merkezi olan sentrozomdur. Mikrotubüllerin doğru oluşumu ve fonksiyonu kromozomların mayozda ayrılması ve erkek ve dişi pronukleusların göçü için zorunludur. Farelerde sentrozomun maternal geçişi Schatten [71] ve Simerly [72]'nin çalışmalarına kadar akılları karıştırmıştır. Bu organelin yarı konservatif yapısı ve mitozdaki kritik rolü dikkate alındığında anormal bir spermatozoondan kaynak alan kusurlu bir sentrozomun erken embriyogenezde problemlere yol açacağı açıktır, yani sitoplazmik fragmanların ve kromozomların anormal dağılımıyla sonuçlanacaktır.[72,73] Asch ve arkadaşları parçalı olmayan yumurtaların %25'e yakınının aslında döllenmiş olduğunu fakat hücre bölünme kusurlarına sahip olduğunu rapor etmişlerdir.[74] Sentrozomun bu patolojisine sentrin ve gama tubulin eşlik ediyor olabilir.[75] Sığır oositlerinde Navara ve arkadaşları sperm büyüklüğü ve kalitesiyle boğaların üreme performansı arasında pozitif bir ilişki saptamışlardır.[76]

Oosit aktivasyon faktör(leri)

Mayoz başlatılma işlemi muhtemelen sitostatik faktör (CSF) azalmasıyla sonuçlanan siklin B yıkımı ve $p34^{cdc2}$ refosforilasyonunun neden olduğu M fazından çıkışla tamamlanmaktadır.[77] Hücre içi kalsiyumun oositleri metabolik aktiviteye indükleyen evrensel sinyal olduğu genel bir görüştür. Henüz spermatozoonun kalsiyum hareketine nasıl yol açtığı net değildir. Isıya duyarlı [78] ve çözünebilir bir protein olan oscillin inositol fosfat yolağı üzerinden çalışmak suretiyle bu kalsiyum hareketlerinin kaynağı olabilir.[79]

Oscillin (veya diğer çözünebilir aktive edici faktörlerdeki) kusurlar Ron-El ve arkadaşlarının ifade ettiği gibi zigot oluşumundaki gecikmelere neden olabilir.[68] Ancak Eid ve arkadaşlarına göre sığır zigotlarındaki gözlemlerine dayanarak bu hipotez tek sebep olmayabilir.[80] Düşük fertilite potansiyeline sahip boğalardan elde edilen bir grup embriyoda pronukleer oluşumda herhangi bir gecikme izlememişler fakat zigotik S fazın başlamasında gecikme ve süresinde kısalmaya ilintili in-vitro azalmış embriyolojik gelişim saptamışlardır. Daha uzun S fazı in vivo yüksek fertiliteye eşlik etmektedir.

Zayıf kromatin paketlenmesi ve/veya DNA paketlenmesindeki anomaliler herhangi bir aktivasyon probleminden bağımsız olarak sperm dekondensasyon kusuruna katkıda bulunabilir.[81]

Fertilizasyon ve genomik aktivasyon başlangıcı arasındaki gelişim durakla-maları

Paternal genomu ilgilendiren ilk yüklü transkripsiyon ürünlerinin ortaya çıkmasından önce fertilizasyon ve genomik aktivasyon arasında babaya bağımlı etkilerin beklenmesi oldukça şaşırtıcıdır. Günümüzde iyi dokümente edilmiştir ki en uzun ayrılma süreci embriyojenik genom aktivasyonu ile ilgilidir.[82] Maternal mRNA'nın kaçınılmaz döngüsü ile diğer taraftan embriyonik transkriptlerin ilk yüklü sentezi arasında açıkça zamana karşı bir yarış bulunmaktadır. Optimal olmayan spermatozoaların getirdiği epigenetik kusurlara bağlı müteakip siklüslar boyunca artarak gelen kümülatif gecikmeler gelişimsel duraksamalara ve transkripsiyon başlamadan maternal depoların tükenmesine yol açar. In vitro koşullarda insan IVF embriyolarının üçte biri genomik aktivasyon esnasında duraklamıştır.[70]

Antisperm antikorlar da erken implantasyon gelişiminde olumsuz etkiye sahip olabilirler. Naz çok özel epitoplara karşı antikorların, özellikle ayırmakesme sinyal proteinleri (CS-1) veya OCT-3 geninin düzenleyici ürünlerinin immünonötralize olduğunda embriyoları bloke edebildiğini göstermiştir.[83]

Genomik aktivasyon ve implantasyon arasındaki gelişim duraklamaları

Genomik aktivasyon sonrasında morula ve blastosist arasında çok hassas bir geçiş dönemi mevcuttur. İlk farklılaşmayla birlikte embriyo içinde kompleks bir şekillenme gelişir. Janny ve Menezo bu noktada kötü semen kalitesi olan erkeklerde belirgin olan bir blastosist kaybı gözlemlemiştir (kontrol grubuna göre %31'e %22)[70]. Kötü semen kalitesinin

genomik aktivasyon sonrası dahi preimplantasyon gelişimine negatif etkisi olduğu sonucuna varmışlardır.

ICSI'den edinilen dersler

Erkek infertilitesi tedavisinde en heyecan verici buluşlardan birisi intrasitoplazmik sperm enjeksiyonudur (ICSI). Kötü sperm kalitesi göz önüne alındığında ICSI ile elde edilen başarı kısmen aşağıdaki faktörlere bağlanabilir. Düşük kaliteli spermle yapılan insan IVF'inde fertilizasyon sürecindeki gecikme[68] ve epigenetik problemlere eşlik eden gecikmeler, kümülatif etkileri hücre siklüsünü uzatabilir, geç bölünmelerle sonuçlanabilir (2. günde 2 hücreli embriyo, 3. günde 4 hücreli) ve maternal mRNA depolarının tükenmesine bağlı olarak genomik aktivasyon sırasında gelişim duraksamasına yol açar. Tam aksine ICSI'deki fertilizasyon işlemi sperm sitoplazmaya doğrudan enjekte edildiği için daha kısadır.

Van Landuyt ve arkadaşları ICSI sonrası blastosist oluşum oranlarının olağan IVF sonrakilerle benzer olduğunu göstermişlerdir.[84] Ancak derinlemesine bir analiz daha çok hastanın blastosist evresine ulaşamayan embriyolara sahip olduğunu göstermektedir. İlginç olarak blastosist gelişimi hususunda "ya hep ya hiç" kuralı geçerli gibi gözükmektedir. Bir blastosist elde edildiğinde hastadan gelen tüm embriyolar normal bir şekilde blastosiste gelişmektedir, öte taraftan 5. günde hiç blastosist görülmüyorsa herhangi bir embriyonun blastosiste dönüşmesi çok mümkün değildir.

Başarısız fertilizasyonun 24 saat sonrasında ICSI'nin bir faydası yoktur: bu noktada maternal mRNA rezervleri zaten fertilizasyondan genomik aktivasyona imkan sağlayabilecek seviyeden oldukça düşmüştür. Majör sperm kusurlarının ICSI uygulamasıyla düzeltilemeyebileceği kuvvetli bir ihtimaldir.

ICSI işleminin kendisi oligoastenotreatozoospermi ve genetik sperm bozuklukları arasındaki bağlantı gibi genetikle ilişkili riskler taşımaktadır. Bu özelliklerin bazıları Y kromozomun mikrodelesyonlarını içerir.[85] Optimal olmayan spermatozoanın olumsuz etkileri paternal DNA'nın bütünlüğü ve kalitesiyle ilişkilidir. 1985 yılında Bourrouillou ve arkadaşları sperm sayısının bir fonksiyonu olarak kromozomal anomalilerde bir artış saptamışlar,[86] 1995'te Moosani ve arkadaşları idiopatik infertiliteye sahip erkeklerin sperm popülasyonunda kromozomal bozuklukların açık bir şekilde arttığını göstermişlerdir[87].

Bu noktada IVF ve özellikle ICSI hastalarında oositleri yüksek insidansta DNA bütünlüğü bozulmuş ejakulattan elde edilen sperm ile döllemenin doğuracağı sonuçları vurgulamakta fayda vardır. Güncel bilgilere göre sperm DNA fragmantasyonu sadece bozulmuş embriyojenik gelişim ve erken embriyo ölümüne değil [74,88,89] ayrıca çocuklarda artmış çocukluk kanser riskine yol açmaktadır[90,91]. Bu artmış risk insan sperm DNA'sının geç spermatogenez evrelerinde ve epididimal olgunlaşma süresinde artmış hassasiyetine bağlıdır. Bu evrede DNA tamir mekanizmaları kapalı durumdadır ve özellikle Y kromozomu üzerinde erkek germ hücrelerinde genetik instabiliteye[92] yol açarak erkek cinsine özgü kanser riskiyle sonuçlanırlar[93]. Ancak bu DNA hasarı sadece bahsedilen intrensek faktörlere bağlı oluşmayıp ejakulatta lökositlerin oluşturduğu fazla miktarlardaki oksidanlar gibi ekstrensek faktörlerin de tetiklemesiyle oluşur[94]. Erken veya geç embiryogenez üzerine ICSI sırasında spermatozoonlarla taşınan mitokondrilerin etkisi halen tartışma konusudur.

Genomik baskı (imprinting)

Fare zigotlarının deneysel manipülasyonları açıkça göstermiştir ki normal embriyonik gelişim için maternal ve paternal genom arasında tamamlayıcı bir ilişki gereklidir. İmplantasyon ve geç gelişim tavşan ve farede izlenebilmesine rağmen partenogenez hiçbir zaman canlı doğumla sonuçlanmamaktadır. Surani ve arkadaşları iç hücre kitlesinin hipertrofiyle, ektsraembriyonik dokunun hipotrofisinin jinogenezle ilişkili olduğunu gözlemlemiştir.[95] Aksine kadın pronukleusunun uzaklaştırılmasını takiben paternal genom duplikasyonuyla oluşan androgenez ekstraembriyojenik dokuların hipertrofisine yol açmaktadır. Bu pronükleer evre kadar erken dönemde oluşan genomik baskıya da bağlıdır. Genomik baskı direkt olarak bazı genlerin metilasyon paternindeki varyasyonlarla ilintili gibi gözükmektedir. Genomik baskıda en önemli sistemlerden birisi IGF2/IGF2-R'dir.[96] Ligand paternal genomdan, reseptör maternal genom tarafından iştirak edilmektedir. Maternal ve paternal X kromozomlar preimplantasyon evresinde Xist lokusunun farklı metilasyon paternlerine bağlı olarak farklı inaktivasyona sunulmaktadır. Xist X kromozomu tarafından taşınan metilasyon başlatıcısıdır.

Bir tümör baskılayıcı olan H19 geni plasentada eksprese edilmekteyken molde edilmemektedir. Plasenta ve/veya plasental tümörlerin potansiyel invazifliği kalitatif ve kantatif olarak doğrudan paternal genomla ilintilidir.[97] Organizasyonu bozulmuş baskının erken preimplantasyon ve geç postimplantasyon evreleri üzerine zarar verici etkileri olabilir.

SONUÇLAR

Tartışıldığı üzere paternal faktörler net bir şekilde erken embriyogenez üzerinde majör etkilere sahiptir. Geçmiş yıllarda yardımcı üreme teknolojilerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. ICSI fertilizasyon sırasında izlenen sperm kusurlarını aşmak için önemli bir araç olarak tanıtılmıştır. Bu teknoloji erken preimplantasyon gelişimini etkileyebilecek bazı kusurları aşmada da yardımcı olabilmektedir. Spermin doğrudan sitoplazmaya enjeksiyonuyla kazanılan zaman erken preimplantasyon gelişimini engelleyen gecikmeleri ortadan kaldırabilir.

Ancak ICSI'nin erkeğe bağımlı kusurları evrensel bir biçimde kompanse edebilmesi mümkün gözükmemektedir. Daha ötesi bazı kusurların genetik temeli ve başka gizli genetik bağlar konusunda önemli soru işaretleri uyandırmaktadır. ICSI uygulamasını takiben sayısı artan çocuklar bizlere genetik kusurların geçişi konusunda önemli bir veri tabanı oluşturmaktadır.Günümüze dek Y kromozomunda mikrodelesyonları olan babalarda infertilitenin bir erkek jenerasyonunda diğerine geçtiğini gösteren kuvvetli kanıtlar bulunmuştur.[98,99] Erkek infertilitesinin bu örneklerinin DAZ (deleted in azospermia) ve RBM (RNA-bağlayacı motif) gibi delesyon genlerine bağlı olduğuna inanılmaktadır. Bu genler Y kromozomuna bağlı mikrodelesyonlara haritalanmaktadır.[100-103]

KAYNAKLAR

1. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 1997; 88: 287
2. Dym M. Spermatogonial stem cells of the tcstis. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 11287
3. Dym M, Clermont Y. Role of spcrmatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following X radiation of the rat testis. Am J Anat 1970; 128: 265
4. Stern H. The process of meiosis. In Ewing L, Desjardin C, eds. Cell and Molecular Biology of the Testis. New York: Oxford University Press, 1993: 296
5. Scully R, et al. Association of BRCA1 with Rad 51 in mitotic and meiotic cells. Cell 1997; 88: 256
6. Zakian VA. ATM-related genes: what do chey tell us about functions of the human gene? Cell 1995; 82: 685
7. Barlow C, et al. A paradigm of ataxia telangiectasia. Cell 1996; 86: 159
8. Keegan KS, et al. The Atr and Arm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. Genes Dev 1996; 10: 2423
9. Roest HP, et al. Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. Cell 1996; 86: 799
10. Kovalenko OV, et al. Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 2958
11. Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spol 1, a member of a widely conserved protein family. Cell 1997; 88: 375
12. Edelmann W, Kucherlapati R. Role of recombination enzymes in mammalian ceil survival. Proc Natl Acad Sci USA 1996:93:6225
13. Edelmann W, et al. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. Cell 1996; 85: 1125
14. Dix DJ, et al. Targeted gene disruption of Hsp 70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 3264
15. Reijo R, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-blnding protein gene. Nat Genet 1995; 10:383
16. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells [Review]. Biol Reprod 1991; 44: 569
17. Sega GA. Unscheduled DNA synthesis (DNA repair) in germ cells of male mice - its role in the study of mammalian mutagenesis. Genetics 1979; 92:49
18. Morales CR, Oko R, Clermont Y. Molecular cloning and developmental expression of an mRNA encoding the 27kDa outer dense fiber protein of rat spermatozoa. Mol Reprod Dev 1994; 37: 229

19. Carrera A, Gerton GL, Moss B. The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. Dev Biol 1994; 165: 272
20. Kierszenbaum AL. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. Endocr Rev 1994; 15: 116
21. Hecht NB. The making of a spermatozoon: a molecular perspective. Dev Genet 1995; 16: 95
22. Spirin AS. Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translocation barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? Mol Reprod Dev 1994; 38: 107
23. Schafer M, et al. Translocational control in spermatogenesis. Dev Biol 1995; 172: 344
24. De Martino C, et al. Morphological, histochemical, and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. Cell Tissue Res 1979; 196: 1
25. Hecht NB, Bradley FM. Changes in mitochondrial protein composition during testicular differentiation in mouse and bull. Gamete Res 1981; 4: 433
26. Hake LE, Alcivar AA, Hecht NB. Changes in length accompany translocational regulation of the somatic and testis-specific cytochrome c genes during spermatogenesis in the mouse. Development 1990; 110: 249
27. Hecht NB, Licm H. Mitochondrial DNA is synthesized during meiosis and spermiogenesis in the mouse. Exp Cell Res 1984; 154: 293
28. Alcivar AA, et al. Mitochondrial gene expression in male germ cells of the mouse. Dev Biol 1989; 135: 263
29. Ogura A, MatsudaJ, Yanagimachi R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 7460
30. Fishel S, Aslam I, Tesarik J. Spermatid conception: a stage too early, or a time too soon? Hum Reprod 1996; 11: 1371
31. Ariel M, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. Nat Genet 1994; 7: 59
32. Bianchi PG, et al. Effect of DNA protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of marine and human mature spermatozoa. Biol Reprod 1993; 49: 1083
33. Sakkas D, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic spetm injection. Hum Reprod 1996; 11: 837
34. Morse-Gaudio M, Risley MS. Topoisomerase II expression and VM-26 induction of DNA breaks during spermatogenesis in Xenopus lacvis. J Cell Sci 1994; 107:2887
35. Chen JL, Longo FJ. Expression and localisation of DNA topoisomerase II during rat spermatogenesis. Mol Reprod Dev 1996; 45: 61
36. Evenson DP, et al. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science 1980; 210:1131
37. Evenson DP, Melamed MR. Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. J Histochem Cytochem 1983:31:248
38. Evenson DP, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA, eds. Methods in Cell Biology. Flow Cytometry, 2nd edn. Orlando: Academic Press, 1994; 42: 159
39. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. Cytometry 1996; 24: 167
40. Lavitrano M, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs; genetic transformation of mice. Cell 1989; 57: 717
41. Zoraqi G, Spadafora C. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. DNA Cell Biol 1997; 16:291
42. Wilmut I, et al. Viable off-spring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997; 385: 810
43. Ward WS, Coffey DS. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. Biol Reprod 1989; 41: 361
44. Barone JG, et al. DNA organization in human spermatozoa. J Androl 1994; 15: 139
45. ZalenskyAO, etal. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. Chromosoma 1995; 103: 577
46. Ward WS, et al. Localization of the three genes in the assymetric hamster sperm nucleus by fluorescent in situ hybridization. Biol Reprod 1996; 54: 1271
47. Loir M, Courtens JL. Nuclear reorganization in ram spermatids. J Ultrastruct Res 1979; 67: 309
48. Tanphaichitr N, et al. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. Exp Cell Res 1978; 117:347
49. Choudhary SK, et al. A haploid expressed gene cluster exists as a single chromatin domain in human sperm. J Biol Chem 1995; 270: 8755
50. Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. Cell 1980; 22:79
51-Jackson DA, Dickinson P, Cook PR. The size of chromatin loops in HeLa cells. EMBO J 1990; 9: 567
52. Vaughn JP, et al. Replication forks are associated with the nuclear matrix. Nucleic Acids Res 1990; 18: 1965
53. Buongiorno-Nardelli M, et al. A relationship between size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. Nature 1982; 298: 100
54. Robinson SI, Nelkin BD, Vogelstein B. The Ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells. Cell 1982; 28: 99
55. Cockerill PN, Garrard WT. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs

next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. Cell 1986; 44: 273
56. Gasser SM, Laemmli UK. Cohabitation of scaffold binding regions with upstream-enhancer elements of three developmentality regulated genes of D. melanogaster. Cell 1986; 46: 521
57- Mirkovitch J, Gasser SM, Laemmli UK. Relation of chromosome structure and gene expression. Philos Trans R Soc Lond Biol 1987; 317: 563
58. Gerdes MG, et ai. Dynamic changes in the higher-level chromatin organization of specific sequences revealed by in situ hybridization to nuclear halos. J Cell Biol 1994; 126:289
59. Nadel B, et al. Cell specific organization of the 5S rRNA gene cluster DNA loop domains in spermatozoa and somatic cells. Biol Reprod 1995; 53: 1222
60. Stewart TA, Bellve AR, Leder R Transcription and promoter usage of the myc gene in normal somatic and spermatogenic cells. Science 1984; 226: 707
61. Hud NV, Downing KH, Balhorn R. A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 3581
62. Ward WS. DNA loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. Biol Reprod 1993; 48: 1193
63. Haaf T, Ward DC. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. Exp Cell Res 1995; 219: 604
64. Ward WS, et al. Localization of three genes in the hook-shaped hamster sperm nucleus by fluorescent in situ hybridisation. Biol Reprod 1996; 54: 1271
65. Ward WS, Zalensky A. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromarin. Grit Rev Eukaryot Gene Expr 1996; 6: 139
66. Watson JM, Meyne J, Graves JA. Ordered tandem arrangement of chromosomes in the sperm heads of monotreme mammals. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 10200
67. Yovitch JL, Stanger JD. The limitations of in vitro fertilization from males with severe oligospermia and abnormal sperm morphology. J In Vitro Fere Embryo Transf 1984; 1: 172
68. Ron-El R, et al. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. Fertil Steril 1991; 55: 338
69. Parinaud J, et al. Influence of sperm parameters on embryo quality. Fertil Steril 1993; 60: 888
70. Janny L, Menezo YJR. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocysc formation. Mol Rcprod Develop 1994; 38: 36
71. Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gamctogenesis and its restoration during fertilization. Dev Biol 1994; 165: 299
72. Simerly G, et al. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's micro tubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. Nat Med 1995; 1:47
73. Palermo G, Munne S, Cohen J. The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. HumReprod 1994; 9: 1220
74. Asch R, et al. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. Hum Reprod 1995; 10: 1897
75. Navara CS, et al. The implications of a paternally derived centrosome during human fertilization: consequences for reproduction and treatment of male factor infertility. Am J Rcprod Immunol 1997; 37: 39
76. Navara CS, First N, Schatten G. Individual bulls affect sperm aster size and quality: relationship between the sperm centrosome and development. Mol Biol Cell 1993; 4: 828
77. Murray A. Creative blocks: cell cycle checkpoints and feed-back controls. Nature 1996; 359: 599
78. Dozortsev D, et al. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. Hum Reprod 1995; 10: 399
79. Swann K. The soluble sperm oscillogen hypothesis. Zygote 1993; 1:273
80. Eid LN, Lorton SP, Parrish JJ. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle, of the bovine embryo. Biol Reprod 1994; 51: 1232
81. Sakkas D, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 837
82. Sakkas D, Batt PA, Cameron AWN. Development of pre-implantation goat (Capra hircus) embryos in vivo and in vitro. J Reprod Fertil 1989; 87: 359
83. Naz RK. Effect of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. Biol Reprod 1992; 46: 130
84. Van Landuyt L, et al. Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure. Fertil Steril 2005; 83: 1397
85. Kremer JAM, et al. Microdeletions ofY chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. Hum Reprod 1997; 12: 687
86. Bourrouillou G, Dastugue N, Colobies P. Chromosome studies in 952 infertile males with sperm count below 10 million/ml. Hum Genet 1985; 71: 366
87- Moosani N, et al. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluoresence in situ hybridisation. Fertil Steril 1995; 64: 811
88. Jurisicova A, et al. Embryonic human leukocyte antigcn-G expression: possible implications for human prcimplantarion development. Fertil Steril 1996; 65: 997
89. Simerly C, et al. The inheritance, molecular dissection and reconstitution of the human centrosome

during fertilization: consequences for infertility. In Barratt C, De Jonge C, Mortimer D, Parinaud J, eds. Genetics of Human Male Fertility. Paris: EDK Press, 1997: 258

90. Ji BT, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 238
91. Aitken RJ, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998; 59: 1037
92. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122: 497
93. McElreavey K, Quintana-Murci L. Male reproductive function and the human Y chromosome: is selection acting on the Y? Reprod Biomed Online 2003; 7: 17
94. Henkel R, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertil Steril 2005; 83: 635
95. Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos: an analysis of mammalian development. Biol Reprod 1987; 36: 1
96. De Groot N, Hochberg A. Gene imprinting during placental and embryonic development. Mol Reprod Dev 1993:36:390
97. Goshen R, et al. The role of genomlc imprinting in implantation. Fertil Steril 1994; 62: 903
98. Chandley AC, et al. Deleted Yq in the sterile son of a man with a sattelite Y chromosome (Yqs). J Mcd Genet 1989; 26: 145
99. Kent-First MG, et al. Infertility in intracytoplasmic-sperm-injection-derived sons. Lancet 1996; 348: 332
100. Rcijo R, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat Genet 1995; 10: 383
101. Najmabadi H, et al. Substantial prevalence of microdeletions of the Y chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospet-mia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 1347
102. Reijo R, et al. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet 1996; 347: 1290
103. Pryor JL, et al, Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. N Engl J Med 1997; 336: 534

4

Erkek Gamet Hücresinin Fertilizasyon ve Embriyogeneze Katkısı

Gerardo Barfesol Sergio Oehninger

Çeviri: *Emir Şahbal*[*]

GİRİŞ

Klivaj, blastosit oluşumu ve implantasyon yoluyla izlenen memeli oositlerinin fertilizasyonunun normal progresyonu, spesifik genetik ve gelişim programlarının başarılı aktivasyonuna bağlıdır. Babaya ve anneye ait gamet hücrelerinin başarılı etkileşimi normal embriyonik gelişim için gereklidir. Oosit, mayozun, fertilizasyonun ve erken klivajın bazı önemli noktalarını kontrol etmekte olup, daha sonra embriyogenez içinde kendini gösteren embriyonik genomun epigenetik gelişmesini düzenler.

Spermatozoonun yardımcı rolü büyük ölçüde göz ardı edilmiştir. Bununla birlikte[1], dölleyici spermatazoonun babaya ait DNA'nın uygulanmasının ötesindeki önemli katkılarıyla birlikte beraberinde zigot gelişimini getirerek önemli bir rol oynadığını ve[2] bozulmuş "klasik" semen parametreleri bulunan ya da bulunmayan kısır erkeklerin anormal embriyogenez ile sonuçlanabilecek nükleer, organel-sitoplazmik ve sitoskeletal sistemler dahil olmak üzere farklı seviyelerde sperm bozukluğu(ları) ile ilişkilendirilebileceklerini gösteren bol miktarda kanıt birikmektedir.

Bu fenomeniye temel teşkil eden mekanizma(lar) tamamen anlaşılamamaktadır. Bu incelemede, embriyonik gen ekspresyonunun majör aktivasyonu öncesinde ve sonrasında kendini belli eden babaya ait etkilerin incelenmesine odaklanılmaktadır.

FERTİLİZASYONUN BİYOLOJİSİ

Sperm-oosit füzyonu

Sperm ekuatoryal bölge gamet füzyonunda merkezi bir rol oynamaktadır. İç ve dış akrozomal membranlar ile ekuatorlar bölgenin plazma membranı akrozom reaksiyonu ile bölge penetrasyonunun tamamlanmasının ardından sağlam kalır. Elektron mikroskopik çalışmalar, arka akrozom bizzat fagositik bir durumda oosit mikrovillüsleri tarafından yutulurken sperm ekuatoryal bölgede sperm-oosit membran füzyonunun meydana geldiğini ikna edici biçimde ortaya koymuştur.

Akrozom ile reaksiyona sokulan sperm, postakrozomal sperm bölgesinde plazma membranı kullanılarak yumurtalara bağlanır ve kaynar; bu bölge akrozomal egzositoz meydana geldikten hemen sonra füzyona girebilir. Spermin yumurta plazma membranına bağlanmasına yumurta üzerindeki sperm ve integrin α6β1 reseptörleri ile ilgili transmembran proteinlerine ait ADAM (disintegrin ve metalloproteinaz) familyasının bir üyesinin aracılık ettiği görülmektedir. Fertilin, sperm-yumurta füzyonunu engelleyebilecek sperm yüzeyi antijenlerine monoklonal antikorlar kullanılarak ilk kez Hint domuzunda tanımlanmış olan heterodimerik bir ADAM glikoproteinidir. Protein, benzeri domen

[*] Buca Devlet Hastahanesi, Üroloji Uzmanı, İzmir.

yapılarına sahip bir α ve β alt ünitesinden oluşmakta olup, prodomain ve metalloproteinaz domen uzaklaştırılarak sperm gelişimi süresince proteolitik şekilde işleme tabi tutulur.

Fertilin prosesi, sperm-yumurta bağına aracılık eden disintegrin domenine maruz kalınması ve olgun sperm koşullarında fertilinin doğru lokalizasyonuna olanak sağlanması konusunda son derece kritik öneme haizdir. Yakın geçmişte, immunoglobulin üst familyasının (membran protein leumo) mürin sperm-oosit füzyonunda kritik bir rol oynadığı saptanmıştır.

Ekuatorin, monoklonal antikor mMN9'un antijenik molekülü olan sperm-baş ekuatoryal bir proteindir. Farelerde sperm-yumurta füzyonundan sonra, ekuatorin sperm-baş ekuatoryal bölgesinden ayrılarak decondensing erkek pronükleusun yakınında kalır. Ekuatorin içerek ekuatoryal segment, muhtemelen kromatin şişmesi ve nükleer membran rekonstrüksiyonu nedeniyle çekirdeklerin uzağında tutulur. İlk hücre döngüsü esnasında epey bir süre sperm başının yakınında kalır ve bunun ardından proembriyonik hücrelerden birinin kalıtımına maruz kalır. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun (ICSI) ardından, ekuatoryal segment kortikal membran sistemi ile önceden etkileşime girmeden doğrudan oosit sitoplazmasına maruz kalır, ancak in vitro fertilizasyondan (IVF) sonra oosit konusunda ekuatorin dejenerasyonunun benzeri selüler olaylarını sergiler. Bu gözlemlerde, ekuatoryal arka akrozom ve ekuatorinin dökülmesi ve ICSI sonrasında bunların müteakiben dağılmaları için bir ön koşul olmayan membran etkileşimi lehinde savunma yapılmaktadır.

Erken proembriyonik klivaj yoluyla ekuatorinin sürekliliği sperm-kuyruk mikrotübülüsleri ve ara parça mitokondriyal kılıfın sürekliliği ile karşılaştırılabilir. Artakalan kuyruk mikrotübülüsleri 8 hücreli ya da blastosit aşamasına kadar muhafaza edilir. Ancak, artakalan ekuatorinin 4 hücreli aşama öncesinde biraz erken dejenerasyona uğradığı görülmektedir.

Oosit aktivasyonu

Oosit ve spermatozoon metabolik açıdan hareketsizdir; sperm-oosit bağı ve füzyonu hareketsiz oositi dinamik ve canlı zigota dönüştüren bir olaylar dizisini başlatır.

Bu prosesler metabolik oosit aktivasyonunu ve mayozun yeniden başlamasını içermektedir. Spermatozoonun bu dizini harekete geçirdiği hassas durumla ilgili her ne kadar farklı görüşler olsa da, tüm fertilizasyon sistemlerinde intraselüler kalsiyum iyon konsantrasyonunun yükselmesinin aktivasyon sinyalinin iletilmesi konusunda merkezi haberci olduğu açıktır.

Bu tepkileri başlatmak ve sürdürmek için spermatozoon tarafından kullanılan sinyal mekanizması(ları) belirsizdir. Burada, iki teori önerilmiştir: Füzyon ve reseptör teorileri (referans 16'da incelenmiştir). Füzyon teorisi, sperm kafasında kalsiyum salan etkin bileşenlerin bulunduğunu ileri sürmektedir. Füzyon teorisinin, spermden türetilen sitosolik fraksiyonlara ait enjeksiyonların kalsiyum salınımlarından sağlanması ve ayrıca ICSI'nın membran ile sperm etkileşimi olmadan aktivasyonla sonuçlanması bakımından da deneysel sonuçları bulunmaktadır.

Son zamanlarda, prokaryot glukozamin fosfat deaminaz ile ilgili olan osilin denen bir 33-kDa proetini içeren sitosolik sperm faktörünün memelilerde fertilizasyon sırasında yumurta aktivasyonunu tetikleyen kalsiyum salınımlarına sebebiyet vermekten sorumlu olduğu bildirilmiştir. Osilin, memelilerde spermatozoonun oositle kaynaştığı bölge olan spermatozoonun ekuatoryal segmentinde bulunmaktadır. Ancak, birden fazla deneysel kanıt parçası göstermiştir ki, osilin memeli hayvanlara ait sperm kalsiyum osilojeni değildir (referans 16'da incelenmiştir).

Tüm hayvan türlerine ait yumurtalarda, spermin tetiklediği inositol[1,4,5] trifosfat (IP3) üretimi gözlenen geniş kalsiyum dalgası paternlerini düzenlemektedir. Mevcut kanıt, IP3 reseptör sisteminin oositlerde kalsiyum salınımlarının temel aracısı olduğu konseptini desteklemektedir (referans 16'da incelenmiştir). Kalsiyum dalgalarının boyutsal organizasyonu kalsiyum salım makinelerinin intraselüler dağılımıyla ya da kalsiyum salan ikinci habercilerin lokalize ve dinamik üretimi ile harekete geçirilir.

Yüksek oranda polarize yumurta hücresinde, kortikal endoplazmik retikulum bakımından zengin kümeler global kalsiyum dalgalarının başlatılması için tahsis edilmiş pacemaker alanları olarak işlev görür. Kalsiyum sinyallerinin polarize yapısı, erken embriyonik klivajı düzenlemek suretiyle embriyonik örneklemeyi bizzat etkiler. Kalsiyum dalga paternlerinin daha sonraki gelişimde önemli bir rol oynayıp oynamadıklarının öğrenilmesi, mitoz ve

klivajı alt üst etmeksizin kalsiyum dalgalarının normal boyutsal-geçici paternine müdahale edilen çalışmalar yapılmasını gerektirecektir.

İki farklı mayotik kalsiyum dalgası pacemaker'ını gösteren ve bir gün içinde yüzen bir iribaşa dönüşen oldukça basit asidyen embriyo, özellikle mayotik kalsiyum dalgaları ile gelişme arasındaki ilişkiye ait çalışmalara uygundur. Gelecekte, kalsiyum dalgalarına ait paternler ile embriyolardaki fenotipik farklılıkları ilişkilendirmek mümkün olabilecektir.

Son yıllarda mitokondriler, intraselüler kalsiyum homeostazın temel düzenleyicileri olarak gösterilmiştir. Deniz kestanesi ve asidyen yumurtalar gibi hücrelerde, mitokontriler fertilizasyon kalsiyum transituvarları boyunca kalsiyumu ayırır. Mitokondrilerle kalsiyum sekestrasyonunun iki temel sonucu vardır. Birincisi, mitokondriler intraselüler kalsiyum salımını regüle edebilen pasif kalsiyum tamponları olarak işlev görmektedir. İkinci sonuç ise, mitokondriyal matristeki kalsiyumun oksidatif fosforilasyonun (ya da mitokondriyal adenozin trifosfat (ATP) sentezi) "çok zonlu" bir aktivatörü olmasıdır; Krebs döngüsünün dehidrojenazını ve elektron taşıma zincirini aktifleştirir ve F0/F1 ATP sentazı üzerinde doğrudan etkiye sahiptir.

Somatik hücrelerde ve asidyen yumurtalarda, mitokondriyal kalsiyum alımının mitokondriyal nikotinamid-adenin dinükleotidin (NAD+) NADH'ye indirgenmesini teşvik etmek suretiyle mitokondriyal solunumu uyardığı ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra, mitokondriyal ATP üretimi intraselüler kalsiyum salımını doğrudan regüle edebilmektedir: Magnezyum karışımlı ATP endoplazmik retikulum kalsiyum çentiklerini doldurmak için tüketilirken, ATP IP3 reseptörünü kalsiyum yoluyla aktivasyona duyarlı hale getirir. Bu nedenle, ATP arz ve talebinin sıkı bağlantısı erken memeli hayvan gelişimi için son derece önemli bir üstünlük sağlar. Mitokondrilerin maternal kalıtımı, mitokondrilerin potansiyel olarak zararlı reaktif oksijen türlerinden (ROS) korunmasını gerektirmektedir.

Artan ATP talebi üzerine uyarılabilen düşük oksidatif fosforilasyon seviyesinin sürdürülmesi, mitokondrilerin zararlı oksidatif strese maruz kalmalarını azaltacak bir araç sunmaktadır. Elde edilen veriler, kalsiyumun ATP arz ve talebinin birleştirilmesine yönelik bir mekanizma sağlayan fonksiyonel bağlantı olduğunu ileri sürmektedir. Maternal yaşlanmanın insan yumurtasındaki artan oksidatif stresle ilişkili olması nedeniyle, mitokondriyal fizyoloji ile ATP arz ve talep bağlantısının yaşlı kadınlardan elde edilen yumurtalarda bozulup bozulmadığını tanımlamak ilginç olacaktır.

Son zamanlarda, memelilerde kalsiyum salınımlarını ve yumurta aktivasyonunu (oosit aktivasyon faktörü, OAF) tetikleyen çözünür sperm faktörünün PLC olarak anılan yeni bir fosfolifaz C (PLC) formu olduğu ortaya konmuştur. Bu durum, gerek cRNA kodlayan PLCC'ye gerekse rekombinant bir PLCC'ye ait yumurtalara enjeksiyon yoluyla gösterilmiştir. Mevcut bir hipoteze göre, sperm ve yumurta plazma membranının füzyonu sonrasında spermden elde edilen PLCC proteini (muhtemelen bir sperm sitozolik faktör) yumurta sitoplazmasına nüfuz eder. Bu da, IP3 üretmek amacıyla bilinmeyen bir kaynaktan fosfatidilinozitol-4,5-biyofosfatın (PIP2) hidrolizi ile sonuçlanır (referans 34'de incelenmiştir).

Memeli hayvan yumurtalarındaki embriyolara geçişe ve yumurta aktivasyonuna ilişkin en erken göstergeler, egzositoz (CGE) ve mayozun yeniden başlaması yoluyla kortikal granül ekstrüzyonudur. Bu olayların yukarıda açıklanan kalsiyum salınımları vasıtasıyla tetiklenmesine karşın, intraselüler kalsiyum salımına ve seller aşağı akış olaylarına yol açan yumurta içerisindeki yollar tam olarak anlaşılmamaktadır. Kalsiyum transituvarları, gerek M fazı hızlandırma faktörünün gerekse sitostatik faktörün aktivitesini azaltmak suretiyle hücre döngüsünün yeniden başlamasını sağlar (referans 35'te incelenmiştir). Kalsiyum transituvarları ve/veya PLC aktivasyonu şu ana kadar tanımlanmamış bir mekanizma vasıtasıyla CGE'ye yol açmaktadır.

Yumurta aktivasyonunu bazı yönlerinin muhtemel endükleyicisi olarak Src familyası kinazları (SFK'ler) önerilmiştir (referans 37'de incelenmiştir).

Mevcut bir model, spermin yumurta membranı ile füzyonunun IP3 ve diasilgliserol (DAG) oluşturacak şekilde IPI2 hidrolizi ile sonuçlandığını iddia etmektedir. IP3, DAG protein kinazını C (PKC) aktifleştirirken IP3 reseptörleri yoluyla endoplazmik retikulumdan kalsiyum salımını tetikler. Hem intraselüler bir kalsiyum yükselişi hem de DAG yumurta aktivasyonuna, CGE'ye ve mayozun yeniden başlamasına katkıda bulunur. CFG'nin varlığı SFK aktivitesine bağlıyken, SFK aktivitesinin varlığı ise fertilizasyon sinyaline yanıt olarak mayozun

yeniden başlaması ile ilişkilidir. Ayrıca, kalsiyum salımının SFK'ların yukarıya akışı konusundaki rolü makul olarak değerlendirilmektedir (referans 37'de incelenmiştir).

Sperm mitokondriyal DNA ve fertilizasyon sürecindeki rolü

Mitokondrilerin, büyüme, yaşlanma ve apopitoz prosesleri boyunca memeli doku biyoenerjetiği kapsamında oynayacak derin rolleri bulunmakta olup, ancak aseksüel olarak çoğalan bağımsız bir yaşam formundan gelmektedirler. Vücuttaki çoğu hücre 103 ile 104 arasında mitokondriyal (mr) DNA kopyası içermektedir. Olgun oositlerde kopya sayıları biraz daha yüksektir (yaklaşık 105). Bu, enerjetik embriyojenez taleplerinin hazırlanması sırasında olabilmektedir, ancak buna ilişkin alternatif bir açıklama da, erken embriyojenez süresince replikasyon meydana gelmediği ve yeterli rezerv sağlamak için yüksek kopya satılarının gerekli olduğu yönündedir. DNA esasen mitokondride kopyalanıp çevrilen 13 proteini kodlayan yaklaşık 16.6 kb'lık sirküler bir molekül olarak mevcuttur. Bunlar, iç mitokondriyal membran üzerindeki elektron taşıma komplekslerine ait gerekli alt ünitelerdir. Mitokondriyal genom aynı zamanda bu proteinlerin çevrilmesi için gereken RNA moleküllerini de kodlamaktadır.

Spermatazoonlar metabolik olarak esnek olup, bazı türlerde aerobik ve anaerobik metabolizma arasında değişebilmektedir. Bu da muhtemelen maruz kaldıkları büyük oksijen gerilimleri aralığını testis ve epididimdeki yakın anoksiden vajinadaki ve in vitro ortam gerilimlerine yansıtırlar.

Somatik mtDNA'da olduğu gibi, spermatozoonların aralığı mutasyona karşı son derece savunmasız olup, normospermik erkeklerin en az %50'sinde önemli sayıda mtDNA kaybına rastlanmıştır.

Sperm mitokondrilerinin mutajenik ajanlara maruz kalacakları olasılığını sürdümek zorunda oldukları oldukça uzun süreli spermiyojenez ve epididimal matürasyon prosesi göz önünde bulundurulduğunda, bu belki de pek şaşırtıcı değildir. Aslında, kusurlu sperm mtDNA'yı embriyoya katkıda bulunmaktan alıkoyma ihtiyacı büyük olasılıkla paternal mtDNA'nın hayatta kalmasına karşı yapılmış olan başlıca seçim baskılarından birisidir. Aslında, Short bu asimetrik mtDNA kalıtımının spermatazoonlar değil, oosit vasıtasıyla amfimiksi ve anisomgaminin arkasındaki temel itici güç olabileceğini ileri sürmüştür. Bunun nedeni, mayozdaki uzun süreli hareketsizlik sayesinde embriyo gelişimi için sağlıklı bir mtDNA stokunu koruma ihtiyacıdır.

Erken embriyojenez süresince endojen proteolitik aktivite yoluyla yok etme amacıyla spermatozonlardan elde edilen mitokondrilerin hedeflendiği kanıtlanmıştır. Mitokondri gibi sitoplazmik organellerin tek ebeveynli (genellikle maternal) kalıtımı geniş çapta stratejilerle elde edilmiş e böylece uzun süreli uygunluk konsunda açıkçası derin bir öneme haizdir. Paternal mtDNA aktarımı olasılığını gösteren çoğu kanıt, tanım gereği doğada nadir görülen interspesifik kroslardan elde edilmektedir. Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada, Kaneda ve arkadaşları zigot sitoplazmasının mtDNA'nın kendisine veya kodladığı proteinlere değil, sperm ara parçasındaki nükleer DNA kodlu proteinlere dayalı olarak sperm mitokondrilerini tanımlayan ve yok eden türlere özgü bir mekanizmaya sahip olduğunu ileri sürmüştür.

Ubikuitinasyon-proteazom yolu

Nüfuz eden spermatozoona ait çeşitli yedek yapıların kaderi, sperm kaynaklı kromozomlara ek olarak diğer yapılarda bulunduğunun aşikar olması nedeniyle son zamanlarda inceleme altına alınmıştır.

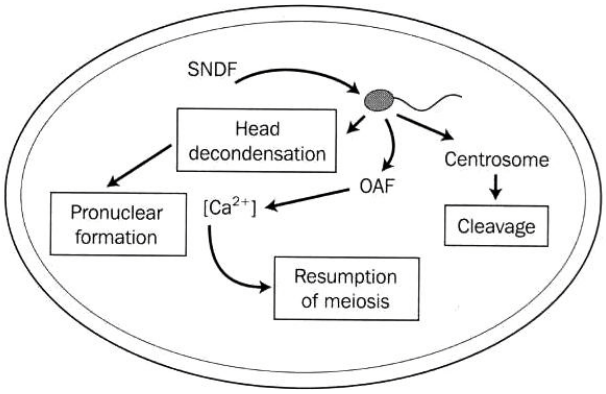
Daha yakın geçmişte, ubikuitin zinciri polimerizasyonunda işlev gördüğü belli olan E4 enzimleri tanımlanmıştır.

Pronükleer formasyon ve nükleer füzyon dölleyici spermatozoon şu üç kritik bileşene katkıda bulunmak için gereklidir: (1) paternal haploid genom, (2) metablolik-matürasyonel oosit aktivasyonunu başlatacak sinyal ve (3) başlangıçtaki zigot gelişimi süresince mitotik iğ hücreli karsinomların oluşumunun yanı sıra oosit-sperm aktivasyonuna yol açan nüfuz edilen oosit içerisindeki mikrotubulus grubunu yönlendiren sentrozom (Şekil 4.1).

Fertilizasyon, parental genomlar birleştiğinde (singami) tamamlanır ve nüfuz edilen oosit içerisinde yumurta çekirdeğinin mikrotubulus üzerindeki sperm çekirdeğine (dişi ve erkek pronükleuslar) geçişini gerektirir.

Erkek pronükleus, sperm asteri oluşturmak için mikrotubulüsleri çekirdeklendiren sentrozom ile yakından ilişkilidir. Sperm asterin büyümesi sentrozomu ve ilgili erkek pronükleusu hücre korteksinden oositin merkezine doğru harekete geçirir. Erkek pronükleusun aksine, dişi pronükleusta ne ilişkili bir sentrozom ne de mikrotubulüs çekirdeklendirme aktivitesi bulunmamaktadır. Yine de, dişi pronükleus mikrotubuküs ile birlikte hücre korteksinden sperm asterinortasında bulunan sentrozoma doğru hareket eder. Dişi pronükleusun hareketine yönelik mevcut model, organel motilitesine benzer şekilde eksi uçla yönlendirilen motor dinein kullanan mikrotubulüs örgüsü boyunca yer değişimlerini içermektedir.

Memeli fertilizasyonu genomik birleşime aracılık edecek dinein ve dinaktini ve dineinin sadece dişi pronükleusun etrafında yoğunlaşmasını gerektirmektedir. Bunun aksine, dinaktin her iki pronükleusun etrafında lokalize olur ve dineinine ek olarak nükleoporin ve vimentinle ilişkilidir. Dişi nükleusun yerini belirlemek amacıyla dinein için bir sperm asterin gerekli olduğu ve dinaktinin değil, dineini muhafaza etmek için mikrotubulüse ihtiyaç duyulduğuna dair bulgular yüzeyinde nudeoporinlerin, vimentin ve dinaktinin pronükleer oluşum ile ilişkili olabileceğini ve dişi nükleer yüzeyle müteakip sperm aster temasının dineinin bu proteinlerle etkileşim içinde olmasını sağladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.1. *Fertilizasyon boyunca kritik sperm bileşenleri. OAF, oosit aktivasyon faktörü; SNDF; sperm nükleer decondensing faktörü*

ANORMAL EMBRİYOJENEZE YÖNELİK PATERNAL KATKILAR İÇİN KANIT

Klinik kanıt: IVF/ICSI düzeninden alınacak dersler

Destekli üreme teknolojilerinin neden olduğu bazı klinik kanıt dizileri hatalı fertilizasyon ve anormal embriyojeneze yönelik paternal katkı konsepti için ek destek sağlamıştır.

- Özellikle teratozoosperma olmak üzere anormal sperm parametreleri (kesin kriterlerle tanımlanan zayıf prognoz paterni) hatalı (kısmi ya da tam) ve gecikmeli fertilizasyon dahil olmak üzere TVF'deki fertilizasyon bozuklukları ile ilişkilidir.
- Şiddetli teratozoosperma ve diğer seminal anormalliklerinin görüldüğü erkeklerde standart (konvansiyonel) TVF'nin sonuçları yalnızca fertilizasyonun arttığını değil, aynı zamanda normozoospermik numunelere kıyasla implantasyon oranlarının da azaldığını ortaya koymuştur.
- Konvansiyonel TVF'de düzeltici önlemlerin uygulanması (sperm inseminasyon konsantrasyonunun artırılması gibi) fertilizasyonun artması ancak implantasyon oranlarının beklenenden düşük kalması ile sonuçlanmıştır.
- Düşük sperm kalitesi in vitro blastosit aşamasına erişebilme yeteneğinin azalması ile ilişkili olmuştur.
- Yüksek bir inseminasyon konsantrasyonu ya da ICSI ile birlikte IVF'ye maruz kalan şiddetli teratozoosperma görülen hastalarda embriyo implantasyon potansiyeline yönelik karşılaştırmalı analiz, ICSI'nın üstün morfoloji ve implantasyon kompetansı ile embriyoların önemli bir oranını ürettiğini ortaya koymuştur.
- Her ne kadar birden fazla çalışma ICSI'yı müteakiben klinik hamileliklerin sonucunun semen kalitesinden etkilenmediğini ortaya koymuş olsa da, toplam teratozoosperma görülen hastalar çok düşük bir implantasyon ortanı sergilemiştir.
- İnfertil erkeklerin spermatozoonlarının çeşitli nükleer alterasyonlar içerdiği de ayrıca ortaya konmuştur. Bunlar, anormal bir kromatin yapısı, anöoploidi, kromozomal mikrokayıplar ve lifli DNA parçaları içermektedir.

Spermatozoonlardaki DNA hasarının kökenini açıklamak amacıyla farklı teoriler öne sürülmüştür (referanslar 2, 80 ve 82'de incelenmiştir). Spermiyojenez boyunca histonun protamin kompleksine geçişi sırasında DNA packingi esnasında ya da bunun sonucu olarak hasar meydana gelebilmektedir. DNA fragmantasyonu aynı zamanda doğrudan oksidatif hasarın sonucunda da meydana gelebilmektedir (serbest radikalle ortaya çıkan DNA hasarı antioksidan deplesyonu, sigara kullanımı, ksenobiyotikler, ısı maruziyeti, semene ilişkin lökosit kontaminasyonu ve sperm kültür vasatında iyonların varlığı ile ilişkilendirilmiştir).

Alternatif olarak, DNA hasarı apopitoz sonucunda meydana gelebilmektedir.

- Bu konudaki sayısız çalışma, düşük sperm kalitesi ile artan sperm anöploidi arasındaki ilişkileri, DNA hasarı, fragmantasyonu ve bu durumda intratuerin inseminasyonuna (IUI) ya da ICSI terapilerine maruz kaldığı belgenen düşük gebelik potansiyeline sahip tek lifli DNA'yı göstermiştir.
- Çocukların major konjenital malformasyon oranı ve gelişimsel potansiyelinin IVF ya da ICSI sonrasında anlaşılmasına ve doğal olarak benzer olmasına karşın, ICSI de nove kormozomal anormalliklerindeki hafif bir artışla ilişkilendirilmektedir. Bunun yanı sıra, son zamanlardaki yayınlarda, bozuklukların izlenmesinden kaynaklanan hastalıkların pek az ICSI çocuğu etkilediğinden ve semen kalitesi ciddi ölçüde bozulan erkeklerden alınan spermin Y kromozomu mikrokayıpları ile diğer genetik bozukluklar taşıyabileceği belirtilmektedir (referanslar 90 ve 91'de incelenmiştir). Sonuç olarak, kısır erkeklerden gelen spermatozoonlar potansiyel olarak yavruya aktarılabilen kromozomal ve/veya genetik anormallikler taşıyabilmektedir.

Ayrıca, hayvanlardaki ve insanlardaki bulgular paternal olarak aracılık edilen davranış etkilerine ilişkin veriler, erkekten geçen teratojenisite ve tümör indüksiyonu ve yavruda hassasiyet dahil olmak üzere genetik bozukluğun paternal aktarımına ilişkin kanıt sunmuştur. Eldeki kanıt, bazı mutajenlere paternal maruziyetle ilgili ön yargının bazı şartlarda yavruda advers etkilere neden olduğunu göstermektedir. Önerilen iki temel mekanizma, basil çizgisi genomik instabilitenin indüksiyonu veya basil hücresi apopitozunun supresyonudur (referans 93'te incelenmiştir). Sperm anormalliklerinin varlığının fertilizasyonun başarısız olmasına yol açabileceği kanıtlanmıştır. Kısır erkeklerin büyük bir oranında, sıkı bağ gerçekleştirme ve/veya akrozomal ekzositoza maruz kalma kapasitesindeki azalma dahil olmak üzere zona pellucida ile düşük etkileşime neden olan fonksiyonel sperm yetersizliği görülmektedir.

Ayrıca, oleomla yetersiz etkileşim bağlanma ya da füzyon anormalliklerine yol açabilmektedir. Açıkçası, spermatozoonların oosit yatırımlarına nüfus edememesi ya da sitoplazmada aktif hale gelememesi fertilizasyon ve embriyojenezi olumsuz hale getirmektedir.

Diğer sperm anormallikleri başarısız fertilizasyon ve anormal veya arest embriyo gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Bu tür olaylar fertilizasyonun gecikmesi, anormal oosit aktivasyonu, yetersiz sperm başı dekondansasyonu, bozuk pronükleer oluşum ve düşük embriyo klivajını içermektedir (referanslar 96, 98 ve 99'da incelenmiştir). Spermatazoon oosite nüfuz ettiğinde, sırasıyla tüm spermatazoonun oosit içerisine eklenmesi, oosit mayotikmatürasyonun ikinci polar gövdenin ekstrüzyonu ile tamamlanması, önceden hareketsiz olan oositin metabolik aktivasyonu, sperm çekirdeğinin dekondansasyonu ve erkek ve dişi pronükleuslardaki maternal kromozomlar ve bunları bir araya getiren pronükleusların sitoplazmik geçişleri dahil olmak üzere fertilizasyonu sağlamak için bazı olayların meydana gelmesi gerekir. Bu olaylardan herhangi birindeki kusurlar zigot için öldürücü olup kısırlığa neden olabilmektedir.

Daha önce bahsedildiği üzere, fertilize edici spermatozoonun oosite katkısının varsayılan bir oosit-aktive edici factor (OAF) ve bir sentriyol olan DNA/kromatinin iletilmesini içerdiği genel kabul görmüştür. DNA/kromatin kompleksi açıkçası yeni bir diploid bireyinin meydana getirilmesine ilişkin en önemli katkıdır.

Bununla birlikte, OAF ve sentriyol, oosit aktivasyonu, kortikal granül ekstrüzyonu ve ilk mitotik bölünmenin meydana gelmesinde kritik bir rol oynamakta olup, bu katkılar olmadan embriyojenez göz ardı edilecek ve anormal şekilde devam edecektir.

Spermin fertilizasyon sırasında primat modellerdeki (insan ve inasn dışı) kaderi çözülememektedir. Fertilizasyon sırasında spermin girdiği sentrozom ilk mitozda parental genomları bir araya getirmekle yükümlü olan bir mikrotubulüs dizisi organize eder.

Yapısal anormallikler ya da eksik sentrozom işlevi yeni bir kısırlık formu olarak tanımlanmıştır.

Bunun yanı sıra, paternal sperm kaynaklı mitokondriler ayrıca sitoplazmaya da girmekte olup, spesifik olarak yerleşik oosit ubikuitin sistemi ile bozunması amaçlanmaktadır. Bu fenomen, mitokondriyal DNA'nın maternal kalıtımına olanak tanır. Paternal mitokondriyal bozunma defektleri heteroplazmi ile sonuçlanabilmektedir.

Yeni kanıt terminal olarak gelişmiş spermatozoonların transkripsiyonel hareketsizliğe ilişkin geleneksel görüş ile mücadele etmiştir. Bazı raporlar, boşalan insan spermatozoonlarındaki mRNA'ların varlığını göstermiştir (referans 102'de incelenmiştir).

Bu şablonların mayotik rekombinasyon ve segregasyonun neden olduğu spermatozoal fenotiplerdeki dengesizlikleri dengelemek fonksiyonu dahil olmak üzere geç spermiyojeneze kritik şekilde dahil edilebilecekleri ve ayrıca bunların maternalden embriyotik genlere geçiş sırasında imprint oluşturma gibi erken post fertilizasyon olaylarına da dahil edilebilecekleri hipotezi ileri sürülmüştür. İnsan embriyosundaki hücre parçalanmaları OAF ve sentriyol dahil olmak üzere sperm nükleer genom ve sperm kaynaklı sitoplazmik faktörlerdeki eksikliklerle meydana gelebilmektedir. Yeni oluşturulmuş olan zigot, oositin endojen makinelerine bağlı olarak erken klivaj parçalanmalarına maruz kalır ve 4-8 hücreli aşamada, embriyojenik genom transkripsiyonunu başlatır. Dolayısıyla, sperm kaynaklıo genlerin major bir ekspresyonu başladığında, sperm nükleer eksiklikleri genellikle 8 hücreli aşamadan önce belirlenmez. Öte yandan, sperm sitoplazma eksiklikleri tek hücreli zigotta ve ardından preimplantasyon gelişimi vasıtasıyla mümkün olduğunca erken tespit edilebilmektedir.

"Geç" ve "erken" paternal etki terimleri bu iki patolojik koşulu ifade etmek amacıyla ortaya atılmıştır. Erken paternal etkinin teşhisi düşük zigot ve erken embriyo morfolojisi ile düşük klivaj hızına bağlı olup, sperm DNA parçalanması ile ilişkili değildir.

Diğer taraftan, geç paternal etki implantasyonun başarısız olmasına yol açan düşük gelişimsel yetenekle kendini belli eder ve zigot ve erken klivaj aşaması morfolojik anormalliklerin mevcut olmaması halinde sperm DNA parçalanması sıklığının artması ile ilişkilidir. Testiküler sperm içeren ICSI'nın geç paternal etki için yeterli bir tedavi olabileceği öne sürülmüştür.

Erken apternal etkinin olası anormal mRNA doğumlarının yanı sıra oosit aktivasyonu ve sentrozom ile sitoskeletal apereyle ilgili bozuklukları içerdiği düşünülebilir. Aksine, geç paternal etki DNA/kromatin bozuklukları/anormallikleri (sperm kromozomal genetik sapmalar, histonların retansiyonu ve/veya DNA hasarı dahil) ve belki de mitokondiriyal bozukluklarla ilişkilidir. Genomik baskı anomalilerinden kaynaklanan değişimler muhtemelen hem erken hem de geç etkilerle sonuçlanmaktadır.

Oosit aktivasyon bozuklukları ile sitoskeletal aperey disfonksiyonu ve mitokondirilerin eliminasyonu

PLCC, kalsiyum salımının memeli fertilizasyonu boyunca ne ölçüde tetiklendiğine ilişkin açıklama için moleküler temel sunmaktadır. OAF'ın bulunmaması veya disfonksiyonu ile açıklanabilen klinik durumlar mevcuttur. Örneğin, ICSI'nın ardından %40'a kadar meydana gelen başarısız fertilizasyon vakalarının yumurtanın aktive olamamasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Bu durumlarda, sperm sitoplazma içerisindedir, ancak görünüşe göre aktivasyon için gereken stimulus eksikliği söz konusudur. Elbette, spermatozoonun OAF sağladığı vakalar meydana gelebilmektedir, ancak oosite duyarlı sisteme ait çoklu elementlerden herhangi biri (SFK'lar, PIP2, IP3 reseptörü veya PKC) normalden sapmıştır, bu da mayozun devam edememesi veya CGE'ye maruz kalma ile sonuçlanır.

Fertilizasyon sırasında, zigotik sentrozom ilk mitoz öncesinde pronükleusların bir araya getirilmesi açısından son derece önemli olan geniş bir sperm asteri düzenler.

İnsan IVF'si sırasında başarısız fertilizasyondaki disfonksiyonel mikrotubulüs organizasyonu sentrozomal disfonksiyonun fertilizasyon arestinin bir nedeni olabileceğini ileri sürmektedir. Asch ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, mikrotubulüsler ve DNA döllenmemiş olarak çıkarılmış olan döllenmiş insan oositlerinde görüntülenmiştir. Eklenen sperm kuyruklarının mevcut cansız sayısı, aynı zamanda oosit ve mikrotubulüste değil kuyrukta bulunan ayrıca ötelenme sonrası modifiye ve asetile edilmiş α tubuline özgü monoklonal bir antikor kullanılarak da belgelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, fertilizasyonun çeşitli seviyelerde durduğunu göstermiştir: (1) metafaz II aresti; (2) spermatazoonun başarıyla eklenmesinden

sonraki arest; (3) sperm asteri oluşumundan sonraki arest; (4) mitotik hücre döngüsü progresyonu sırasında arest ve (5) mayotik hücre döngüsü progresyonu sırasında arest.

Rawe ve arkadaşları, İğ seçklinde ve sitoplazmik mikrotubulüsleri saptamak için β tubulinlerin dağılımını, sperm mikrotubulüsleri için α asetile edilmiş tubulinleri ve konvansiyonel IVF ya da ICSI sonrasında fertilizasyon başarısızlığı gösteren oositler içerisindeki kromatin konfigürasyonunu analiz etmiştir. İmmünofloresan analizi, IVF sonrasındaki fertilizasyon başarısızlığının temel nedeninin sperm penetrasyonu (%55.5) olmadığını göstermiştir. Kalan oositler, örneğin pronükleus yaklaştırmasındaki (%19.2) oosit aktivasyon başarısızlığı (%15.1) ve bozukluklar gibi farklı anormal paternler göstermiştir. Diğer taraftan, ICSI sonrasındaki fertilizasyon başarısızlığı esasen tam olmayan oosit aktivasyonu ile (%39.9) ve düşük ölçüde pronükleus yaklaştırmasındaki (%22.2) bozukluklarla ve sperm penetrasyonu (%13.4) ile ilişkilidir. ICSI'nın ek bir %13.3'lük kısmı ilk mitotik parçalanmanın metafazındaki gelişimlerini durdurmuştur.

Flüoresan görüntüleme taraması, sentrozomal kusurların genomik birleşimini önleyerek anormal mikrotubulüs çekirdeklenmesi ile sonuçlanabilir. Primat bir modelde, ICSI (görünüşte normal gamet hücreleri kullanılarak) sperm akrozomunun ve perinükleer tekanın varlığı nedeniyle sperm dekondansasyonu sırasında anormal nükleer model oluşumu ile sonuçlanmış olup, yapılar normal olarak IVF sırasında oolemmada çıkarılmıştır; bu karşılığında DNA sentezinde bir gecikmeye neden olmuştur.

Bu tür olağan dışı modifikasyonlar, ICSI sırasında fertilizasyon prosesi ve hücre döngüsü kontrol noktalarının "normalliği" ile ilgili endişeleri artırmıştır (referanslar 108 ve 109'da incelenmiştir).

ICSI işlemi sırasında, bir spermatozoon fertilize edilen oositlerde doğal olarak elimine edilen diğer sperm bileşenlerinin yanı sıra gerek akrozomal gerekse plazma membranları sağlam haldeyken ooplazmada birikir. Sperm akrozomu ooplazmaya salımı zararlı olabilecek çeşitli hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bakımından sağlam spermatozoonla enjekte edilmiş olan bir oositin sperm akrozomu ile ne ölçüde başa çıkacağı belirsizdir. ICSI yoluyla ooplazmaya sokulan bir akrozomun fiziksel olarak sperm kromatin dekondansasyonunu tahrip ettiğine inanılmaktadır. Paternal pronükleus benzersiz bir G1/S hücre döngüsü kontrol noktası tanımlayan akrozomal kapak altındaki apikal bölgede dekondansasyona maruz kaldığında DNA sentezi her iki pronükleusta da gecikir. Katayama ve arkadaşları sitoplazmaya eklenen sperm kafası bileşenlerinin lektin bağ özelliklerinin IVF sonrasındakilerden farklı olduğunu göstererek ICSI vasıtasıyla domuz sperm akrozomunun morfolojik özelliklerini ayrıntılı olarak ortaya koymuştur. Mayoz ve kortikal granüllü egzositozun yeniden başlaması mikromanipülasyon tekniklerinin ardından geçrekleştirilmiştir.

Terada ve arkadaşları, tavşan yumurtaları ile hetorolog ICSI kullanarak insane sperminin sentrozomal fonksiyonunu değerlendirmiştir. Sperm aster oluşum oranının kontrol deneklerine kıyasla kısır erkeklerde daha düşük olduğunu da ortaya koymuşlardır. Bunun yanı sıra, sperm aster oluşumu insan IVF'sini izleyen embriyonik klivaj oranı ile ilişkilendirilmiştir. Elde edilen veriler, ilk hücre döngüsü sırasında reprodüktif başarının fonksiyonel bir sperm sentrozomu gerektirdiğini ve bu organele ilişkin disfonksiyonların açıklanmayan kısırlık vakalarında meydana gelebileceğini ortaya koymuştur.

Kovacic ve Vlaisavljevic sperm kromatin ve sperm astral mikrotubülüs konfigürasyonunun oosit hücre döngüsünün fazları ile ne kadar ilişkili olduğunu belirlemek ve fertilizasyonun durmasına neden olan bu yapılardaki defektleri saptamak amacıyla ICSI sonrasında döllenemeyen insan oositlerinin mikrotübulüsünü ve kromozomlarını incelemiştir. II. metafazda yüksek oranda oosit durdurulmuştur. Bazı oositlerde ikinci mayotik iğ hasarı bildirilmiştir. Bazı vakalarda sağlam sperm saptanmış olup, diğerlerinde ise şişmiş sperm kafası ve vaktinden önce sıkıştırılmış sperm kromozomları görülmüştür. Pek çok monopronükleat oositi sperm çekirdeğinin dekondansasyonu prosesindeki gecikmeyle birlikte sperm ihtiva etmiştir. Oositi aktive etmeyen spermin kromatin dekondansasyonunu sürdürebileceği ancak oositin çoğunlukla spermde prematüre kromatin yoğunlaşmasına neden olmak ve sperm sentrozomunu çoğaltmak suretiyle dişiden önce erkek pronükleus oluşumunu engellediği sonucuna varılmıştır.

Sperm kuyruğunun erken insan embriyonik büyümesindeki işlevsel rolü (eklenmiş veya parçalara ayrılmış) bilinmemektedir. Mikroenjeksiyon deneylerinde, ayrılan sperm segmentlerinin enjeksiyonunun (kafalar veya kamçılar) oosit aktivasyonuna ve bipronükleer oluşuma müsaade edebileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, sağlam fertilizasyon spermatozoonunun yapısal bütünlüğünün normal insan embriyojenezine katkıda bulunduğu ileri sü-

rülerek bozulmuş spermli embriyolarda yüksek oranda mozaizm gözlenmiştir. Ayrıca, mekanik olarak ayrılan spermatozoonlarla enjekte edilen oositler pronükleer oluşum kabiliyetine sahip olmalarına karşın normal mitotik bölünmeye maruz kalmamıştır. Diseksiyonun ardından sperm bütünlüğü eşleşmediğinde bipolar iğsizlik mozaizm ile kombinasyon halinde mitotik cihazın anormalliklerini ileri sürmüştür.

Fertilizasyon parental genomlar birleştiğinde tamamlanır ve yumurta çekirdeğinin döllenen yumurta içerisindeki sperm çekirdeğine (sırasıyla dişi ve erkek pronükleuslar) geçişi gerektirir. Bazı hastalarda görülen zigotik gelişme eksikliği bu adımın anormalliklerinin kısırlığa katkıda bulunabileceğini ileri sürmektedir. Son zamanlarda, Payne ve arkadaşları tercihen lokalize dinein ve perinükleer dinaktinin nükleer gözenek kompleksi ve vimentin ile ilişkili olduğunu ve genomik birleşmeye aracılık etmesi gerektiğini göstermiştir. Elde edilen veriler, sperm aster mikrotubülleri üzerindeki dişi pronükleuslar, dinaktinle birlikte hareket etmesi durumunda nükleoporinler ve vimentin biriktirdiği ve bunlara bağlandığı bir model ileri sürmektedir.

C-terminal ubikuitin hydrolaz domen ile birlikte bir proteini kodlayan insan geni ubikuitin-spesifik preteaz-9 Y kromozom (USP9Y) daki mutasyonlar azospermi ve erkeklerde kısırlığa sebep olur[117]. E3 ubikuitin protein ligaz SIAH1A veya E2 ubikuitin konjuge enzim HR6B den yoksun knock- out farelerde mayoz, postmayotik üreme hücresi gelişiminde bozukluk ve erkekte kısırlık ortaya konmuştur[8]. Ubiquitin-aracılığıyla proteoliz, epididimisteki kusurlu spermin eliminasyonu, paternal mitokondrilerin klirensi ve memelilerdeki embriyonik gelişimin progresyonu gibi üremenin diğer safhaları açısından da oldukça can alıcı önem taşımaktadır.

Surovski ve çalışma arkadaşları[110], sperm ubikuitin artışının (akış sitometri sperm-ubikuitin tag immünoassay yöntemiyle ölçülmüştür) sperm kalitesiyle ters orantılı olduğunu kanıtlamışlardır. Buna karşılık, Muratori ve çalışma arkadaşları ise sperm ubikinasyonu ile sperm kalitesi arasında pozitif korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Bundan dolayı da, sperm ubikinasyonundan spermin fonksiyonel kapasitesinin biyomarkırı olarak yararlanılıp yararlanılamayacağının ve fertilizasyon anomalilerinin ubikuitin sperm izlenmesindeki anomalilerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi için çok daha fazla çalışmanın ortaya konmasına gereksinim duyulmaktadır.

Ubikuitin-aracılığıyla degradasyon proteoliz için hücre-siklus düzenleyicilerini hedeflemektedir. Cullinler E3 ubikuitin ligazların çekirdek bileşenleridir, ve CUL-4A nın hücre siklus kontrolünde muhtemelen bir rolü bulunmaktadır. Farelerde CUL-4A ile gerçekleştirilen delesyon mutasyon deneylerinde, homozigot mutantlardan coitumdan 7.5 gün sonra canlı pap veya homozigot embriyo geri kazanımı üremesi olmadığı gözlemlenmiştir[119]. Sonuçlar CUL-4A expresyonunun erken embriyonik gelişim açısından can alıcı önem taşıdığını göstermiştir.

Sperm mitokondrilerindeki ubikinasyona uğramış substratların gerçek kimliği bilinmemektedir. Gene de, sperm mitokondrisinde fertilizasyon sonrası ubikuitin-proteazom- bağımlı proteolitik işleyişinden sorumlu bir mitokondrial membran proteini prohibisyon yoluyla son dönemde ortaya çıkarılmıştır[121].

Bu tanımlama sisteminin beraberinde getireceği anomaliler; mitokondrial kalıtımın ve sperm kalite kontrolünün regülasyonundaki bozukluklar olabilmektedir.

mtDNA nın paternal kalıtımının ortaya geliş sıklığı insanlar dahil olmak üzere hayvanlarda[5] belirlenmiştir. Bu şekildeki kanıtların çoğunluğunun geniş ölçüde tartışmalı olmakla birlikte, dikkate değer husus ooplazmik transfüzyon sonrasındaki belgelenmiş heteroplazmik veya mutasyona uğramış mtDNA kalıtımıdır[112]. Gerçekten, heteroplazminin ooplazm transferinin doğrudan sonucu olduğu, genç oosit hücrelerinden elde edilen ooplazmanın yaşı ilerlemiş kadınlardaki genç oositlere enjekte edilmesi yoluyla kurtarmaya dayanan teknik aracılığıyla kanıtlanmıştır. ICSI, sperm mitokondrilerinin degradasyonunun geciktirilmesi bakımından inherent potansiyele sahiptir. Ancak, ICSI sonrasındaki paternal mtDNA kalıtımı henüz belgelenememiştir (referans 101 de ele alınmıştır).

mRNA nın hatalı gönderiminden kaynaklandığı kabul edilen fonksiyon bozuklukları

Son dönemde, mRNA insanın boşaltılmış sperminde belirlenmiştir. Kopyaların kapsamlı olmayan bir listesi, *c-myc*, insan lökosit antijen *(*HIA) klas 1, protaminler 1 ve 2, sıcaklık şok proteinleri 70 ve

90, ß-integrinler, transisyon protein- 1, ß- aktin, fosfodiesterazların varyantları, progesteron reseptör ve aromataz dahil olmak üzere, memeli sperminde geniş bir kopya aralığı kendisini göstermektedir[123-126].

Memelilerde, yuvarlak spermatidler, erken spermatogenez[127] evresinde veya transisyon proteinleri veya protaminler[128] gibi sperm-spesifik proteinleri veya dış yoğun lifler[129] ve fibröz kılıfın[130] moleküler yapısında olduğunu düşünülen sperm kuyruk sitoskeletal proteinleri kodlayan haploid gende meydana gelen spermiyogenez esnasında üretilmiş belli sayıdaki kopyaları içerir.

Kromatin organizasyonundaki büyük değişikliklerle birlikte görülen transkripsiyon aresti mid-spermiyogenez sırasında görülür[131] . Ancak, olgun sperm hücrelerinde yüksek orandaki çeşitlilikte görülen kopyaların varlığı hem rodent[132-133] hem de insan spermatozonlarda[134-138] tanımlanmıştır.

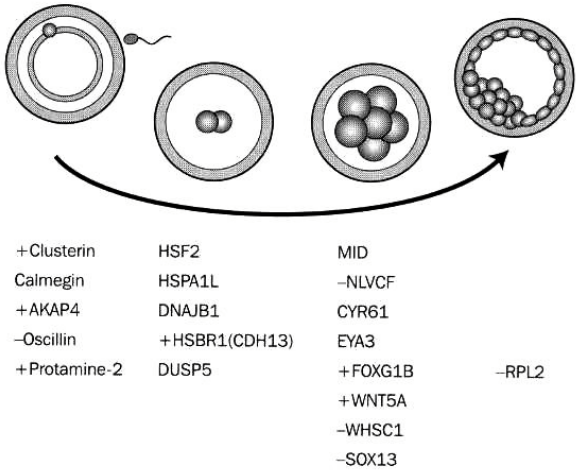
Olgun spermatozoalardaki RNA idantifikasyonuna yönelik araştırmaların çoğunluğu, revers transkripsiyon (RT-PCR) sonrasındaki polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) aracılığıyla spesifik veya belirli RNA dizilerinin belirlenmesine dayanan teknikler kullanılarak yapılmıştır. Gerçekten, tek bir spermatozoondan elde edilen RNA nın içiçe geçmiş haldeki (RT-PCR) ile insan sperm hücrelerindeki sinapsin I, immünglobülinler, ve Y-hücresi reseptör α[139] anormal kopyalar belirgin olarak gösterilmiştir. Böyle bir durum, uygunsuz transkripsiyon olarak adlandırılmaktadır, herhangi bir hücre tipindeki bir genin düşük düzeyli transkripsiyonu olarak tanımlanmaktadır[140].

Boşaltılmış insan spermatozoonunda, makroarray hibridizasyon, CT-PCR ve in situ hibridizasyon analizlerinin adım adım gerçekleştirilmesi sonucu farklı mRNA türleri belirlenmiştir. Hücresel işlev açısından esansiyel (sinyal transdüksiyon ve hücre proliferasyonu dahil olmak üzere) değere sahip faktörleri (NFxB, HOX2A, ICSBP, JNK2, HBEGF, RXRß ve ErbB3) kodlayan değişik kopyaları kapsayan genişletilmiş bir patern insan sperm çekirdeklerinde ortaya konmuştur. Sperm kromatinindeki rezidual DNA ve RNA polimeraz aktivitesinin varlığı da ayrıca açıkça bildirilmiştir[141-143]. Tamamlayıcı nitelikteki araştırmalar, insan sperminin baş kısmındaki yüksek miktardaki DNA paketlerinin varlığına rağmen, kromatinin aktif kromatine ait, öncelikle asetilad histonlar ve nükleozomların içerisine belirli kromatin domenlerinin düzenlenmesi gibi, bazı özellikleri muhafaza ettiğini göstermektedir[145.146]. Kapasitasyon esnasında insan spermindeki transkripsiyonal ve translasyonal aktivitenin ve aynı zamanda olgun spermdeki mRNA nın varlığını da açıklığa kavuşturan akrozom reaksiyonunun varlığı tanımlanmıştır[147.]Lambard ve arkadaşları[124], normospermik hastalardan alınan aynı örnekten elde edilen motilitesi düşük spermdeki aromataz mRNA düzeyinin, motilitesi yüksek olan sperme kıyasla anlamlı ölçüde düşük olduğunu göstermiştir; bu veriler, saptanan sperm mRNA profillerinin, normal fertil bir erkeğin genetik parmak izi olarak kullanılabildiğini düşündürmektedir.

Bu nedenle, bu veriler spermatozoonların insanlardaki mayotik ve postmayotik gen ekspresyonuna ilişkin bir bilgi deposu olduğunu ve muhtemelen spermiogenezde temel bir rol oynayan genler için transkriptler içerdiğini düşündürmektedir (Şekil 4.2). Dolayısıyla, tam anlamıyla infazif olmayan spermatid biyopsisi olarak tam ejakülat kullanımı değerlendirilmelidir[123].

Farklı mRNA tarafından kodlanan proteinler, muhtemelen hücre-hücre ve hücre-substrat etkileşimlerinde, fertilite oranının artışında, lipid transportunda, stre proteinlerinin membran geri kazanımı ve stabilizasyonunda ve hücre ölümü mekanizmasının uyarılması ya da inhibisyonunda rol oynamaktadır[148].

Sperm nükleusunda biriken mRNA'nın rezidüel işlevsel olmayan bir materyal olmaması halinde, erkek gametinin erken embriyogeneze katkısı olarak kabul edilebilmesi olasıdır[149]. Spermatozoon RNA'sının oosite ulaştığı, farelerde[150] ve insanlarda[148] gösterilmiştir. Fertilizasyona ve embriyon gelişimine katkıda bulunduğu bilinen proteinleri kodlayan bazı sperm transkriptleri, in vitro fertilizasyon başarısızlığından sonra, erken dönemdeki embriyonlarda spesifik olarak belirlenmiş, buna karşılık oositte saptanmamıştır[138]. Dolayısıyla, insan spermatozoonları yalnızca genom taşıyıcıları olarak değil, aynı zamanda embriyon genomunun aktivasyonundan önce zigotun canlılığı ve gelişimi için gerekli olan spesifik transkriptleri sağlayan materyaller olarak da işlev görmektedir.



Şekil 4.2. *Embriyon gelişimi sırasındaki spermatozoon mRNA transkriptleri ve varsayıma dayanan geçici ekspresyon (+ 148 no'lu referansta bildirildiği gibi, muhtemelen gelişimde rol oynayan mRNA transkriptlerini göstermektedir).*

Ostermeier ve ark.[102], kısa bir süre önce, yeni bir insan spermatozoal mRNA grubunu bildirmiştir. Yazarlar, daha önce mikro-RNA'lar olarak tanımlanmış olan bir grup RNA'yı ve in silico olarak öngörülen transkriptlerin anlamsız mRNA'ları (ya da sessiz kalan mRNA'lar) olan diğer RNA'ları belirlemiştir. Bu yazarlar, bu anlamsız RNA'ların fertilizasyonda bulunmasının erken post-fertilizasyon süreçlerine katılmalarına olanak sağlayabildiğini ileri sürmüştür. Bunlar, anneden embriyon genomuna geçişin düzenlenmesinde rol oynayabilmekte ve hatta imleme (imprinting) ile ilişkili olabilmektedir. Fukagawa ve ark.[151] ve Morris ve ark.[152], bu mRNA sınıfının, metilasyon yoluyla transkripsiyonal sessizlik sağlayabildiğini göstermiştir.

Nükleus/kromatin anomalilerine sekonder anormal embriyogenez

Yukarıda belirtildiği gibi, infertil erkeklerin spermatozoonlarının, anormal kromatin yapısı, anöploidi, kromozom mikrodelesyonları ve DNA zincirindeki kırılmalar da dahil olmak üzere, çeşitli nükleus değişikliklerini içerdiği gösterilmiştir (2 no'lu refernasta incelenmiştir). Mayozun, bir türün sağkalımı için çok büyük önem taşıması nedeniyle, dikkatle seçilen koruyucu seriler, kromozom DNA'sının eşleşmesi, kırılması ve onarımı yönünde evrimleşmektedir. Bu tür düzenleyici mekanizmalara karşın, translokasyonlar ve anöploidinin mayoz bölünmeler sırasında düzenli olarak ortaya çıktığı gayet iyi bilinmektedir.

Esterhuizen ve ark.[153], kromatin paketi (CMA3 boyama), sperm-zona bağlanma sırasındaki sperm morfolojisi ve IVF'nin başarısızlığa uğradığı oositlerde polar cisimcikler bulunmasının rolünü değerlendirmiştir. İhtimal oranı analizleri, CMA3 boyanma oranının ≥%60 olduğu gruptaki dekondansasyon başarısızlığı riskinin, CMA3 boyanma oranının <%44 olduğu gruba göre 15.6 kat yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrım yapmak üzere CMA3 fluoresansı kullanılarak, CMA3 boyama grupları ≥ %44-59 ve < %44 için sırasıyla %32 ve %16 olarak belirlenen penetrasyon başarısızlığına kıyasla, CMA3 fluoresans düzeyi yüksek olan gruptaki oositlerin %51'inin ooplazmasında sperm bulunmadığı saptanmıştır. Sperm kromatin kalitesi ve sperm morfolojisi değerlendirmelerinin, insanlardaki fertlizasyon başarısızlığı için yararlı klinik belirteçler olduğu gösterilmiştir.

Apopitozla ilişkili genlerin ektopik ekspresyonu ve inaktivasyonunun spermatogenezde anormalliklere neden olduğu gösterilmiştir. Spermatogenez sırasında, germ hücresinin proliferasyon işlemi ve olgunlaşması, diploid spermatogoninin olgun haploid sperm oluşturmasına neden olmaktadır. Gelişen çok sayıda germ hücresi, normal koşullar altında dahi, olgunluğa erişmeden apopitoz yoluyla ölmektedir[154]. Yaşam boyunca sürekli olarak meydana gelen fizyolojik germ hücresi apopitozuna ek olarak, germ hücresi apopitozundaki artış, ışın uygulaması ya da toksik maddelere maruz kalma gibi eksternal bozukluklardan da kaynaklanmaktadır[155]. Elde edilen kanıtlar, testiküler dokunun hücre bileşeni içinde, kaspazların, Sertoli hücrelerinin DNA fragmantasyonuna yol açan apopitotik süreçte önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir[104].

Ejaküle edilen spermatozoonlardaki apopitoz, çeşitli tiplerdeki hasarların bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir[156,157]. İn vivo olarak, apopitoz, testiküler (hormonun azalması, radyasyon, toksik ajanlar, kimyasallar ve ısının apopitoza neden olduğu gösterilmiştir), epididimal (anormal ve/veya yaşlanan spermatozoonlar ya da lökositler tarafından salınan - ROS ve diğer enflamasyon/enfeksiyon mediatörleri gibi - sinyallerin sonucu olarak) ya da seminal (ROS, antioksidanların bulunmaması ya da diğer nedenler) düzeylerde tetiklenebilmektedir. Apopitozu aynı zamanda kadın traktusunda mevcut

olan faktörler de tetikleyebilmektedir. İn vitro olarak, apopitoz uygun olmayan kültür besiyeri ortamıyla inkübasyon ya da diğer manipülasyon prosedürleri koşulları altında tetiklenebilmektedir. Uyarandan bağımsız olarak, apopitoza maruz kalan ve halen kullanılan metodolojilerle tanımlanamayan spermatozoonlar disfonksiyonel olabilmekte (fertilizasyon başarısızlığına yol açmaktadır) ya da daha çarpıcı bir biçimde, bunlar, yumurtaya hasara uğramış bir genomun taşınması riski oluşturabilmekte ve yetersiz embriyon gelişimi, düşük ya da çocukluk çağı anomalilerine yol açabilmektedir[158,159].

Ejaküle edilen insan spermatozoonlarında, tanımlanmış uyaranların var olması durumunda aktivasyon ve apopitoz mekanizmasının anahtar bileşenleri de dahil olmak üzere, somatik hücre apopitozu markerlerinin varlığını gösteren ikna edici kanıtları yayımlamıştık. Bunlar aşağıdaki gibi özetlenebilmektedir:

- İnsan spermatozoonlarında, somatik hücre apopitozu markerleri görülmektedir. Fertil ve infertil erkeklerden alınan spermatozoonlarda, kapasitasyon koşulları altında inkübasyon ve ejakülasyon durumunda, fosfatidilserin (PS) eksteryalizasyonu (indirekt immünofluoresans kullanılarak Anneksin V-FITC'ye [fluoresein izotiosiyanat] bağlanma yoluyla) ve DNA fragmantasyonunun (TUNEL [terminal deoksi nukleotid transferaz aracılı dUTP kırık ucu işaretleme] ve aynı zamanda monoklonal antikor [mAb] F7-26 kullanılarak immünofluoresans yoluyla) değişken düzeylerde olduğu gösterilmiştir[2,160,161].
- Apopitoz markerleri PS ekternalizasyonu ve DNA fragmantasyonu, motilitesi düşük olan sperm fraksiyonlarındaki (dismorfik ve disfonksiyonel spermin saptandığı) sıklığın, motilitesi yüksek olan fraksiyonlara kıyasla daha fazla olmasıyla ifade edilmektedir[2,161].
- Apopitoz markerleri, infertil erkeklerin spermindeki sıklığın, fertil kontrollere kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek olmasıyla ifade edilmektedir[156,161].
- İnsan spermi, hem inaktif, hem de aktif formlarda olmak üzere, majör öldürücü kaspaz olan kaspaz-3 içermektedir. İmmünoblot yöntemi kullanarak, ejaküle edilen spermde inaktif kaspaz-3 (32 kDa) varlığını ve aynı zamanda kaspaz-3 aktivasyonunu (17 kDa'lık proteolitik fragman) açık bir biçimde göstermiş ve bu durumu ayrıca immünofluoresan tekniği ve enzimatik tekniklerle de doğrulamıştık[161]. Aktif formu spesifik olarak tanıyan antikorun FITC ile işaretlenmesini içeren immünofluoresans tekniği kullanılarak, aktif kaspaz-3 yalnızca mitokondri ve rezidüel sitoplazmanın bulunduğu orta kısımda saptanmıştır.
- İnsan sperminde, kaspaz ailesinin diğer üyeleri olan kaspaz-7 ve -9 bulunduğu görülmektedir. İmmünoblot yöntemiyle, pek çok örnekte inaktif kaspaz-7 (35 kDa) ve kaspaz-9 (45 kDa) varlığının yanı sıra, infertil erkeklerden alınan örneklerde, aktif kaspaz-7 (32 kDa) ve kaspaz-9 (37 kDa) varlığını göstermiştik[162].
- İnsan sperminde, apopitozu indükleyen faktör (AIF) bulunmaktadır. İmmünoblot yöntemini kullanarak, insan sperminin AIF (67 kDA) (hücresel yerleşimini belirlemek üzere ileri araştırmalar gerekli olmasına karşın) ve muhtemelen, molekül ağırlığı 116-85 kDa'lık analoğundan ve somatik hücrelerde bulunan proteolitik fragmanından farklı olan 66 kDa'lık spesifik bir kaspaz substratı olan benzersiz bir PARP (poli [ADP-riboz] polimeraz) eksprese ettiğini göstermiştik[162,163].
- İmmünoblot yöntemiyle ölçüldüğü üzere, insan sperminin Bid protein (ne 25 kDa'lık tam, ne de 15 kDa'lık proapoptotik fragman) eksprese etmediği görülmektedir (yayımlanmamış gözlemler).
- Ejaküle edilen insan sperminde, mitokondri bölücü staurosporin ile kaspaz aktivasyonu tetiklenebilmektedir. 10 μmol/l (somatik hücrelerde apopitoza neden olan doz) staurosporin, kaspaz aktivasyonunu (kaspaz-3, -6 ve -7'yi ölçen DEVD analizi [Asp-Glu-Val-Asp]) ve DNA fragmantasyonunu anlamlı ölçüde arttırmakta ve bu da, kaspaz aktivasyonunun mitokondriye bağımlı bir yolakla gerçekleştiğini düşündürmektedir[162]. Staurosporinin sperm canlılığı üzerindeki doz bağımlı etkisini analiz ederek, 1-15 μmol/l doz aralığında zararlı herhangi bir etkisi olmadığını saptadık. Pan-kaspaz inhibitörü zVAD (benzoksi-Val-Ala-Asp) ile

önceden inkübasyon (50 μmol/l, 30 dakika), staurosporinin neden olduğu DNA fragmantasyonunu %50 oranında inhibe etmiştir (yayımlanmamış gözlemler).

- İnsan spermi, Fas ligandına herhangi bir yanıt vermemektedir. Fas ligandı, kaspaz aktivasyonu, PS translokasyonu ya da DNA fragmantasyonunu tetiklememektedir. Fas ligandı (anti-Fas monoklonal antikor), bağlayıcı olarak G-protein olmaksızın (2 μg/ml'de) ve G-protein ile birlikte 1 μg/ml'de (somatik hücrelerde apopitoza neden olan doz) test edilmiş ve kaspaz aktivasyonu, PS translokasyonu ya da DNA fragmantasyonu ortaya çıkmamıştır[162]. Bu veriler, ejaküle edilen insan sperminde Fas reseptörlerinin gösterilemediği yakın tarihli araştırmaların bulgularıyla uyumludur[164].
- Spermde en fazla hasar oluşturan ROS hidrojen peroksit, apopitoz markerlerinin ekspresyonuna neden olmaktadır. H_2O_2'nin PS translokasyonu ve DNA fragmantasyonunu arttırdığını göstermiştik[165]. H_2O_2, PS translokasyonu üzerinde doza bağımlı bir etki oluşturmuş ve in vitro canlılığı etkilemeksizin motiliteyi ve diğer sperm fonksiyonlarındaki bozulmayı başlattığını daha önce bildirdiğimiz doz olan 200 μmol/l düzeyinde anlamlı bir artışa neden olmuştur[166]. Buna ek olarak, H_2O_2, kaspaz aktivasyonunda orta dereceli bir artışa yol açmıştır.
- Ejaküle edilen insan sperminde, ROS üretimi ile DNA fragmantasyonu arasında güçlü bir korelasyon olduğu görülmekte ve bu da, mitokondri disfonksiyonu ile apopitoz markerlerinin ekspresyonu arasında bağlantı oluşturmaktadır. Ejaküle edilen spermde endojen ROS oluşumu (kemiluminisans ile ölçülmüştür) ve DNA zinciri kırıkları arasında anlamlı, pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştik[2].
- Ejaküle edilen spermde, mitokondri transmemban potansiyelinin bozulması ile PS translokasyonu arasında güçlü bir korelasyon olduğu görülmekte ve aynı biçimde bu da, mitokondri disfonksiyonu ile apopitoz markerlerinin ekspresyonu arasında bağlantı oluşturmaktadır. Bir mitokondri membranı sensör kiti kullanarak, PS eksternalizasyonu bulunan canlı hücreler içeren örneklerde mitokondri transmembran potansiyelinde görülen değişiklikleri belgelemiştik[167]. Bu testte, apopitotik ve sağlıklı hücrelerinin farklı fluoresans kazanmasını sağlayan katyonik bir boya kullanılmaktadır. Sonuçlar, motilitesi düşük sperm framsiyonlarındaki mitokondri membran potansiyeli değişikliklerinin, motilitesi yüksek fraksiyonlara kıyasla üç kat daha fazla olduğunu göstermiştir.

DNA onarımı inhibitörleri varlığında kültüre edildiklerinde, DNA'sı hasara uğramış spermatozoonlar tarafından fertilize edilen oositlerde daha fazla in vitro gelişim olmaması nedeniyle, oositin DNA hasarını onarma yeteneği olduğu görülmektedir[168-171]. Oositin onarım kapasitesi sınırlıdır ve sperm DNA hasarının derecesiyle ilişkilidir. Apopitotik spermin fertilizasyon kapasitesinin, sağlam spermatazoonlarla aynı derecede olduğu gözlenmiştir; bununla birlikte, embriyonun blastosit evresine ilerlemesi, DNA bütünlüğüyle yakından ilişkilidir[171].

Spermatogonyumların olgun spermatozoonlara dönüşmesi nedeniyle, spermatogenez sırasında karmaşık ve dinamik bir proliferasyon ve farklılaşma işlemi meydana gelmektedir. Bu benzersiz işlem, bir dizi mayoz ve mitozu, sitoplazma mimarisindeki değişikliği, somatik hücre benzeri histonların geçiş proteinleriyle değiştirilmesini ve son olarak protaminlerin eklenmesini içermekte ve kromatinin tam anlamıyla paket haline gelmesine yol açmaktadır[172]. Tek bir ejakülatın normal olarak heterojen bir spermatozoon popülasyonu içermesi nedeniyle, insanlardaki durum özellikle ilgi çekicidir. Olgun sperm çekirdeğindeki kromatinin anormal bir şekilde paketlenmiş olabildiği uzun yıllardan beri bilinmektedir[173]. Buna ek olarak, anormal kromatin paketi ve nükleus DNA'sı hasarının bağlantılı olduğu görülmektedir[174] ve erkeklerin olgun spermatozoonlardaki çekirdek DNA'sında hasar varlığı ile yetersiz semen parametreleri arasında güçlü bir bağlantı söz konusudur[77,175].

Endojen nükleaz topoizomeraz II'nin, torsiyon stresinin hafiflemesini sağlayacak ve protaminasyon sırasında, kromatin yeniden düzenlenmesine yardımcı olacak kırıkları oluşturduğu ve bağladığı varsayılmaktadır[176]. Ejaküle edilen insan spermindeki DNA hasarı, hem tek, hem de çift sarmal DNA kırıklarından oluşmaktadır. Farklı hayvan modellerinde, DNA'daki endojen kırıklar, spermiogenezin spesifik evrelerinde eksprese edilmektedir; bu

endojen krıklar, spermiogenez sırasında belirgindir, ancak kromatinin paketlenmesi tamamlandığında gözlenmemektedir. Endojen nükleaz topoizomeraz II'nin, spermiogenez sırasında kırıkların hem oluşumunda, hem de bağlanmasında rol oynayabilmesi olasıdır; bu kırıklar, torsiyon stresinin hafiflemesini sağlayabilmekte ve histonların protaminler tarafından uzaklaştırılması sırasında kromatinin yeniden düzenlenmesine yardımcı olmaktadır[177-179].

Çeşitli araştırmalarda, sperm DNA kalitesinin, in vitro fertilizasyonun öngörülmesi için sağlam bir güç sağladığı gösterilmiştir[175,180-182]. Tomlinson ve arkadaşları, IVF'de gebe ve gebe olmayan gruplar arasındaki önemli farkı gösteren tek parametrenin in situ çentik translasyonu ile değerlendirilen DNA parçalanmasının yüzdesi olduğunu belirtmiştir. Sperm kaynaklı etkilerin, özellikle de DNA parçalanma derecesinin insan embriyo gelişimini etkilediği ileri sürülmüştür.

Sperm DNA stabilitesini değerlendirmek suretiyle fertilizasyonu tahmin üzere diagnostik araç olarak sperm kromatin yapısı miktar tayini (SCSA) önerilmiştir. SCSA, akridin turuncu boyamanın ardından 30 saniye süreyle spermdeki in situ DNA denatürasyonuna karşı duyarlılığı ölçmüştür. SCSA'da akış sitometrisinin kullanımı bağlılığını artırmaktadır.

Duran ve arkadaşları prospektif bir kohort tasartımda IUI terapiye maruz kalan geniş bir infertilite popülasyonunu incelemiştir. DNA parçalanması TUNEL tarafından değerlendirilerek akridin turuncu boyaları ölçülmüştür. Yazarlar, sperm DNA kalitesinin söz konusu in vivo koşullarında gebeliğin habercisi olarak temel bir rol oynadığını bildirmiştir.

Epigenetik faktörler

"Epigenetik", genetik (DNA) kodu etkilemeksizin gen aktivitesini düzenleyen ve hücre bölünmesi sayesinde kalıtsal olan bir prosese atıfta bulunmaktadır. Tohum hücresi gelişimi ve erken embriyojenez genomik imprintlerin silinmesi, elde edilmesi ve bakımı açısından son derece önemli pencerelerdir. Üstelik, fetal büyüme ve plasental fonksiyon için imprinting yoluyla düzenlenen çok sayıda genin gerekli olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda, tüm dikkatler genomik imprintingin veya gen ekspresyonu üzerindeki ebeveyn kökenli etkilerin daha iyi anlaşılmasının geçerli reprodüksiyon ve gelişim çalışması için son derece önemli olduğunu gösterecek şekilde, embriyo kültürü, somatik hücre nükleer klonlaması ve destekli reprodüktüf teknolojilerden kaynaklanan olası epigenetik bozukluklara yönelmiştir. Imprinting, DNA sırası haricindeki unsurların parental alelleri ayırt ederek cinsiyete özgü gen ekspresyonunu belirlemesi gerektiği için epigenetik olarak kontrollü bir fenomendir. Genomik imprinting'deki DNA metilasyonu kapsamlı şekilde araştırılmıştır. Fare ve insan genomlarındaki imlenmiş toplam gen sayısının 100 ile 200 arasında değişebileceği tahmin edilmektedir. Bugüne kadar tanımlanmış olanlar arasında, önemli sayıda genin fetal gelişmede önemli bir rolü olduğu görülmektedir. İmlenen genlerin, plasentanın büyümesini ve/veya transplasentral aktarma sistemlerinin aktivitesini düzenlemek suretiyle maternal besinlerin fötusa plasental tedarikinin kontrol edilmesinde çok önemli roller oynadığı tartışılmıştır. Metilasyon blastositteki demetilasyona ait global dalganın ardından imprinting'in somatik bakımı için önemlidir. Bununla birlikte, maternal ve paternal alellerin global demetilasyon meydana geldikten sonra ne ölçüde ayırt edilebileceği sorusu gündeme gelmektedir. İmlenen genlerdeki farklı metilasyon bölgelerinin metilasyon paterninde önemli temporal farklılıklar gösterdiği ve son metilasyon paterninin oluşumunun dinamik bir proses olduğu tespit edilmiştir. Epigenetik modifikasyonlar temel teşkil eden gnetik kodun yorumlanabileceği bilgi içeriğinin bir uzantısı olarak işlev görmektedir. Bu modifikasyonlar transkripsiyonel durumları belirleyen kromatin düzeni ve yapısının spesifikasyonu için genomik bölgelere işaret eder ve bu hususta kalıtsal ve stabil talimat vazifesi görür. Memelilerde, DNA metilasyonu ve histonların modifikasyonu majör epigenetik değişimleri açıklamaktadır. DNA metilasyonu yeniden programlama işleminin iki döngüsü karakterize edilmiştir (referans 190'da incelenmiştir). Tohum hücresinin gelişimi sırasında, DNA metilasyonunun epigenetik olarak yeniden programlanması ebeveyn kökenli genomik imprint'keri sıfırlar ve totipotensiyi gamet hürelerine iade eder.

Fertilizasyon sırasında, ikinci döngü parental genomlar arasında asimetrik bir farklılığa neden olacak şekilde tetiklenir. Ayrıca, epigenetik asimetri, blastosit aşamasındaki ilk iki soyun oluşumunda belirgindir. Bu diferansiyasyon olayı soyların epigenetik özelliklerini iç hücre kütlesi (somatik) ile trofektodermin (ekstraembriyonik) türevleri olarak belirler.

Epigenetik kontrol noktalarının silinmesi ve sonradan üzerinden geçilmesinin somatik nükleer transfer açısından son derece ciddi engelleri vardır. Bu etkileşimlere ait mekanizmaların incelikle işlenmesi temel biyolojik proses anlayışımız ve müteakip terapötik avanslar açısından değersiz olacaktır.

Son zamanda yapılan çalışmalarda, insan destekli reprodüktif teknolojiler ile genomik imprinting bozukluklar arasındaki muhtemel bir bağlantı ileri sürülmüştür (referans 191'de incelenmiştir). ICSI'nın kullanılmasının ardından Angelman sendromu (maternal alel fonksiyonu kaybından veya UBE3A bağlayan bir bölgede paternal alelin çift tekrarından kaynaklanan) ve Beck-Wiedemann sendromunun (kalıtımında ebeveyn kökenli etkiler gösteren bir diğer hastalık) varlığı gözlenmiştir.

Desteklenen reprodüktif teknolojiler, imlenen genlerin özellikler dış etkilere karşı hassas olabileceği zamanlarda gamet hücreleri ile erken embriyoların izolasyonunu, işlenmesini ve kültürünü içermektedir. İmprint edinimindeki cinsiyete özgü farklılıkların kanıtında, erkek ve dişi tohum hücrelerinin spesifik prenatal ve postnatal aşamalarda imlenen genlerde düzensizliğe karşı duyarlı olabileceği ileri sürülmektedir. Gametojenez sırasında ilk kez elde edilen imprintler genel genom yeniden programlandığında implantasyon öncesi gelişim sırasında sürdürülmelidir. Desteklenen reprodüktif teknolojiler kapsamında gelecekteki empigenetik çalışmalara yönelik implikasyonlarının yanı sıra tohum hücre gelişimi ve erken embriyojenez sırasında mekanizmaların tanınması ve imprint silme işleminin zamanlanması araştırma önceliklerini teşkil etmelidir.

VARILAN SONUÇLAR

Dölleyici spermatozoon, fertilizasyon prosesi boyunca ve sonrasında embriyojeneze oldukça dinamik ve kritik bir katılım göstermektedir. Oosite nüfuz eden kusurlu bir spermatozoon embriyonun implantasyon öncesi gelişimi sırasında çoklu seviyelerde gelişimin durmasına neden olabilir. Ayrıca, implantasyonun ardından insan hastalığı ile sonuçlanan subletal ve letal etkiler meydana gelebilir.

Normal gelişim sırasında dölleyici spermatozoonun oosite katkıları DNA/kromatin aktarımını, oosit aktivasyon faktörünü (OAF) ve bir sentriyolü içermektedir. DNA/kromatin kompleksi açıkçası yeni bir siploid bireyin meydana gelmesine yönelik en önemli katkıdır. Yine de, OAF ve sentriyol, oosit aktivasyonu ile mitotik bölünmenin meydana gelmesinde kritik bir rol oynar ve bunların katkıları olmadan embriyojenez de göz ardı edilecektir. Ayrıca, son zamanlarda elde edilen veriler spermatozoonların paternal mRNA'ların benzersiz uyumu sayesinde zigotu sağladığını göstermiştir. Bu tür transkriptler erken ve geç embriyonik gelişim için son derece önemli olup, yetersiz aktarım ve anormal transkripsiyon anormal gelişime ve areste katkıda bulunabilmektedir.

Anormal oosit aktivasyonunun ve embriyonik gelişmenin, anormal paternal katkı(lar) olabileceğini gösteren oldukça fazla bir grup kanıt birikmektedir. Erken paternal etki, fertilizasyon prosesinin, cinsel üremenin veya erken klivajın tamamlanamamasıyla sonuçlanmaktadır. Bu da, pronükleer ve 2-4 hücreli aşamada gözlemlenen morfolojik anormalliklerle gösterilebilir. Bu defektlere anormal bir OAF salımı dahil olmak üzere sperm eksikliklerinin ve semtrozom ve sitoskeletal cihazın disfonksiyonlarının aracılık ettiği tahmin edilmektedir. İmplantasyon yeteneğinin gerçekleştirilememesi nedeniyle geç bir paternal etki karakterize edilmiş, ancak aynı zamanda gebelik kaybı ve postnatal gelişim anormallikleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu, anöploid, genetik anomaliler, DNA hasarı ve olası diğer nedenler dahil olmak üzere sperm nükleer/kromatin defektleri ile ilişkilidir.

Memelilerde mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) ait kesin maternal kalıtım, fertilizasyondan kısa bir süre sonra sperm mitokondrilerinin yok edilmesinden sorumlu olan bilinmeyen bir mekanizmanın teşvik ettiği gelişimsel bir paradokstur. Sperm mitokondrilerinin işaretlenerek ardından implantasyon öncesi gelişim sırasında yönlendirilen proteolize tabi tutulduğu gösterilmiştir. Bu prosesin anormallikleri anormal embriojeneze yol açabilmektedir.

Ayrıca, elde edilen son veriler, spermatozoonların paternal mRNA'nın eşsiz uyumu sayesinde zigotu sağladığını göstermiştir. Bu tür transkriptler, erken ve geç embriyonik gelişim açısından son derece önemli olabilmekte ve eksik aktarım veya anormal transkripsiyon anormal embriyojeneze yol açabilmektedir. Ayrıca, sınırlı RNA sentezi insan pronükleuslarında bulunabilir ve bu erken transkripsiyon başarısızlığı, anormal pronükleer gelişim ve arest ile ilişkilendirilmektedir. Sonuç olarak, gen kökenine ilişkin veya erken embriyojenez sırasında meydana gelen gen-imleme anormallikleri ciddi insan hastalıklarına neden olabilir. Bu tür bir sorun destekli reprodüktif teknolojinin bazı formları kullanılırken potansiyel bir etkiye haizdir.

KAYNAKLAR

1. Latham KE, Sapienza C. Localization of genes encoding egg modifiers of paternal genome function to mouse chromosomes one and two. Development 1998; 125: 929
2. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane transloca-tion of phosphatidylserine and oxldative stress in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15: 1338
3. Cummins JM, Jequier AM, Kan R. Molecular biology of human male infertility links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? Mol Reprod Dev 1994; 37: 345
4. Simerly C, Wu GJ, Zoran S. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule organizing center, in humans, and the implications for infertility. Nat Med 1995; 1: 47
5. Bedford JM. Ultrasiructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. Am J Anat 1968; 123:329
6. Yanagimachi R. Mammalian fertilization In Knobil •E, Neill JO, eds. The Physiology of Reproduction. New York: Raven 1994: 189
7. Snell WJ, White JM. The molecules of mammalian fertilization. Cell 1996; 85: 175
8. PrimakoffP, Hyatt H, Tredick-Kline J. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm—egg membrane fusion. J Cell Biol 1987; 104: 141 9. Blobel CP, White JM. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a dis-mtegrin domain. Curr Opin Cell Biol 1992; 4: 760
10. Blobel CP, et al. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. Nature 1992; 356: 248
11. Cowan AE, et al. Guinea pig fertifin exhibits restricted lateral mobility in epididymal sperm and becomes freely diffusing during capacitation. Dev Biol 2001; 236: 502
12. Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and prorease activity. Trends Genet 2000; 16: 83
13. Inoue N, et al. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm ro fuse with eggs. Nature 2005; 434: 234
14. Toshimori K, et al. An MN9 antigenic molecule, equatorin, is required for successful sperm—oocyte fusion in mice. Biol Reprod 1998; 59: 22
15. Manandhar G, Toshimori K. Exposure of sperm head equatorin after acrosome reaction and its fate after fertilization in mice. Biol Reprod 2001; 65: 1425
16. Fissore RA, Reis MM, Palermo GD. Isolation of the Ca2+ releasing coniponent(s) of mammalian sperm extracts: the search continues. Mol Hum Reprod 1999; 5: 189
17. Parrington J, et al. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. Nature 1996; 379: 364
18. Dumollard R, Sarder C. Three different calcium wave pacemakers in ascidian eggs. J Cell Sci 2001; 1:2471
19. Duchen M. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. J Physiol 2000; 529: 57
20. Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. J Physiol 2000; 529: 37
21. Eisen A, Reynolds GT. Source and sinks for the calcium released during fertilization of single sea urchin eggs. J Cell Biol 1985; 100: 1522
22. Dumollard R, et al. Mitochondrial respiration and Ca2+ waves are linked during fertilisation and meiosis completion. Development 2003; 130: 683
23. McCortnick JG, Demon RM. Mitochondrial Ca2+ transport and the role of intramitochondrial Ca2+ in the regulation of energy metabolism. Dev Ncurosci 1993; 15:3
24. Hansford RG. Physiological role of mitochondria! Ca2+ transport. J Bioenerg Biomembr 1994; 26: 495
25. Territo PR, et al. Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F{l)-ATPase. Am J Physiol Cell Physiol 2000; 278: C423
26. Duchen MR, BiscoeTJ. Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. J Physiol 1992; 450: 13
27. Pralong WF, Spat A, Wollheim CB. Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular Ca2+ transients. J Biol Chem 1994; 269: 27310
28. Hajnoczky G, et al. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. Cell 1995; 11: 415
29. Mak DO, McBride S, Foskett JK. ATP regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel gating by allosteric tuning of Ca(2+) activation. J Biol Chem 1999; 274: 22231
30. Mak DO, McBride S, Foskett JK. ATP regulation of recombinant type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gating. J Gen Physiol 2001; 117: 447
31. Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. Mol Hum Reprod 1996; 2: 717
32. Saunders CM, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. Development 2002; 129: 3533
33. Kouchi Z, et al. Recombinant phospholipase Czeta has high Ca2+ sensitivity and induces Ca2+ oscillations in mouse eggs. J Biol Chem 2004; 279: 10408
34. Swann K, et al. The cytosolic sperm factor that triggers Ca2+ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. Reproduction 2004; 127:431
35. Dupont G. Theoretical insights into the mechanism of spiral Ca2+ wave initiation in Xenopus oocytes. Am J Physiol 1998; 275: C317

36. Eliyahu E, Shalgi R. A role for protein kinase C during rat egg activation. Biol Reprod 2002; 67: 189
37. Talmor-Cohen A, et al. Are Src family kinases involved in cell cycle resumption in rat eggs? Reproduction 2004; 127: 455
38. Piko L, Matsumoto L. Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg. Dev Biol 1976; 49: 1
39. Lodish H, et al. Molecular Cell Biology, 3rd edn. New York: WH Freeman and Co., 1995
40. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. Ann Rev Biochem 1997; 66: 409
41. Ford WCL, Rees JM. The bioenergetics of mammalian sperm motility. In Gagnon C, ed. Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990: 175
42. Max B. This and that: hair pigments, the hypoxic basis of life and the Virgilian journey of the spermatozoon. Trends Pharmacol Sci 1992; 13: 272
43. Cummins J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. Rev Reprod 1998; 3: 172
44. Short RV. The difference between a testis and an ovary. J Exp Zool 1998; 281: 359
45. Kaneda H, et al. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse ernbryogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4542
46. Ankel-Simons F, Cummins JM. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization - implications for theories on human evolution. Proc Nat Acad Sci USA 1996; 93: 13859
47. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reprod Fertil Dev 1995; 7: 659
48. Shalgi R, et al. Fate of sperm organelles during early embryogenesis in the rat. Mol Reprod Dev 1994; 37: 264
49. Sutovsky P, Navara C, Schatten G. Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. Biol Reprod 1996; 55: 1195
50. Smith LC, Aldvar AA. Cytoplasmic inheritance and its effects on development and performance. J Reprod Fertil 1993; 48 (Suppl): 31
51. Gresson RAR. Presence of the sperm middle-piece in the ferrilized egg of the mouse (Mus musculus). Nature 1940; 145:425
52. Smith LC, et al. Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. Complement homologues and other putative immune response genes suggest immune system homology within the deuterostomes. J Immunol 1996; 15: 593
53. Alien V. Role of motor proteins in organizing the endoplasmic reticulum and Golgl apparatus. Semin Cell Dev Biol 1996; 7: 335
54. Sutovsky P, et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. Nature 1999; 402: 371
55. Sutovsky P, et al. Ubiquirinated sperm mitochondria selective proteolysis and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. Biol Reprod 2000; 63: 582
56. Ingman M, et al. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. Nature 2000; 408: 708
57. Schattcn G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the cenrrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. Dev Biol 1994; 165:299
58. Reinsch S, Karsenti E. Movement of nuclei along microtubules in Xenopus egg extracts. Curr Biol 1997; 7: 211
59. Payne C, et al. Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. J Cell Sci 2003; 116: 4727
60. Oehninger S, et al. Failure of fertilization in in vitro fertilization: the 'occult' male factor. J In Vitro Pert Embryo Transf 1988; 5: 181
61. Oehninger S, et al. Delayed fertilization during in vitro fertilization and embryo transfer cycles: analysis of causes and impact on overall results. Fertil Steril 1989; 52: 991
62. KrugerTF, etal. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 112
63- Ron-el R, et al. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. Fertil Steril 1991; 55: 338
64. Parinaud J, et al. Influence of sperm parameters on embryo quality. Fertil Steril 1993; 60: 888
65. Grow DR, et ai. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoosper-mia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. Fertil Steril 1994; 62: 559
66. Oehninger S, et al. Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. Fertil Steril 1988; 50: 283
67. Janny L, Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. Mol Reprod Dev 1994; 38: 36
68. Oehninger S, et al. A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in-vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 1086
69. Nagy ZP, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. Hum Reprod 1995; 10: 1123
70. Oehninger S, et al. Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. Fertil Steril 1995; 64: 977

71. Mansour RT, et al. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1995; 64: 982
72. Mercan R, et al. The outcome of clinical pregnancies following intracytoplasmic sperrn injection is not affected by semen quality. Andrologia 1998; 30: 91
73. Tasdemir I, et al. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. Hum Reprod 1997; 12: 1214
74. Gorczyca W, et al. Presence of strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm: analogy to apoptosis of somatic cells. Exp Cell Res 1993; 207: 202
75. Manicardi GC, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. Biol Reprod 1995; 52: 864
76. Hughes CM, et al. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. Mol Hum Reprod 1996; 2: 613
77. Lopes S, et al. Sperm deoxyribonudeic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1998; 69: 528
78. Aitken RJ, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998; 59: 1037
79. Evenson DP, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14: 1039
80. Sakkas D, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev Reprod 1999; 4: 31
81. Pfeffer J, et al. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 72: 472
82. Sakkas D, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998; 13 (SuppM): 11
83. Rubio C, er al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICS1 outcome. Hum Reprod 2001; 16:2084
84. Duran EH, et al. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. Hum Reprod 2002; 17: 3122
85. Virant-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. J Assist Reprod Genet 2002; -19:319
86. Burrello N, ct al. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. Hum Reprod 2002; 18: 1371
87. Liu CH, et al. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. J Assist Reprod Genet 2004; 21: 119
88. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm Injection cycles. Fertil Steril 2004;81:1289
89. Petit FM, et al. Could sperm aneuploidy rate determination be used as a predictive test before intracytoplasmic sperm injection? J Androl 2005; 26: 235
90. Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. Hum Reprod Update 2004; 10: 19
91. Foresta C, et al. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. J Clin Endocrinol Metab2005; 90: 152
92. StJohnJC. Incorporating molecular screening techniques into the modern andrology laboratory. J Androl 1999; 20: 692
93. Brinkworth MH. Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. Int J Androl 2000; 23: 123
94. Lanzendorf SE, et al. Penetration of human spermatozoa through the zona pellucida of nonviable human oocytes. J Soc Gynecol Invest 1994; 1: 69
95. Oehninger S, et al. Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding. Fertil Steril 1997; 67: 1121
96. Oehninger S. Normal fertilization. In El-Shafie M, et al., eds. An Adas of the Ultrastructure of Human Oocytes - A Guide for Assisted Reproduction. London: Parthenon Publishing, 2000: 23
97. Liu de Y, Garrctt C, Baker HW. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization-embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. Fertil Steril 2004; 82: 1251
98. Asch R, et al. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. Hum Reprod 1995; 10: 1897
99. Rawe VY, et al. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. Mol Hum Reprod 2000; 6: 510
100. Hewitson L, Simerly CR, Schatten G. Fate of sperm components during assisted reproduction: implications for infertility. Hum Fertil (Camb) 2002; 5: 110
101. Sutovsky P, Hauser R, Sutovsky M. Increased levels of sperm ubiqultin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. Hum Reprod 2004; 19: 628
102. Ostermeler GC, et al. A suite of novel human spermatozoal RNAs. J Androl 2005; 26: 70

103. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. Nature 1988; 332: 459
104. Tesarik J, et al. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. Hum Reprod 2002; 17: 1811
105. Tesarik J. The paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. Reprod Biomed Online 2005; 10:370
106. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. Hum Reprod 2004; 19: 611
107. Greco E, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2005; 20: 226
108. Hewitson L, Simerly CR, Schatten G. Cytoskeletal aspects of assisted fertilization. Semin Reprod Mcd 2000; 18: 151
109. Hewitson L, Simerly CR, Schatten G. ICSI, male pronuclear remodeling and cell cycle checkpoints. Adv Exp Med Biol 2003; 518: 199
110. Tesarik J, Mendoza C. In vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection. BioEssays 1999; 21: 791
111. Ramalho-Santos J, et al. SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. Dev Biol 2000; 223: 54
112. Katayama M, Koshida M, Miyake M. Fate of the acrosome in ooplasm in pigs after IVF and ICSL Hum Reprod 2002; 17: 2657
113. Terada Y, et al. Centrosomal function assessment in human sperm using heterologous ICSI with rabbit eggs: a new male factor infertility assay. Mol Reprod Dev 2004; 67: 360
114. Kovacic B, Vlaisavljevic V. Configuration of maternal and paternal chromatin and pertaining microtubules in human oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. Mol Reprod Dev 2000; 55: 197
115. Colombero LT, et al. The role of structural integrity of the fertilising spermatozoon in early human embryogenesis. Zygote 1999; 7: 157
116. Moomjy M, et al. Sperm integrity is critical for normal mitotic division and early embryonic development. Mol Hum Reprod 1999; 5: 836
117. Sun C, et al. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. Nat Genet 1999; 23: 429
118. Dicldns RA, et al. The ubiquitin ligase component Siahla is required for completion of meiosis I in male mice. Mo! Cell Biol 2002; 22: 2294
119. Li B, Ruiz JQ Chun KT. CUL-4A is critical for early embryonic development. Mol Cell Biol 2002; 22:4997
120. Muratori M, et al. Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. Hum Reprod 2005; 20: 1035^3
121. Thompson WE, Ramalho-Santos J, Sutovsky *P*. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. Biol Reprod 2003; 69: 254
122. Brenner CA, Kubisch HM, Pierce KE. Role of the mitochondrial genome in assisted reproductive technologies and embryonic stem cell-based therapeutic cloning. Reprod Fertil Dev 2004; 16: 743
123. Miller D. RNA in the ejaculate spermatozoon: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. Mol Hum Reprod 1997; 3: 669
124. Lambard S, et al. Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. Mol Hum Reprod 2003; 9: 117
125. Wykes SM, Miller D, Krawetz SA. Mammalian spermatozoal mRNAs: tools for the functional analysis of male gametes. J Submicrosc Cytol Pathol 2000; 32: 77
126. Dadoune JP, er al. Identification of transcripts by macroarrays, RT—PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. Mol Hum Reprod 2005; 11: 133
127. Eddy EM. Male germ cell gene expression. Recent Prog Horm Res 2002; 57: 103
128. Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. Anat Embryol (Berl) 1999; 199: 471
129. Petersen C, Fuzesi L, Hoyer-Fender S. Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of approximately 70 kDa. Mol Hum Reprod 1999; 5: 627
130. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. Microsc Res Tech 2003; 61: 103
131. Dadoune JP. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. Microsc Res Tech 2003; 61: 56
132. Pessot CA, et al. Ptesence of RNA in the sperm nucleus. Biochem Biophys Res Commun 1989; 158: 272
133. Passananti C, et al. The product of Zfp59 (Mfg2), a mouse gene expressed at the spermatid stage of sper- . matogenesis, accumulates in spermatozoa nuclei. Cell Growth Differ 1995; 6: 1037
134. Kumar G, Patel D, Naz RK. c-rnyc mRNA is present in human sperm cells. Cell Mol Biol Res 1993; 39: 111
135. Miller D, et al. Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoal gene expression. Hum Reprod 1994; 9: 864
136. Goodwin LO, Karabinus DS,\Pergotizzi RG. Presence of N-cadherin transcripts in mature spermato-

zoa. Mol Hum Reprod 2000; 6: 487
137. Carreau S, et al. Aromatase expression in male germ cells. J Steroid Biochem Mol Biol 2001; 79: 203
138. Ostermeier GC, et al. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. Lancet 2002; 360: 772
139. Kimoto Y. A single human cell expresses all messenger ribonucleic acids: the arrow of time in a cell. Mol Gen Genet 1998; 258: 233
140. Chelly J et al. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2617
141. Hecht NB. A DNA polymcrase isolated from bovine spermatozoa. J Reprod Fertil 1974; 41: 345
142. Witkin SS, Korngold GC, Eendich A. Ribonuclease-sensitive DNA-synthesizing complex in human sperm heads and seminal fluid. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 3295
143. Miteva K, Valkov N, Goncharova-Peinoval J. Electron microscopic data for the presence of post-meiotic gene expression in isolated ram sperm chromatin. Cytobios 1995; 83: 85
144. Gatewood JM, et al. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. J Biol Chem 1990; 265: 20662
145. Gineitis AA, et al. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. J Cell Biol 2000; 151:1591
146. Zalenskaya IA, Bradbury EM, Zalensky AO. Chromatin structure of celomere domain in human sperm. Biochem Biophys Res Commun 2000; 279: 213
147- Naz RK. Effect of actinomycine D and cycloheximide on human sperm function. Arch Androl 1998; 41: 135
148. Ostermeier GC, et al. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. Nature 2004; 429: 154
149. Dadoune JP, Siffroi JP, Alfonsi ME Transcription in haploid male germ cells. Int Rev Cytol 2004; 237: 1
150. Hayashi S, et al. Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similat but distinct patterns of early messenger RNA expression. Biol Reprod2003;69: 1170
151. FukagawaT, et al. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. Nat Cell Biol 2004; 6: 784
152. Morris KV, et ai. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. Science 2004; 305: 1289
153. Esterhuizen AD, et al. Defective sperm decondensation: a cause for fertilization failure. Andrologia 2002; 34: 1
154. Billig H, et al. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. Endocrinology 1995; 136: 5
155. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkcl L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. Am JPhysiol 1999; 276: E310
156. Oehninger S, et al. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. Reprod Biomed Online 2003; 7: 469
157. Oehninger S. Biochemical and functional characterization of the human zona pellucida. Reprod Biomed Online 2003; 7: 641
158. Bowen JR, et al. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. Lancet 1998; 351: 1529
159. Bonduelle M, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. Hum Reprod 1999; 14: 243
160. Schuffner A, et al. Effect of different incubation conditions on phosphatidylserine externalization and motion parameters of purified fractions of highly motile human spermatozoa. J Androl 2002; 23: 194
161. Weng S, et al. Caspasc activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. Mol Hum Reprod 2002; 8: 984
162. Taylor SL, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. Mol Hum Reprod 2004; 10: 825
163. Benchoua A, et al. Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. J Biol Chem 2002; 277: 34217
164. Castro A, et al. Absence of Fas protein detection by flow cytometry in human spermatozoa. Fertil Steril 2004; 81: 1019
165. Duru NK, et al. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. J Androl 2001; 22: 646
166. Oehninger S, et al. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. J Assist Reprod Genet 1995; 12:41
167. Barroso G, et al. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine: a comparison of subpopulations of sperm with high and low motility from men consulting for infertility. Fertil Steril 2006; 85: 149
168. Ahmadi A, Ng SC. Destruction of protamine in human sperm inhibits sperm binding and penetration in the zona-free hamster penetration test but increases sperm head decondensation and male pronuclear formation in the hamster-ICSI assay. J Assist Reprod Genet 1999; 16: 128
169. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. Hum Reprod 1999; 14: 2279
170. Ahmadi A, Ng SC. Influence of sperm plasma membrane destruction on human sperm head decondensation and pronuclear formation. Arch Androl 1999; 42: 1

171. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. J Exp Zool 1999; 284: 696
172. Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. IncRevCytol 1986; 105: 1
173. Evcnson DP, Darzynkiewicz Z, Relamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science 1980; 210: 1131
174. Bianchi PG, et al. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. Biol Reprod 1993; 49: 1083
175. Sun JG, Jurisicova A, Casper RE Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biol Reprod 1997; 56: 602
176. McPherson SM, Longo FJ. Nicking of rat sper-matid and spermatozoa DNA: possible involvement ofDNAtopoisomerasell. Dev Biol 1993; 158: 122
177. McPherson S, Eongo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermarogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. Eur J Histochem 1993; 37: 109
178. Sakkas D, et al. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. Biol Reprod 1995; 52: 1149
179. Chen JE, Eongo FJ. Expression and localization of DNA topoisomerase II during rat spermatogenesis. Mol Reprod Dev 1996; 45: 61
180. Duran EH, et al. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. Hum Reprod 1998;13:1235
181. Earson KE, et al. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum Reprod 2000; 15: 1717
182. Chan PJ, et al. A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. Fertil Steril 2001; 75: !86
183. Tomlinson MJ, et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. Hum Reprod 2001; 16:2160
184. DC Rycke M, Eiebaers I, Van Steirteghem A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. Hum Reprod 2002; 17:2487
185. Gosden R, et al. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. Eancet 2003; 361: 1975
186. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. Annu Rev Genet 1997; 31: 493
187. Barlow DP. Gametics imprinting in mammals. Science 1995; 270: 1610
188. Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? Trends Genet 1997; 13: 323
189. Shemer R, et al. Dynamic methylation adjustment and counting as part of imprinting mechanisms. Proc Nati Acad Sci USA 1996; 93: 6371
190. Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. Reproduction 2004; 127:643
191. Eucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. Hum Reprod Update 2004; 10:3

5

İnsanda Sperm Hücrelerinin Genom Yapısı: Erkek İnfertilitesi ve Gebelik Başarısı Üzerine Olası Etkileri

Olga Mudrak, Andrei Zalensky

Çeviri: *Kaan Aydos*[*] *Sena Aydos*[**]

GİRİŞ

İnfertilite ve doğum defektlerinde neden sıklıkla gametlere ait kromozom anomalileri olup[1-3], olguların %80'inden fazlası babadan kaynaklanır[4]. *Multicolor fluorescence in situ hybridization* (FISH) tekniğinin gelişmesi spermde anöploidiler, parsiyal kromozom duplikasyonları, delesyonlar, inversiyonlar, translokasyonlar ve kromozom kırıkları gibi çok sayıda kromozom defektlerinin saptanmasını ve analizini mümkün kılmıştır[2,5-7].

Her ne kadar sperm kromozom anomalileri ile erkek infertilitesi arasında kuvvetli ilişki bulunduğuna dair genel bir kanı varsa da, böyle anomalilerin test edilmeleri, özellikle erkek faktörü infertilite için intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılıyorsa, kromozom defekti içermeyen bir 'iyi spermatozoon' seçileceğini garanti etmez. Hiç şüphesiz ICSI, ciddi sperm bozukluğu olan erkeklerin fertilizasyonu önleyen doğal engelleri aşmasını mümkün kılabilirse de, bu yolla çocuğa genetik bozukluğun aktarılması riski artmış olur. Örneğin oligozoospermik erkeklerin çocuğa geçebilen daha fazla kromozom hasarları yükü taşıdıkları gösterilmiştir[8]. Fertilizasyonu bozuk erkeklerde ICSI yapılmadan önce, sperm örneklerinden ayrıntılı sitogenetik testlerin yapılması konusunda genel bir fikir birliği ortaya çıkmaktadır[9-11]. Biz burada, daha önce üzerinde durulmamış bir sperm kromozom anomalisinin de fertilizasyon ve erken evre embriyo gelişimi üzerinde etkili olabileceği yönünde bir hipotez ileri sürmekteyiz. Bu şekildeki sapmalar, sperm nükleusu içerisinde kromozom paketlenmesi ve yüksek seviyede kromozom yapılanması ile ilişkilendirilmektedir.

GENOM YAPISI

Yüz yıldan çok daha önce Rabl ve Boveri, hücre nükleusunda farklı bireysellikte kromozomların korunmasıyla beliren, mekansal bir düzenlemenin varlığına dikkat çekmişlerdi[12,13]. Bununla birlikte yakın zamana kadar, interfaz kromozomlarının çekirdek plazması içerisinde rasgele yüzen 'spagetti' kromatinler oldukları görüşü hakimdi[14]. Modern görüşe göre ise, interfaz kromozomlarının düzenli ve dinamik bir global yapılanması mevcut olup, çekirdeğe ait çok sayıda değişik fonksiyonları yerine getirirler (yakın tarihli derlemeler için 15 ve 16 numaralı kaynaklara bakınız).

[*] Ankara Üniversitesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.
[**] Ankara Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

Bunlar, FISH teknikleri, mikroskopi için gerekli aletlerin geliştirilmesi ve İnsan Genom Projesinin tamamlanması sonucu mümkün olan, kromozom yapılanmasındaki büyük buluş neticesi gerçekleşmiştir. Bu görüşün esası, kromozomların bölgesel yapılanmalarına dayanmaktadır. İnterfaz kromozomları çekirdek içerisinde kromozom alanları (CTs) adı verilen, birbiriyle çakışmayan farklı hacimleri işgal ederler[16,17]. Biz burada CTs'nin yüksek seviyede uzamsal düzenlenmesini genom yapısı (GA) olarak ifade edeceğiz.

GA'nın başlıca iki önemli özelliği ayırt edilebilir[18]: kromozomun pozisyonu (birbirlerine ya da belirli çekirdek yapılarına göre kromozomların uzamsal lokalizasyonları), ve kromozomun yolu (çekirdek içerisinde kromozomun izlediği yol). İnterfaz'daki çekirdekte CTs'nın pozisyonu rasgele değildir[19]. Bir kromozomun çekirdeğin merkezine göre uzamsal pozisyonu ışınsal (radial) yönlenme olarak tarif edilir[20-22]. Çok sayıdaki çalışma az gen içeren kromozomların çekirdeğin periferini tercih ederlerken, genden zengin kromozomların çekirdeğin merkezine daha yakın yerleştiğini göstermiştir[23,24]. Işınsal yönelimlerinin yanı sıra kromozomlar birbirlerine göre rasgele olmayan tarzda da bulunabilirler[21,25]. Örneğin bazı otörler, kromozomların prometafaz süreçte önceden belirlenmiş sabit bir pozisyon aldıklarını ileri sürmüşledir[26,27], oysa başka bir çalışma kromozom pozisyonlanmasına ait bir düzen saptayamamıştır[28]. Dolayısıyla, bu konu tartışmalıdır.

Kromozom alanlarının bağıl uzamsal gruplanmalarındaki dinamik değişiklikler hücre siklusunun ilerleyişi, farklılaşma ve maliğn transformasyon[29-31] sırasında izlenmiş olsa da, CTs'nın iç yapısındaki düzenlenmelerin büyük kısmı henüz bilinmemekte. Yakın tarihli çalışmalar CTs'nın çekirdekteki düzenlenmesi ile mitotik kromozomların G-R bantlama şekilleri arasında bir ilişki bulunduğuna işaret etmektedir[32]. İnterfaz çekirdeğinde, yapısal olarak eksprese olmuş ev-sahibi genlerden zengin R-bandı sekansları çekirdeğin içine doğru yönlenmişlerdir. Yeni çalışmalar, CTs'nın içinde yüksek seviyede düzenlenmiş kromatin yapılanmaları / kromozom yolları[33] ve bireysel CTs'nın bağıl uzamsal yerleşimleri[34] üzerinde yoğunlaşmaktadır.

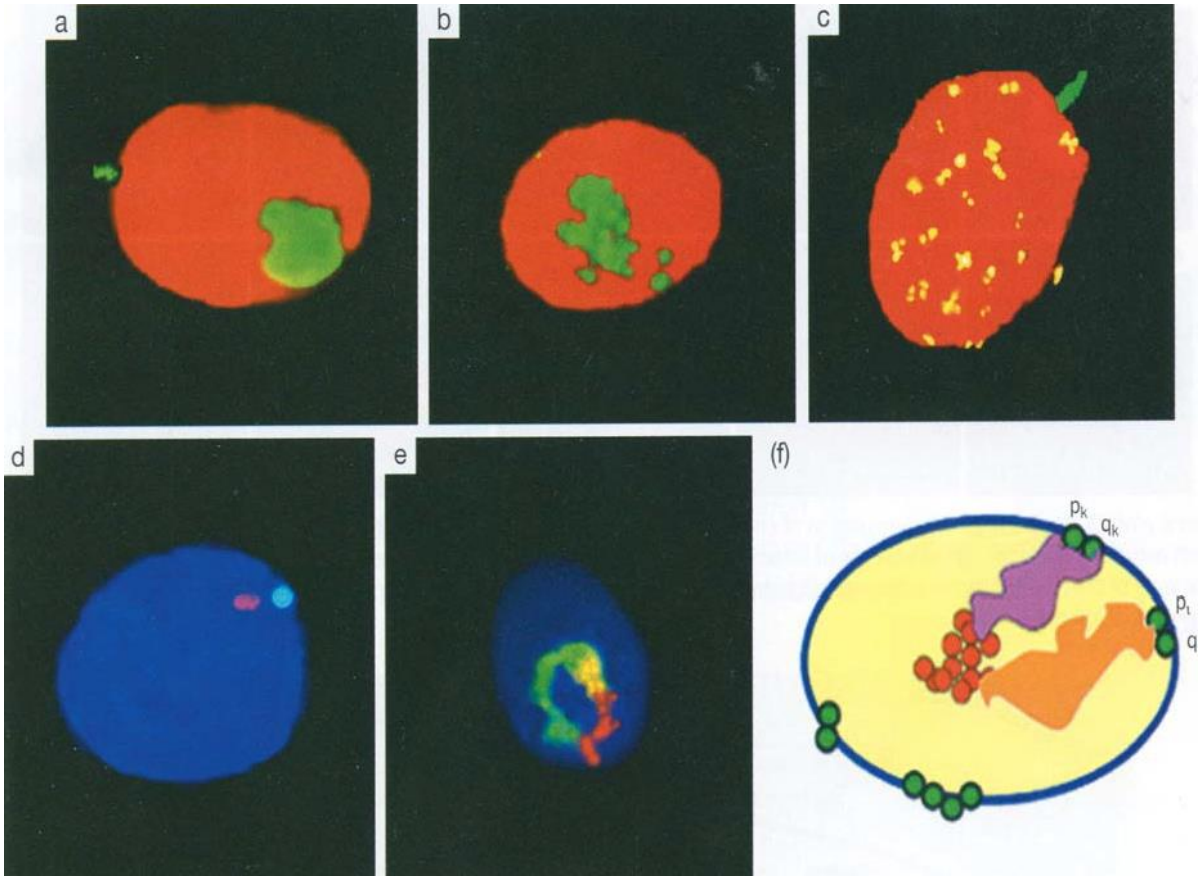
Spermde kromozom alanları ve kromozom yapısı

Sperm, spermatogenez sırasında özel genetik ve morfolojik işlemler neticesi meydana gelmiş, ileri derecede farklılaşmış bir hücre çeşididir. Postmayotik evrelerden (spermiyogenez) geçerken, somatik histonların yerini tedrici olarak protaminler alır[35,36]. Neticede kromatin yeniden yapılanmış olur, DNA aşırı kondanse hale gelir ve genetik aktivite tamamen susar[37,38]. Uzun süre, bu şekilde yeniden yapılanma modeline ait biyolojik fonksiyonların, hidrodinamik etkinliğe sahip kompakt çekirdek şekillenmesiyle sınırlı olduğu ve DNA'nın çevreden oldukça iyi biçimde korunduğu kabul edilmiştir. Bu nedenle, spermatozoonun çekirdeği yumurtaya taşınan bir gen 'torbası' olarak kabul edilmiştir.

Bu görüşe karşıt olarak ise yakın zamanda, insan sperm hücrelerine spesifik ve rasgele olmayan tarzda kromozom yapılanması gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, epifloresan ya da lazer taramalı konfokal mikroskobi ile kombine edilmiş FISH ve immünohistokimyasal teknikler kullanılarak, seçilmiş DNA dizeleri ve kromozom proteinleri lokalize edilebilmişlerdir. İnsan sperminde GA'nın çeşitli özellikleri tanımlanmıştır:

- Somatik hücrelerde olduğu gibi, her kromozom farklı bir alanı kaplar[39-41] (Şekil 5.1a).
- Her kromozomun hücre içerisinde tercih ettiği bir yer vardır ve kromozomların birbirlerine göre konum almaları gelişigüzel değildir[42-46].
- Homolog olmayan kromozomlara ait sentromerler (CEN) çekirdek içine gömülmüş halde *chromocenter*'da toplanmışlardır[41,47,48] (Şekil 5.1b).
- Telomerler (TEL) çekirdeğin periferinde yerleşmiş olup, burada dimer ve tetramer formlarında etkileşimde bulunurlar[44,49,50] (Şekil 5.1c).
- Telomer dimerleri, kromozom uçları arasındaki rasgele karşılaşmalardan çok, bir kromozomun iki ucu arasındaki temas yerlerine karşılık gelir. Bu nedenle de spermdeki kromozomlar halka şeklindedir[51,52] (Şekil 5.1d ve e).

Birikmiş verilere dayanarak, insan sperminde GA için genel bir model ileri sürülmüştür (Şekil 5.1f).



Şekil 5.1: *İnsan sperminde kromozom organizasyonu. (a) Kromozom alanı: boya probu kullanılarak kromozom 6 (CHR 6) (yeşil) lokalize edilmiştir. Total DNA propidium iodine (PI) (kırmızı) ile karşıt boyanmıştır. (b) CENP-A (sentromer proteini A)'ya karşı antikorlar ile immünfloresans yapılarak sentromerler (yeşil) görüntülenmiştir. Total DNA PI (kırmızı) ile karşıt boyanmıştır. (c) TTAGGG probu (sarı/yeşil) kullanılarak yapılan floresans in situ hibridizasyon (FISH) telomerlerin büyük kısmının dimerler ve tetramerler şeklinde birleştiklerini gösterir. Total DNA PI (kırmızı) ile karşıt boyanmıştır. (d) Kromozom 3'ün p ve q kollarında yerleşmiş subtelomerik dizeler (subTEL3q, pembe; subTEL3p, zümrüt yeşili) uzamsal olarak kapalıdır. Total DNA diamidino-2phenylindole (DAPI) (mavi) ile karşıt boyanmıştır. (e) CHR1 (1q, yeşil; 1p, kırmızı)'dan mikrodiseke edilmiş kola-spesifik problar kullanılan FISH, bu kromozomun halka yapısına dikkat çekmekte. Total DNA DAPI (mavi) ile karşıt boyanmıştır. (f) Sperm çekirdek yapısının şematik modeli. Çekirdekten geçen bir kesit içerisinde seçilmiş kromozom alanları (pembe ve ocher), telomerler (TEL) (yeşil daireler) ve sentromerler (CEN) (kırmızı daireler) görülmekte. TEL çekirdeğin periferinde etkileşirken, homolog olmayan CEN bir chromocenter içinde birikmiştir. Ward ve Zalensky 1996'dan değiştirilmiştir (kaynak 38). Ayrıca, sayfa xxv'deki Renkli resim 1'e bakınız.*

SPERM ÇEKİRDEĞİNİN DURUMU VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

USA'da yılda 2 milyonun üzerinde gebelik 20. haftadan önce kaybedilir ve bunların yarısı da sayı bozuklukları, kırıklar/yer değiştirmeler ve mutasyonlar gibi kromozom anomalileri taşır[1,53]. Germ hücre serilerinde ve erken evre embriyolarda böyle kromozom bozukluklarının saptanması için biyokimyasal ve FISH'e dayalı tanı yöntemleri ya yeni düzenlenmektedir ya da henüz geliştirilmektedir[54-58].

Fertilizasyon ve/veya erken evre gelişim bozuklukları gamet çekirdeğindeki anormal DNA paketlenmesinin bir sonucu da olabilir. Oositlerdeki yapısal DNA organizasyonu üzerinde fazla çalışılmış olmamakla birlikte, infertil erkeklerin önemli bir kısmı çekirdek malformasyonuna ya da kromatin defektlerine sahip sperm yapmaktadırlar. Bunlar arasında temel kromozom protein bozuklukları[59,60] veya kabaca oluşmuş kromatin kondensasyon defektleri[3261-64] bulunur. Kromatin kondensasyon defektleri sitokimyasal ve elektronmikroskobi

metodları ile saptanmış olmakla birlikte, bozulmuş çekirdek düzenlenmesiyle ilgili moleküler esaslar izah edilemeden kalmıştır. Erkek faktörü infertilite heterojen bir hastalık olup, sperm kromatin/çekirdek yapılanmasına ait bozukluklar büyük olasılıkla kompleks ve çok çeşitlidir. Aşağıdaki bölümlerde, sperm genomu yapısı ile ilişkili çekirdek sapmalarına ait birkaç örnek vereceğiz. Burada, fertilite kliniğinde tedaviye alınmış hastalara ait sperm örnekleri resimlerini kullandık. Karşılaştırmalı sperm analizleri normal sperm sayı ve motilitesine fakat anormal sperm morfolojisine (yuvarlak veya *torpedoid* hücreler gibi) işaret etmiştir. Hastaların fizik muayeneleri, varikosel de dahil olmak üzere hiçbir bozukluk göstermemiştir.

KROMOZOM ALANININ SIKILIĞI

Fertil donörlerin sperm hücrelerinin %95'inde, tüm kromozomları boyayan probların (Şekil 5.2a) ya da p ve q kollarına spesifik kombine boyama problarının (Şekil 5.2b) kullanılmasıyla elde edilen FISH sinyalleri oldukça küçük alanlarla sınırlanmış olup, keskin kromozom alan (CT) sınırlarına sahiptiler. Böylelikle FISH, sıkı paketlenmiş, birbirlerine yakın yerleşmiş p ve q kollarının oluşturduğu kompakt CT'ler saptar. Normal spermde CT, metafaz kromozomlarına göre yaklaşık olarak dört kez daha kondanse olup, interfaz CT'ndan çok daha kondanse halde bulunurlar.

İdiyopatik infertilitesi bulunan bazı hastaların spermlerinde (çalışılan on olgudan üçü), anormal hibridleşme örnekleri gözlendi (Şekil 5.2c). Daha detaylı olarak, örnek P44'deki hücrelerin %42'si ve P09'un %36'sında geniş ve diffüz sinyaller; örnek P12'deki hücrelerin %27'sinde ise çoklu sinyaller alındı. Hibridizasyon resmi, örnek P44 ve P09'daki spermlerde yüksek seviyede kromozom yapılanmasında lezyon bulunabileceğine işaret etmekte. Hasta P12'nin spermi kromozom 1 anöploidisi ve/veya DNA'sında geniş alanda yeniden düzenlenme taşıyor olabilir (Şekil 5.2, sağ taraftaki paneller).

KROMOZOM YERLEŞİMİ

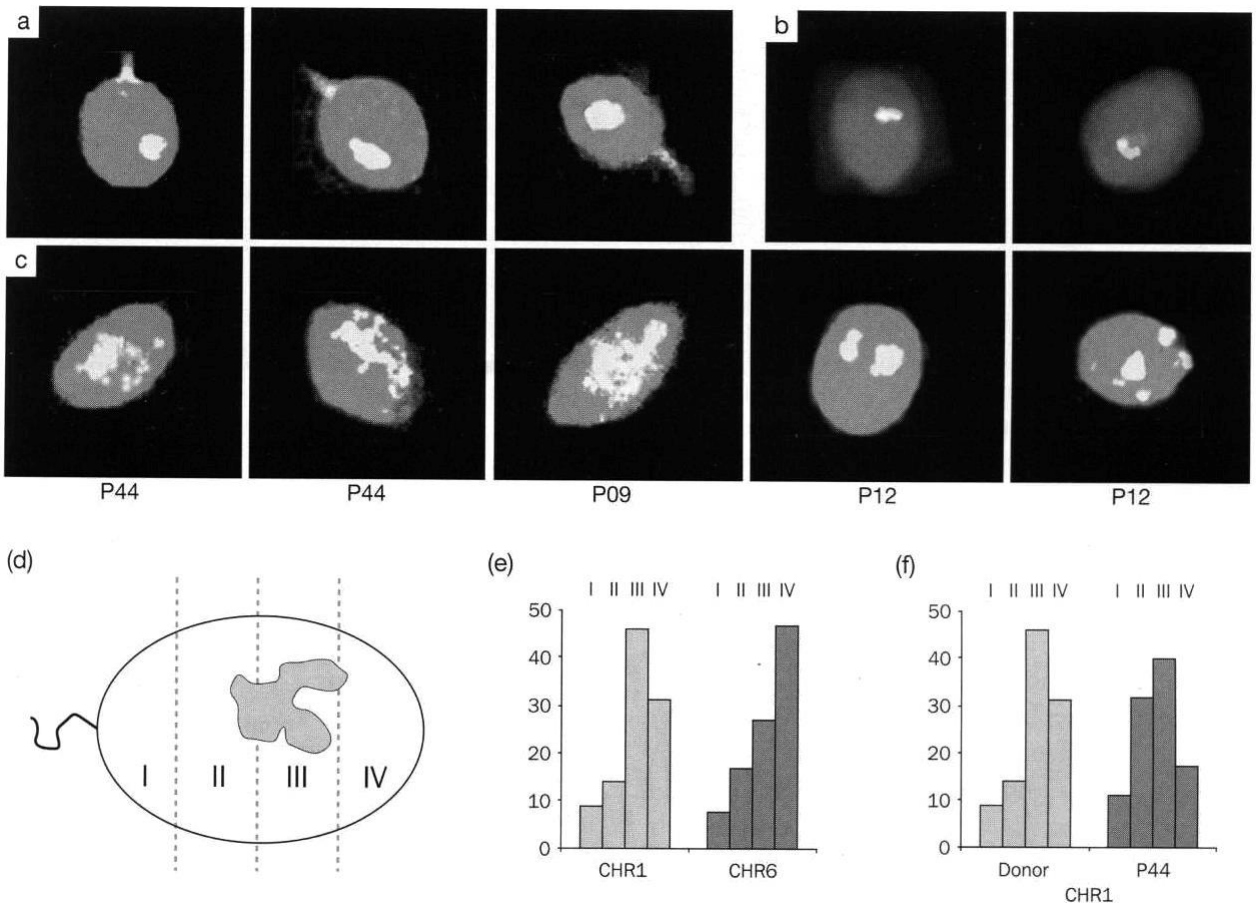
Simetrik olmayan uzamış bir şekle sahip olmaları nedeniyle insan sperm hücrelerinde çekirdek içi kromozom pozisyonunun belirlenmesi mümkündür, ve kuyruğun yapışma yeri kolaylıkla bir uzamsal referans noktası olarak kullanılabilir[46]. Bununla birlikte, günümüze kadar bu yönde sadece bir kaç çalışma yapılmıştır. Boyama probları kullanılarak yapılan FISH, kromozom X[43,44,46] ve kromozom 6'nın[46] tercihan sperm çekirdeğinin ön kısmında, kromozom 18'in sperm kuyruğunun yanında[43], kromozom 13'ün ise rasgele[44] yerleştiklerini göstermiştir. Yakın tarihli bir çalışmada biz, hücrelerin %90'ında kromozom 1'in nükleusun ön yarısını, kromozom 2'nin %80'i ve kromozom 5'in %85'inin ise arka yarımı tercih ettiklerini bulduk[52]. Diğer bir teknik olan kromozom spesifik sentromer problu FISH ile, kromozom 2, 6, 7, 16, 17, X ve Y için çekirdek içinde tercihli yerleşimlerin bulunduğu gösterilmiştir[46].

Şekil 5.2d-f'de gösterilen örneklerde, DNA kromozom-boyayan probların kullanılmasıyla, hibridizasyondan kaynaklanan FISH sinyallerinin yerlerine bakarak kromozomların yerleşimlerini izledik. Her bir çekirdekte kromozomların yerleşimleri için, Şekil 5.2d'de gösterildiği gibi özel çekirdek dilimleri, I-IV, tahsis edildi. Her sperm örneğinde yaklaşık 100 çekirdek analiz edildi ve uzamsal dağılım diyagramları kullanılarak CT'lerin lokalizasyonları ortaya konuldu (Şekil 5.2e ve f). Şekil 5.2e, fertil donörlerin spermlerinde kromozom 6'nın kromozom 1'e göre daha önde yerleşmeye meyilli olduğunu, her ikisinin de çekirdeğin arka kısmında nadiren bulunduğunu göstermekte.

Biz ayrıca, normal ve infertil hasta P44'ün sperm çekirdeklerinde kromozom 1'in pozisyonlarını da karşılaştırdık. Şekil 5.2f, infertil sperm örneğinde bu kromozomun çekirdekteki yerleşiminin daha az sınırlanmış olduğunu göstermekte. Bu, yukarıda belirtildiği gibi, düzensiz paketlenme neticesi ve/veya rasgele olmayan kromozom yerleşimini idare eden bilinmeyen mekanizma(lar)daki bir sapmadan kaynaklanmış olabilir.

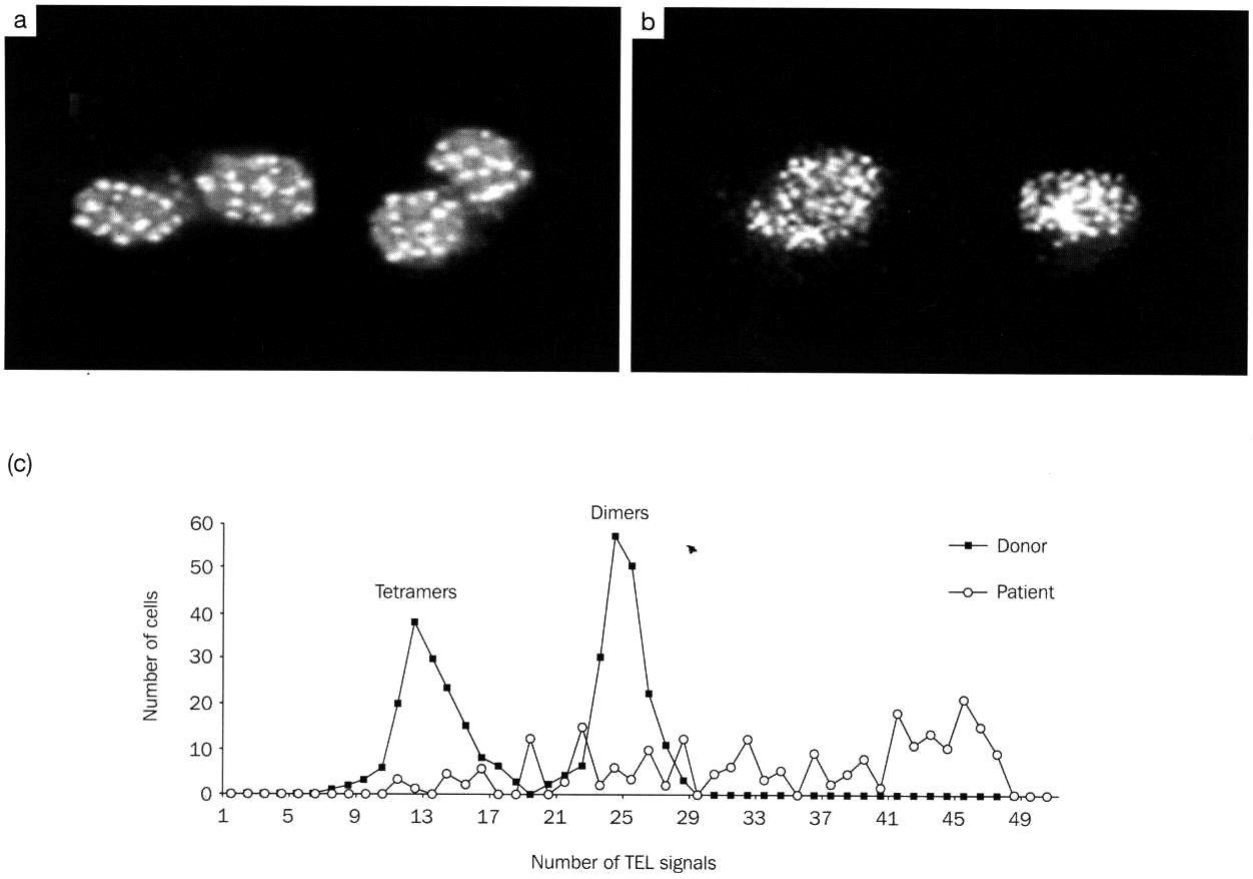
TELOMERİN YERLEŞİMİ

İnsan spermi içinde telomer $(TTAGGG)_N$ tekrar dizilerinin lokalizasyonu hepsinde olmasa bile çoğunda, telomerlerin dimerler ve tetramerler şeklinde birleşmiş olduğunu ortaya koyar (Şekil 5.1c ve 5.3a)[49]. Bunun sonucunda, frekans dağılım grafiği incelendiğinde (Şekil 5.3c), çekirdeklerinin çoğunluğunun iki yerde pik yaptıkları gözlenir: ilki 12 hibridizasyon lokuslarına (TEL tetramerleri) ve ikincisi 24 lokuslarına (TEL dimerleri) karşılık gelir. Telomer-telomer etkileşiminin olmadığı insan sperminde, 46 hibridizasyon sinyali (2 telomer x 23 kromozom) gözlenmelidir.



Şekil 5.2: *Kromozomun hücre içi lokalizasyonunun boyalı prob ile floresans in situ hibridizasyon (FISH) kullanılarak saptanması (a) Normal spermde, kromozom 1'in (CHR1) boyalı prob hibridizasyonunun (sarı) tipik örneği (b) Normal spermde CHR1 kola-özgü prob hibridizasyonunun tipik örneği (1p, yeşil; 1q, kırmızı) (c) 3 adet anormal sperm örneğinde CHR1 hibridizasyon örneği. (d) Sperm nükleus kesitinde, CHR bölgesi pozisyonunun şematik örneği. (e) Grafik, I-IV. bölümde yer alan CHR1 ve CHR6 lokalizasyon dağılımlarını gösteriyor (analiz edilen total FISH sinyallerinin çıkış yüzdesi). (f) Normal ve anormal sperm hücrelerinde CHR1'in hücre içi pozisyonlarının karşılaştırılması. Bkz. sayfa xxvi renkli resim 3.*

Biz donör ve hastalardaki spermde telomerlerin lokalizasyonunu karşılaştırdık (toplam 20 hasta) (Şekil 5.3). İnfertil erkeklerden elde edilen 3 sperm örneği, telomer lokalizasyonlarının çarpıcı biçimde farklı olduğunu gösterdi. Hücrelerin çoğunda, hibridizasyon nükleus üzerinde serpiştirilmiş çok sayıda nokta şeklinde görüldü (Figure 5.3b). Sonuç olarak, frekans dağılım grafiğinde, telomer gruplaşması görülmedi (Şekil 5.3c). Böyle lokalizasyonlar, normal insan sperminin karakteristiği olan telomer-telomer etkileşiminin bulunmadığına işaret eder. Böyle bir fenotipin moleküler mekanizması bilinmemektedir. Atipik sperm telomeri-bağlayan proteinler[65] veya kusurlu telomerik DNA sözkonusu olabilir.



Şekil 5.3: *Normal ve anormal hücrelerde çekirdek içi telomer lokalizasyonlarının karşılaştırması. (a) Normal spermde telomerler, dimerler ve tetramerler halinde birleşiyor. (b) Anormal sperm hücrelerinde telomer hibridizasyonu, çekirdek üzerine dağılmış çok sayıda küçük noktalar şeklinde görülüyor. (c) Sperm hücrelerinde, floresan in situ hibridizasyon yöntemi ile saptanmış, telomer (TEL) hibridizasyon sinyal dağılım sıklığı,. Normal sperm hücrelerinin çoğunluğunda, TEL hibridizasyon sinyallerinin sayısı 24 (TEL dimerleri) ve 12 (TEL tetramerleri)'de pik yapar (Şekil üzerinde yatay yazı: TEL sinyallerinin sayısı; dikey yazı: Hücre sayısı; Donör, Hasta, Tetramerler, Dimerler).*

FERTİLİZASYON ESNASINDA GENOM YAPISI VE SPERM GENOMUNUN ÇÖZÜNMESİ

Yukarıdaki veriler, idiyopatik erkek infertilitesi olan ve randomize seçilmiş küçük bir grup hastadan elde edilmiştir. Bu sonuçlar, karakteristik sperm hücre genom yapısından sapmaların belirgin olarak 3 kategori içinde toplandığını gösterir: (1) Kromozom alanlarının atipik toplanması (2) kromozomların çekirdek içinde dengesiz ve bozuk yerleşimi (3) bozulmuş telomer etkileşimleri. Bu bozuklukların başarılı bir fertilizasyon ve erken gelişimdeki olası etkileri nelerdir?

Normal memeli embriyo gelişimi için anne ve baba genomunun birlikte katılımı gereklidir[66]. Spermatozoada sessiz halde bulunan kromatin ooplasm içine girer girmez, erkek pronükleusu adını alarak, dekondanse ve transkripsiyon yapabilir kromatin halinde yeniden şekillenir. Bu yeniden yapılanma mayotik maturasyon sırasında görülen bir oosit aktivasyonu ile kontrol edilmektedir[67]. Fertilizasyondan sonra sperm genomunun yeniden yapılanması; çekirdekten kromozomların çekilmesini, histonların yerleşmesini (dekondansasyon), erkek pronükleusunun oluşumunu ve dişi pronükleusuna doğru yönelmesini içeren kompleks bir işlemdir[68,69]. Kromozomlarda nükleoplazmin ailesinden şaperonlar, değişen temel proteinlerdir[70]. Genel olarak, pronükleus gelişiminden sorumlu erkek ve kadına ait unsurların moleküler özellikleri erken bir evrede önem kazanmaktadır. Sperm kromozomunun yeniden yapılanmasından sorumlu aktivite anne kaynaklı olmakla birlikte, sperm nükleusunun yapısal organizasyonu ve biyokimyasal kompozisyonu

da eşit oranda önemlidir. Düzgün paketlenmemiş ve uzamsal olarak dağınık yerleşmiş sperm kromozomları, büyük olasılıkla yumurtanın sitoplazması tarafından yeterli düzeyde işlem görmeyeceklerdir.

Transkripsiyon, kromozom alanlarının düzenlenmesini da içeren kromatin yapısının tesiri altındadır[71] ve dolayısıyla erkek genomunun aktivasyonu da spesifik sperm GA'sına bağlı olacaktır. Yeni veriler, memelilerde transkripsiyonun diğer tür organizmaların zigotlarınkinden daha erken başladığını göstermiştir, şöyle ki; fertilizasyondan saatler sonra erkek pronükleusu içinde başlayıp, embriyo nükleusuna kadar devam eder[72-74]. Bundan dolayı, *spermin anormal genom yapısı (veya immatür gametlerdeki gelişmemiş GA) erken gelişim evresinde yüksek olasılıkla düzensizliklere yol açabilir.* Ayrıca, paternal ve maternal genomlar 4-hücreli embriyo dönemine kadar uzamsal olarak ayrı olduklarından, fertilizasyonu takiben kromatinin yeniden yapılanması farklı çekirdek kompartımanlarında gerçekleşir, dolayısıyla ebeveyne özgü bir düzenleme söz konusu olabilir[75].

Yukarda gözden geçirilen veriler, insan spermindeki her kromozomun çekirdek içinde tercih ettiği bir yerleşim yeri olduğunu göstermekte. Normalde fertilizasyon sırasında spermin oosite girişi akrozom ile başladığı için, sperm kromozomlarının yumurta sitoplazmasına maruz kalışı peşisıra gelen bir dizi olay ile gerçekleşir. Bu nedenle, yumurtaya ait faktörler tarafından gerçekleştirilen ve önceden tahmin edilebilir bir dizi olay ile kromozom aktive oluyor olabilir. Biz, *düzenli sperm kromozom yerleşiminden sapmanın düzgün fertilizasyon ve gelişim açısından zararlı olabileceğini* öneriyoruz.

Tüm memelilerde, cinsiyet kromozomlarının akrozoma en yakın yerde toplanmış olması ve fertilizasyon sırasında da büyük olasılıkla yumurtaya giren ilk kromozomlar olmaları önemlidir[76]. Bu yerleşim şekli, *eutherian* memelilerden sırasıyla 170 ve 130 milyon yıl önce ayrılmış olan *monotreme* ve *marsupial* memeliler arasında korunmuştur[77]. Bu da, sperm çekirdeği içinde kromozomların yerleşimlerinin fonksiyonel bir önemi bulunduğuna dair hipotezi kuvvetle destekler.

Modern üremeye yardımcı tekniklerde intrasitoplazmik injeksiyonu ile sperm ve bazen de immatür gametler yaygın olarak kullanılıyor olsa da, ICSI sonrası fertilizasyonun moleküler/hücresel mekanizmaları halen çok fazla çalışılmış değildir[78]. Bazı yayınlar insanda, ICSI sonrası bebeklerde artmış oranda *de novo* kromozomal anomaliler geliştiğini bildirmiştir[79]. Daha önemlisi, çeşitli türlerde, ICSI sonrası sperm nükleusunun apikal bölgesinin dekondansasyonunda ve erkek genomunun replikasyonunda gecikme olduğu gözlemlenmiştir[43,80-82]. İmmünfloresan incelemeler, ICSI'yi takiben spermin perinüklear tekasının, kondanse hale geçmiş apikal bölgenin çevresinde mevcudiyetini sürdürdüğünü, oysa *in vitro* inseminasyondan sonra artık bu kısmın sperm nükleusundan tamamen ayrıldığını ortaya koymuştur[80]. Sperm nükleusunun kondanse olmuş apikal bölgesinde cinsiyet kromozomlarının bulunması, S-fazına geç girmeye neden olan cinsiyet kromozom anomalisine yol açabilir.

Özellikle nükleusun bu bölgesinde lokalize olmuş atipik dekondansasyon, cinsiyet kromozomlarının normal yapılanmasında dengesizlik oluşturabilir (S-faza geç girme veya gecikmiş gen aktivasyonu gibi). Bu nedenle, ICSI işleminin kendisi, normal spermin iyi bilinen GA özelliklerinin hatalı işlemesi nedeniyle, doğumsal defektlere neden olabilir.

Yukarıda tanımlanan örnekler (Şekil 5.3), idiyopatik infertilitesi olan erkeklerin spermlerinde telomerlerin yerleşiminin ve telomer-telomer etkileşimlerinin bozulmuş olduğunu gösterir. İnsan sperminde kromozomların telomer bölgesi, DNA (soma hücreleri ile kıyaslandığında) ve sperme özgü telomerik proteinlerin uzamış olması ile karakterizedir[49,83,84]. Spermatogenez sırasında telomer DNA'sının uzaması, tüm memeliler için karakteristik özellikte[85] ve germ hücrelerinde yüksek aktiviteye sahip bir spesifik reverz transkriptaz olan telomeraz ile sağlanır[86,87]. Farelerde, telomeraz *knock-out* erkek farelerden elde edilen spermlerle oositlerin döllenmesi, yarıklanma ve gelişimede bozulmalara neden olmuştur[88]. Bu sonuçlar, spermdeki telomer DNA'sının durumunun, hatalı fertilizasyon ve yarıklanmaya neden olabileceğini göstermektedir. Bu konuda halen insana ait eşdeğer veriler bulunmamaktadır. Bununla birlikte biz genel hipotez olarak, insan spermatozoasındaki telomerlerin, fertilizasyon sırasında ve erken embriyo gelişiminde kritik fonksiyonlara sahip, yegane moleküler ve yapısal özellikler olduğunu öneriyoruz. Laboratuvarımızda infertil hastaların telomerlerini araştıran deneysel çalışmalar halen devam etmektedir.

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, otörlerden birine (AZ) verilen National Institutes of Health (NIH) yardımı HD-042748 ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. McFadden DE, Friedman JM. Chromosome abnormalities in human beings. Mutat Res 1997; 396: 129
2. Slorer E, et al. Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. Fertil Steril 2004; 81: 925
3. Perreault SD, et al. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. Adv Exp Med Biol 2003; 518: 253
4. Chandley AC. On the parental origin of de novo mutation in man. J Med Gene 1991; 28: 217
5. Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. Reproduction 2001; 121: 655
6. Egozcuc J, et al. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility. Placenta 2003; 24: 62
7. Tempest HG, Griffin DK. The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. Cytogenet Genome Res 2004; 107: 83
8. Schmidt £, et al. Detection of structural and numerical chromosomal abnormalities by ACM-FISH analysis in sperm of oligozoospermic infertility patients. Hum Reprod 2004; 19: 1395
9. Petit FM, et al. Could sperm aneuploidy rate determination be used as a predictive test before intracytoplasmic sperm injection? J Androl 2005; 26: 235
10. Foresta C, et al. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 152
11. Pang MG, et al. The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. Mol Vis 2005; 11: 152
12. Rabl C. Ueber Zelltheilung [On cell division]. Morphol Jahrbuch 1895; 10: 214
13. Boveri T. Die blastomerenkerne von Ascaris megalocephala und die Theorie der Chromosomenindividualitat [The blastomere nucleus of Ascaris megalocephala and the theory of chromosome individuality on cell division]. Arch Zellforsch 1909; 3: 181
14. Marshall WE Order and disorder in the nucleus. Curr Biol 2002; 12: 185
15. Taddei A, et al. The function of nuclear architecture: a genetic approach. Annu Rev Genet 2004; 38: 305
16. Cremer T, et al. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. Biol Cell 2004; 96: 555
17. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. Nat Rev Genet 2001; 2: 292
18. Zalensky AO. Genome architecture. In Verma RS, ed. Advances in Genome Biology. Greenwich, London: JAI Press, 1998: 179
19. Cremer M, et al. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. J Cell Biol 2003; 162: 809
20. Cremer M, et al. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. Chromosome Res 2001; 9: 541
21. Parada L, Misteli T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. Trends Cell Biol 2002; 12: 425
22. Kozubek S, et al. 3D structure of the human genome: order in randomness. Chromosoma 2002; 111: 321
23. Boyle S, et al. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. Hum Mol Genet 2001; 10: 211
24. Croft JA, et al. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. J Cell Biol 1999; 145: 1119
25. Parada LA, et al. Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. Curr Bio! 2002; 12: 1692
26. Leitch A, et al. The spatial localization of homologous chromosomes in human fibroblasts at mitosis. Hum Genet 1994; 93: 275
27. Nagele R, et al. Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosome order. Science 1995; 270: 1831
28. Allison DC, Nestor AL. Evidence for a relatively random array of human chromosomes on the mitotic ring. J Cell Biol 1999; 145: 1
29. Manuelidis L. Indications of centromere movement during interphase and differentiation. Ann NY Acad Sci 1985; 450: 205
30. Neves H, et al. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RAR alpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. Blood 1999; 93: 1197
31. Bridget JM, et al. Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. Curt Biol 2000; 10: 149
32. Sadoni N, et al. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. J Cell Biol 1999; 146: 1211
33. Stadler S, et al. The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation. BMC Cell Biol 2004; 5: 44
34. Parada LA, et al. Tissue-specific spatial organization of genomes. Genome Biol 2004; 5: R44
35. Meistrich M. Histone and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. In Hnilica LS, Stein GS, Stein JL, eds. Histones and Other Basic Nuclear Proteins. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989: 165
36. Churikov D, et al. Male germline-specific histones in mouse and man. Cytogenet Genome Res 2004; 105: 203

37. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol 1982; 93: 298
38. Ward WS, Zalensky AO. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1996; 6: 139
39. Brandriff BE Gordon LA. Spatial distribution of sperm-derived chromatin in zygotes determined by fluorescence in situ hybridization. Mutat Res 1992; 296: 33
40. Haaf T, Ward DC. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in sku hybridization and extended chromatin fibers. Exp Cell Res 1995; 219:604
41. Zalensky AO, et al. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. Chromosoma 1995; 103:577
42. Geraedts JP, Pearson PL. Spatial distribution of chromosomes 1 and Y in human spermatozoa. J Reprod Fertil 1975; 45: 515
43. Luetjens CM, et al. Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. Lancet 1999; 353: 1240
44. Hazzouri M, et al. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. Mol Reprod Dev 2000; 55: 307
45. Tilgen N, et al. Heterochromatin is not an adequate explanation for close proximity of interphase chromosomes 1-Y, 9-Y, and 16-Y in human spermatozoa. Exp Cell Res 2001; 265: 283
46. Zalenskaya LA, Zalensky AO. Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. Chromosome Res 2004; 12: 163
47. Zalensky AO, et al. Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. Chromosoma 1993; 102: 509
48. Hoyer-Fender S, et al. The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. Exp Cell Res 2000; 254: 72
49. Zaicnsky AO, et al. Telomere-telomere interactions and candidate telomere binding protein(s) in mammalian sperm cells. Exp Cell Res 1997; 232; 29
50. Meyer-Ficca M, et al. Clustering of pericenttomeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (Rattus norvegicus) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. J Cell Sci 1998; 111: 1363
51. Solov'eva L, ec al. Nature of telomere dimers and chromosome looping in human spermatozoa. Chromosome Res 2004; 12: 817
52. Mudrak OS, et al. Chromosome architecture in the human sperm nucleus. J Cell Sci 2005; 118: 4541
53. Wyrobek AJ. Methods and concepts in detecting abnormal reproductive outcomes of paternal origin. Reprod Toxicol 1993; 7: 3
54. Sloter ED, et al. Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions, and numerical abnormalities in the sperm of healthy men. Am J Hum Genet 2000; 67: 862
55. Fung J, et al. Detection of structural and numerical chromosome abnormalities in incerphasc cells using spectral imaging. J Histochem Cytochem 2001; 49: 797
56. Plachot M. Genetic analysis of the oocyte - a review. Placenta 2003; 24: 66
57. Evenson DP, et al. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting spcrrn DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. J Androl 2002; 23: 25
58. Virro MR, et al. Sperrn chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril 2004; 81: 1289
59. Bench G, et al. Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time. Mol Reprod Dev 1998; 50: 345
60. De Yebra L, et al. Complete selective absence of protamine P2 in humans. J Biol Chem 1993; 268: 10553
61. Francavilla S, et al. Chromatin defects in normal and malformed human ejaculated and epididymal spermatozoa: a cytochemical ultrastructural study. J Reprod Ferril 1996; 106:259
62. Francavilla S, et al. Ultrastructural analysis of chromatin defects in testicular spermatids in azoospermic men submitted to TESE-ICSI. Hum Reprod 2001; 16: 1440
63. Sakkas D, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998; 13: 11
64. Bianchi PG, et al. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. Mol Hum Reprod 1996; 2: 139
65. Gineitis AA, et al. Histone H2B variant is a parr of the telomere-binding complex that secures telomere membrane attachment in human sperm. J Cell Biol 2000; 151: 1591
66. Hall JG. Genomic imprinting: nature and clinical relevance. Annu Rev Med 1997; 48: 35
67. McLay DW, Clarke HJ. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. Reproduction 2003; 125:625
68. Wright SJ. Sperm nuclear activation during fertilization. Curr Top Dev Bioi 1999; 46: 133
69. Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization aftet sperm-egg fusion. Int Rev Cytol 2000; 5: 1
70. Burns KH, et al. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. Science 2003; 300: 633
71. Gilbert N, et al. Chromatin organization in the mammalian nucleus. Int Rev Cytol 2005; 242: 283

72. BounioI-Baly C, et al. Dynamic organization of DNA replication in one-cell mouse embryos: relationship to transcriptional activation. Exp Cell Res 1997; 236: 201
73. Aoki F, et al. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. Dev Biol 1997; 181: 296
74. Capco DG. Molecular and biochemical regulation of early mammalian development. Int Rev Cytol 2001; 207: 195
75. Mayer W, et al. Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. J Cell Biol 2000; 148: 629
76. Greaves IK, et al. Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance. Chromosome Res 2003; 11: 503
77. Kirsch JAW, et al. DNA-hybridisation studies of marsupials and their implications for metatherian classification. AustJ Zool 1997; 45: 211
78. Schatten G, et al. Cell and molecular biological challenges of ICSI: ART before science? J Law Med Ethics 1998; 26: 29
79. Bonduelle M, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent childten. Hum Reprod 1999; 14: 243
80. Sutovsky P, et al. Intracytoplasmic sperm injection for rhesus monkey fertilization results in unusual chromatin, cytoskeletal, and membrane events, but eventually leads to pronuclear development and sperm aster assembly. Hum Reprod 1996; 11: 1703
81. Hewitson L, et al. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. Nat Med 1999; 5:431
82. Tcrada Y, et al. Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? Fertil Steril 2000; 74: 454
83. Zalenskaya LA, Bradbury EM, Zalensky AO. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. Biochem Biophys Res Comrnun 2000; 279: 213
84. Bekaert S, et al. Telomere biology in mammalian germ cells and during development. Dev Biol 2004; 274: 15
85. Kozik A, et al. Identification and characterization of a bovine sperm protein that binds specifically to single-stranded telomeric deoxyribonucleic acid. Biol Reprod 2000; 62: 340
86. Kim NW, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266:2011
87. Achi MV, et al. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with relomerase activity. Biol Reprod 2000; 63: 591
88. Liu L, et al. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. Dev Biol 2002; 249: 74

6

Sperm Patolojisi: Patojenik Mekanizmalar ve Desteklenmiş Üremede Doğurtganlık Potansiyeli

Hector E. Chemes, Vanesa Y. Rawe

Çeviri: *Emre Huri*[*]*, Ali Ayyıldız*[*]

GİRİŞ

Teratozoospermi, astenozoospermi ve nekrozoospermi sıklıkla, erkeklerdeki kısırlığın temel nedeni olmaktadırlar ve (in vitro-tüpte doğurtganlık (TD) dahil) desteklenmiş üreme teknolojilerinin (assisted reprodactive technologies (ART)) denenmesinde doğurtganlık prognozu üzerinde olumsuz etkilere sahiptirler.

Intra-kitoplazmik sperm enjeksiyonunun (IKSI) keşfi mikro-enjeksiyon olarak uygulanacak olan aynı spermatozoonun motilitesinin ve morfolojisinin incelenmesi olanağını sağlamıştır. Bu gelişmenin ardından anormal ve immotil spermatoza'nın da başarılı bir şekilde üreme oosit üretebileceği anlaşılmış ve ART prosedürlerinde bunların kullanımının güvenli olup olmadığı sorusu ortaya çıkmıştır. Kimi androloglar bir diagnosis oluşturmak için sperm patolojilerini nitelendirebilmek adına, farklı araçlar kullanmanın önemini vurgulamaktayken diğerleri; kullanımda olan patolojilerin doğasına fazla önem atfetmeksizin IKSI uygulamalarında spermatoza kullanımına daha yatkın olagelmişlerdir.

Birçok çalışmanın konusu olagelen Sperm morfolojisi, bilgisayar destekli ya da araştırmacı merkezli birçok objektif yöntem tarafından sübjektif olarak tanımlanmış ya da değerlendirilmiştir 1-3. Sperm sınıflandırılmasında katı kriterler getirilmiş ve ART uygulamalarında sperm morfolojisi ile prognoz arasında bulunan korelasyon genel bir kabul kazanmıştır 4,5. Bu metotların tümünde sperm başı, orta bölüm ve flagellum kısmın morfometrik parametreleri ışık mikroskobu altında detaylı olarak analiz edilmiştir. Bu yöntem spermatozoonun dış profilinin detaylı bir gözlemine olanak sağlamakta ancak, içyapısı hakkında bilgi sağlayamamaktadır. Yüksek çözünürlüklü ışık ve elektron mikroskopisi, immunositokimya ve moleküler çalışmaların birleşimi, normal ve anormal spermatozanın yapısı hakkında yeni anlayışlar gelişmesine ve spermlerin hücre-altı düzeydeki aberasyonlarını tanımlamaya olanak sağlamaktadır.

Ayrıca, bu verilerin ilgili klinik ve doğurtganlık bilgileriyle korelasyonu bu alanın aydınlatılmasına yeni bir soluk getirmiştir. Bu yaklaşım, spermatoza'nın *görüntüsünün* tanımlayıcı bir morfolojisinin de ötesine uzanmaktadır. Yine de, kimi önemli sorular bulunmaktadır: "*Morfolojik olarak anormal olan bir spermde sperm fonksiyonunu bozan şey nedir? Bozuk bir sperm şeklinde sorun yaratan şey ne? Amorf ya da incelmiş bir Spermatozada sperm başındaki değişikliğin ardında ne yatıyor? Bu basitçe bir anormal biçim midir yoksa spesifik sperm bileşenlerinde bir sorun mu var? Sperm patolojisi anormal spermatozadaki yapısal ve*

[*] SB Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. Üroloji Kliniği, Ankara.

fonksiyonel kusurları tanımlayan disiplindir". Bu, sperm yetersizliklerinin mekanizmalarını açıklanmasına yardım getirmesi, genetik fenotiplerinin tanımlanması, doğurtganlığın artırılması için stratejiler önermesi ve muhtemelen geleceğin tedavi yöntemlerinin geliştirecek olan moleküler genetik çalışmalarına bir kapı açması açısından Sperm alterasyonlarının bu iki temel örneği diğerlerinden ayrılmaktadır; en sık rastlananı uniformal bir düzen izlemeyen ve her bir bireyde, farklı hastalarda farklı kombinasyonlar gösteren sperm anomalilerinin heterojen dizilimi tarafından tanımlanmaktadır.

Bunlar üreme sistemi üzerinde etkili olan çeşitli koşullar için genellikle ikincil olan ve potansiyel olarak geri döndürülebilir, spesifik olmayan anomalilerdir. İkinci tür ise aynı dertlerden muzdarip farklı hastalarda benzer bir konfigürasyon gösteren tanımlanabilir, spermatoza'nın büyük bir kısmını etkileyen uniformal bir düzen izleyen anomalilerdir. Bu alterasyonlar stabil konumdadır, tedavi amaçlı müdahalelere yanıt vermezler, aile içi yaygınlık gösterebilirler ve tanımlanmış ya da tahmin edilebilir bir genetik kökene sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı bu alterasyonlar sistematik sperm bozukluğu olarak bilinirler.

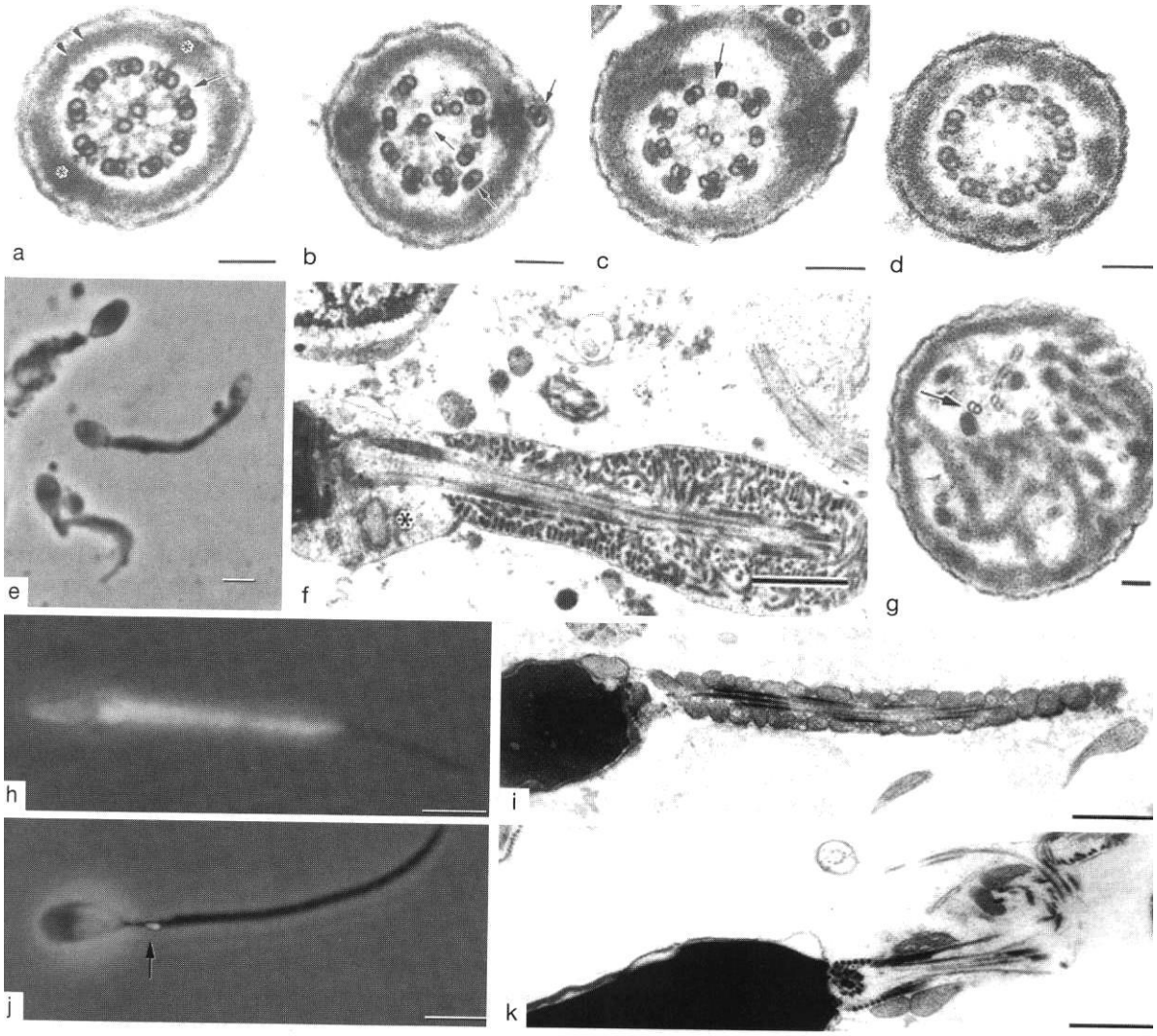
MOTİLİTE BOZUKLUKLARINA EŞLİK EDEN PATOLOJİK SPERM FENOTİPLERİ

Astenozoospermanın fizyopatolojisini tam olarak anlayabilmek için öncelikle sperm kuyruğunun üst yapısının kısaca tariflenmesi gerekmektedir. İnsan sperm flagellumu uzun bir yapıdır; yaklaşık olarak 50 um boyunda ve 0.4-0.5 um çapındadır. Aksonem adı verilen ve bir çift merkezi mikrotübülüsü çevreleyen 9 periperal mikrotubular çift tarafından çevrelenen sirkümferensiyal bir dizini (sözde 9+2 konfigürasyonu) içeren bir merkezi öğeden oluşmaktadır (Şek. 6.1a). Her bir periperal çift birbirine yapışık, tübülin heterodimerinin protofilamentini içeren iki alt birimden, mikrotubulus A ve B'den. iki kol A alt biriminden çıkarak bir sonraki çiftin B alt birimine uzanmaktadır. Bu kollar, adenozin trifosfataz (ATPase) aktivitesine, ekzonemal hareket için ATP den bir enerji kaynağı olarak yararlanan aktivite, sahip dinein adı verilen yapısal bir proteinden oluşmaktadır 6-7. Aksonem yoğun dış fiberler (outer dense fibers –ODFs) ve fibröz kılıf ile çevrelenmektedir. ODF ler kendilerine karşılı gelen periperal çiftlere eşlik eden 9 ince silindirik yapıdır. Fibröz kılıf bir çeşit kuyruk şekilli dış iskelettir. Yalnızca temel bölümde bulunurlar ve temel bölümün uzunluğunca uzanarak 3 ve 8 numaralı mikrotubular çifte giren uzunlamasına iki kolona benzemektedirler. Bu kolonlar düzenli bir şekilde çapraz yarı dairesel kaburga kemiklerine girer.

Astenozoospermi erkek kısırlığının sıkça görülen bir sebebidir. Hem spesifik olmayan hem de sistematik sperm fenotipleri sperm motilitesinde alterasyonlara neden olabilirler.

Spesifik olmayan flagel anomaliler (Non-specific flagellar anomalies-NSFA) birçok erkekte ağır astenozoospermi'nin altında yatan asıl nedenlerdir 8-12. NSFA larda, sperm kuyruğunun normal 9+2 organizasyonu flagellumun sayı, topografi ve mikrotubular çiftlerinin ve perikzonemal yapılarının organizasyonlarının bir kombinasyonu ile yer değiştirir (Şek. 6.1b). Etkilenmiş flagel dış çapı ve profili modifiye olmadığı için yalnızca normal ışık mikroskobunda görülebilir ve üstyapısal inceleme ile tanımlanabilir. NSFA lar, varikosel, enfeksiyonlar, bağışıklık faktörü, orşit gibi androlojikal şartlara ve diğer endojen ya da çevresel faktörlere karşı idiopatik ya da ikincil olabilirler. Bu aynı cins anomaliler bir çok doğurtgan erkekte az sayıda da olsa bulunabildiği için, görülme sıklıkları herbir astenozoospermik hasta için sperm kuyruğunun 100 den az olmamak kaydıyla çapraz bölümlerinin çok dikkatli bir şekilde sayılmasıyla tanımlanır. NSFA ların normal üst limitini, sperm popülasyonunun 40%'ı olarak saptadık; 40-60 % arası değerler sınır değerlerini ve 60 % eşiğinin üstü değerler de kesinlikle patolojik olduğunu gösterir. Muhtemelen etiyolojik ve ampirik tedaviye yönelik müdahalelere cevaben gelişen NSFAların hiçbir genetik altyapısı yoktur. NSFAların prevalansları klinik değerlendirmeler esnasında ve farklı astenozoospermik erkekler arasında düzensizlik gösterir 12-16.

Aşırı astenozoospermi'den ve kronik solunum yolları rahatsızlıklarından, sözde immotil siliger sendromu (immotile cilia syndrome-ICS) muzdarip olan erkeklerdeki kirpiksi (siliger) ve flagel felç'in altında yatan temel neden olarak, dinein kolların eksikliğinin gösterildiği 1970'lerin ortalarından itibaren astenozoosperminin temel kaynağı olan genetik olarak tanımlanan sperm fenotipleri bir çok çalışmaya konu teşkil etmiştir[17-19].



Şekil 6.1: *Orta bölümde ve kuyrukta anomaliler. (a) temel parçadaki normal bir sperm flagellumunun kesiti. Dokuz periperal akzonem çifti, merkezi çift, dinein kollar (ok) ve radyal çubuklar oldukça net bir biçimde görülebilmektedir. Fibröz kılıf 3 ve 8 numaralı çiftlere girmiş iki lateral kolondan oluşmakta (yıldız) ve yarı dairesel (semisirkümferansiyel) kaburga kemikleri (okbaşı işaretleri). (b) spesifik olmayan anomaliler gösteren sperm kuyruğu. Merkezi çift yerinden çıkmıştır (yıldız) ve merkeze doğru bir translokasyon söz konusudur ve aksonem periferisi ya da fibröz kılıfın dış yüzeyi (oklar). (c,d) iki birincil silier diskinezi hastasından alınan spermatoza örnekleri. Dinein kolların olmadığı (ok, c) ya da merkezi çiftin eksikliği gözlemlenmektedir (d). Barlar (a-d) = 0,1 UM, (e-g) fibröz kılıf displazisi (dysplasia of fibrous sheath-DFS) olan spermatoza'nın ışık mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) altındaki görüntüsü. (e) oldukça küçük, kalın ve düzensiz kuyruklar görülmektedir (faz-kontrast mikroskop görüntüsü-Phase-contrast microscopy). (f) bir DFS sperminin uzunlamasına görüntüsü. Mitokondrial kılıfın noksanlığını (yıldız) ve fibröz kılıfın fazlalıklarına dikkat ediniz. (g) düzensiz ve hiperplastik bir fibröz kılıfa sahip olan flagellum kesiti. Aksonem neredeyse tamamen yok olmuş ve yalnızca birkaç mikrotubuler çifti kalmıştır. Dinein kollar ise yoktur (oklar). Barlar= 5UM (e), 1um (f), 0,1 um (g). (h-k) mitokondrial kılıf (mitochondrial sheath-MS) alterasyonları. (h) epifloresans altındaki bu spermatozon bir uzunluğu >15 um, (normal uzunluk= 3-5 um) kapsayan MS'in yoğun ve uniformal işaretlerini ortaya koymaktadır. (i) TEM de gözlemlenen anormal derecede uzun ve çarpıtılmış MS. (j) MS noksanlığı (izole mitokondrion un bir sonucu olarak orta bölümde çok küçük bir işaretlendirme -ok-). (k) TEM altında ortabölüm biçimlenmemiştir ve mitokondria ya yoktur ya da lokasyon ya da düzen anomalisi söz konusudur. Barlar= 5um (h,j), 1um (i,k). (f) ve (g) panelleri ilk olarak 12 numaralı referansta yayınlanmıştır. Telif hakları Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Vakfına aittir. Oxford Üniversitesi Yayınları / İnsan Üremesi bölümünün izniyle basılmıştır.*

Yakın zamanda, bu rahatsızlıktan muzdarip olan hastaların bazılarında değişik seviyelerde düşen ya da rakamsal olarak a normal motilite'nin rapor edilmesi nedeniyle, ICS, birincil siliger diskinezi (primary ciliary dyskinesia-PCD) olarak yeniden adlandırılmıştır[20-22]. PCD hastaları sperm immotilitesine bağlı olarak kısırlık ya da ağır biçimde astenozoospermi çekmektedirler. Hastaların %50'sinde mukosilier klirense bağlı olarak rinosinuzit ve kronik pnömopatiden vardır ve viseral sitüs ile dekstrokardi görülmektedir[23]. Yüksek bir ihtimalle otozomal resesif mutasyon(lar) kaynaklı aile içinde ortaya çıkma olasılığı rapor edilmiştir. PCD fenotipini taşıyan üyelerin bulunduğu ailelerde bulunan dinein genlerindeki bir dizi mutasyonlar nedeniyle loküs heterojenliği en üst seviyede görülmektedir[24-29].

PCD hastalarındaki spermatoza ışık mikroskobu altında normal görünüşün immotil ya da diskinezik flageline sahip olarak görünür. Neden olan alterasyon dinein kolların birinin ya da her ikisinin de olmayışı, merkezi çiftin eksikliği, sperm aksonem'inin daha az görülen anormal konfigürasyonları veya mikrotübüler yer değişimlerinden kaynaklanmaktadır. (Şek.6.1c ve d) [17, 18, 20, 24, 30-35]. Aynı zamanda cilia'da ya da flagel de izole immotilite görülmesi de olasıdır.

Ağır astenozoospermi ve/veya sperm immotilitesine neden olan bir diğer sistematik sperm fenotipi de fibröz kılıf displazisidir (dysplasia of the fibrous sheath-DFS). Hastalar birincil kısırlık ve immotile spermatoza çeken genç erkeklerdir. Sperm flagellumu tipik olarak kısa, kalın ve oldukça düzensiz bir profildedir. (Şekil 6.1e). Bu görünümleri "güdük kuyruklar" ya da "kısa kuyruklar" olarak adlandırılmalarına yol açmıştır. Bu isimler bu patolojinin doğası ya da alt birim temeline dair hiç bir ipucu vermeyen yalnızca tarif etmek için uydurulmuş isimlerdir.

Biz DFS'lerin temel alterasyonlarının fibröz kılıfta olduğu ve bunların testis kökeninin kuyruğun spermogenesis esnasında displastik gelişiminin bir sonucu olarak ortaya çıktığı tezini savunduk [12 , 16, 36-38]. Diğer yazarlar[39-40] ise bu anomalinin kuyruk sitoskeletonunun bir çok bileşenini içerdiğini ve fibröz kılıfın en görünür şekilde etkilendiğini belirtmişlerdi. DFS sperm nekrozoospermiden kaynaklanan diğer alterasyonlarla ya da erkeklerde seminal yolun bölgesel tıkanıklığıyla ortaya çıkan ve flagellumların kalınlaşması ya da parçalanmasına neden olan yaşlı spermlerle karıştırılmamalıdır. DFS'nin ailevi ve coğrafik kümelenmeleri rapor edilmiştir.[12, 39-41]. Birçok etnik kökenden gelen bir popülasyonda DFS'nin yüksek görülürlük oranıyla PCD'nin düşük görülürlük oranı arasında vurucu bir karşıtlıkla karşılaşılmıştır [16].

Bu durum bu fenotipin ortaya çıkışında çevresel ve genetik faktörlerin etkilerini yansıtıyor olabilir. DFS'nin hücre altı esası sperm-kuyruk sitoskeleton bileşenlerinin ciddi bir biçimde düzensiz olmasıdır. Fibröz kılıf hiper-plastik ve tamamen tertipsiz görünürken akzonem parçalanmış olabilir. Aynı zamanda sıklıkla merkezi çiftin olmadığı, dinein kolların eksikliği ve orta parçanın mitokondrial kılıfının gelişiminin az miktarda olduğu ya da hiç gelişmediği de görülmektedir. (şekil 6. If ve g). Bu anormallikler gelişim esnasında oldukça stabil, tedaviye yönelik müdahalelere tepkisiz, aile içinde görülme sıklığı olan ve solunum yolları siliasında da dinein eksikliğine eşlik edebilen bir durumdadır. (Altta). DFS'nin genetik kökenini işaret etmekte olan bu alterasyonlar muhtemelen birer otozomik resesif özellikleridir[12-42-45]. Hastaların yaklaşık olarak 20%'sinde solunum yolları siliasında dinein eksikliğine bağlı olarak kronik solunum yolları rahatsızlıkları görülmektedir. DFS hastalarının bu alt kümesi solunum yolları siliasında dinein eksikliğinin spermatozadaki DFS fenotipine eşlik ettiği birincil silial diskinezinin bir çeşidini oluşturmaktadır [35,41].

Son yıllarda, fibröz kılıfın protein içeriğine dair çok yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Protein 3 (AKAP3) ve AKAP 4 ü bağlayan kinazlar fibröz kılıfın en çok görülen yapısal proteinleri olarak tanımlanmaktadır. Bunlar birbirlerine bağlanarak protein kinazı A'nın fibröz kılıfa yanaşabilmesi için yapısal bir çerçeve sağlamaktadırlar[46]. DFS fenotipinin gelişiminde bu proteinlerin rolünün analiz edilebilmesi için, DFS hastalarında AKAP3 ve AKAP4 bağlanma bölgelerinin sıralanma analizleri gerçekleştirilmiştir ancak hiçbir mutasyon gözlemlenmemiştir[47]. Yine de, AKAP4 geninin fareler üzerinde hedeflenen parçalanmaları sperm immotilitesi ve anormal derecede kısa flagel ile fibröz kılıf materyalinin, DFS fenotipini anımsatır şekilde bölgesel yığılmaları ile sonuçlanmıştır[48] (Eddy, kişisel ileti.)

Yakın zamanda, Bacetti ve arkaşları[19] beş DFS hastasından birinde AKAP4/AKAP3 bağlanma alanlarının delesyonu ve AKAP4 proteinin spermatoza da bulunmayışını rapor ettiler. Bu rapora göre AKAP4 ün olmayışı patojenikal olarak DFS fenotipine neden oluyor olabilir. DFS kimi farklı gen ürünlerinde ortaya çıkan alterasyonların neden olduğu birçok gen ile bağıntılı bir hastalık olabilir. Şu anda bu alanda yoğun çalışmalar devam etmektedir.

Diğer daha az rastlanan genetik kökenli aksonemal patolojiler, retinis pigmentosa[14-30] ya da albinism hastalarında yetersiz solunum yolları siliası ve sperm aksonemisini içermektedir. (yayımlanmamış kişisel gözlem.). Anormal şekilde uzun çıkıntılar ya da mitokondrial kılıfın olmayışı gibi spermin orta bölümünde görülen mitokondrial anomaliler oldukça nadir görülürler ve aynı zamanda astenozoospermi ile ilişkilidirler. (Şekiller 6.1h-k)[51]. En son araştırmalar, ürünleri oksidatif fosforilasyonda ve sperm motilitesi için gerekli olan ATP'nin üretilmesinde kullanılan spermatoza'nın mitokondrial genlerinde görülen çeşitli mutasyonları/delesyonları tanımlamıştır[52-53]. Şu ana kadar, bu anomalilerin yapısal bağıntıları bulunmamıştır.

ANORMAL BAŞ-BOYUN EKLENMESİ VE ASEFALİK SPERMATOZOA

Baş-boyun eklenme bölgesi ya da bağlantı parçası sentriollerin spermatid çekirdek ile etkileşiminden türemektedir. (Şekil 6.2c).

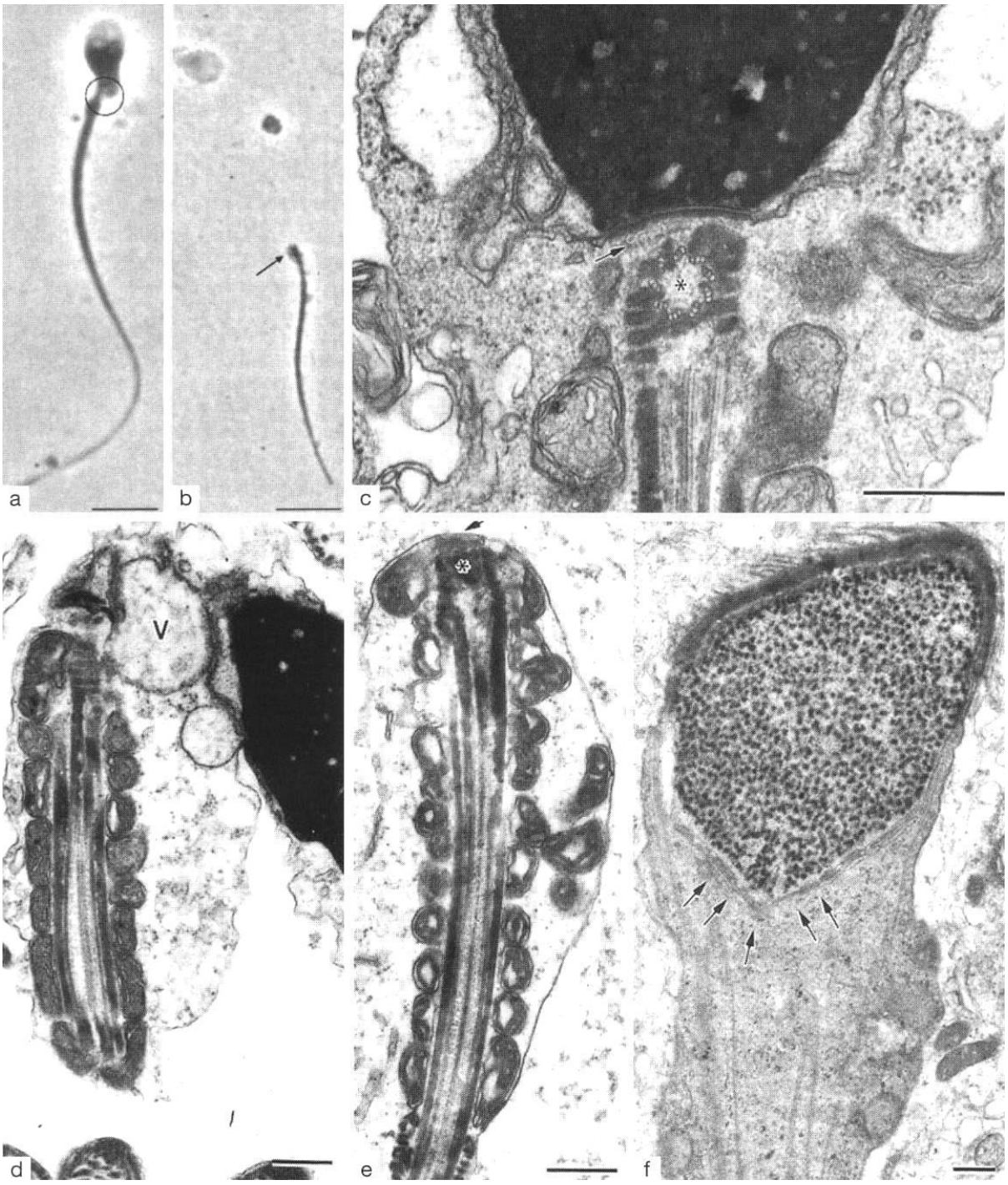
Spermiyogenesisin erken evrelerinde, sperm flagellumu sentriolar kompleksten büyür. Bu çekirdeği kaudal kutba yaklaştırır ve kuyruğun kafanın uzunlamasına eksenine lineer bir şekilde aynı hizada olmasını sağlar.

Başsız ('asefalik', "başı koparılmış", "toplu iğne başı"; Şekil 6.2b) ya da anormal bir baş-orta bölge ilişkisine sahip ("eksen dışı implantasyon"; Şekil 6.2a) spermatoza doğurtganlığa sahip erkeklerin menisinde de çok küçük sayılarda gözlemlenebilmektedir ve subfertil (doğurtganlık altı) hastalarda oranı %10-20'lere kadar çıkabilmektedir[36-54]. Bu durumlarda doğurtganlık açısından önemi net bir şekilde bilinmemektedir. Sperm popülasyonlarının %80-100'ü asefalik formda ve başsız ya da spermatozası kafaları ve kuyrukları aynı eksende olmayan kısır hastalar vardır. Bu formların her biri hakim durumda ya da farklı oranlarda birleşmiş durumda olabilir. Spesifik olarak tanımlanmış olmasalar da bu hastaların genellikle ağır teratozoospermi yaşadıkları düşünüldüğünden, eksik olarak tanımlanmış olsa da, bu sperm yetersizliği nadir olarak görülmektedir. Kimi yazarlar[53-57] menilerinde başsız flagelluma sahip olan hastaları rapor etmişlerdir ve daha yakın zamanda kimi diğer yazarlar [36,58-60] aile içinde de görülen 15 yeni olay bildirmiştir. "Toplu iğne başı" terimi bu alışılmadık görünümü tanımlamak için kullanılmaktadır ancak bu adlandırma, bu çok küçük "kafalarda" hiç bir çekirdeksel materyal olmadığı için kafa karışıklığı da yaratmaktadır. Asefalik formlar, biraz büyük olduklarında kafatası gibi görünen ancak hiçbir DNA içeriğine sahip olmayan küçük bir sitoplazmik damlacıkla son bulan başsız flagellum olarak görünür. (Şekil 6.2b ve e)[36]. Bir baş olduğunda, bu ya orta bölümün ucuna ya da kenarlarına lineer olarak sperm ekseninde aynı seviyeye gelmeksizin eklenir (Şekil 6.2a ve d).

Bu seviye farklılığı tamamen bağıntısızlıktan çekirdeğin 90-180° açıyla yanlara konumlanmasına kadar değişir. Bu hastalara uygulanan az sayıdaki testis biyopsisi çalışmalarından elde edilen verilere göre, bu yetersizliğin tüm formlarında sonuç sperm sentriolünün olgunlaşmakta olan spermatid çekirdeğinin kaudal kutbuna normal şekilde eklenememesidir. (Şekil 6.2f)[61,62]. Bu değişkenler asefalik formlarda olup, en uç durumları gösteren baş-boyun birleşmelerinde değişik derecelerdeki anomaliyi göstermektedir ve böylelikle baş-boyun birleşiminde alterasyon en kapsayıcı isimlendirme olmaktadır [59,62,63]. Baş ile orta bölüm arasındaki ilişkinin daha gevşek olduğu durumlarda, bu birleşmenin artan kırılganlığı asefalik formların ortaya çıkmasına ve başın yok olmasına neden olmaktadır [59,64]. Sonuncusu testislerde fagositozlanır ve menideki sıklığı başsız flagellumdan daha azdır.

Uniformal patolojik fenotipe sahip olması, spermiogenesisi esnasında oluşan sistematik alterasyonun bir sonucundan kaynaklanması, seminal özelliklerin klinik değerlendirme esnasında, hatta, bir farmakolojik tohum boşaltma ya da repopülasyonuna neden olması halinde bile sabit kalması ve aile içinde görülme sıklığı bu durumun genetik bir kökenden kaynaklanıyor olması gerektiğini göstermektedir[59,60].

Normal bir baş-orta bölüm bağlantısı sağlayabilmek için ihtiyaç duyulan spermatid sentriole migrasyon ve biçimlenmenin ardından spermde gözlemlenen anomaliler, singami ve bu spermatoza'nın bovine ve insan oositine mikro enjekte edilmesinde ortaya çıkan embriyo klivajı spermde bir sentriolar disfonksiyon (bunun doğası halen bir bilinmezdir) olduğuna işaret etmektedir. Sentrin, perisentrin, y-tubulin ve MPM-2 gibi proteinler sperm bağlantı parçasında ve zigot sentrozomunda bulunmuştur ancak bunların bu sendromun patogenesisi üzerindeki (olası) önemlerini ortaya koyabilecek çalışmalar mümkün değildir[63,65]. Genin eksonlarının karşılarına speriolin (spermin boyun kısmında bulunan başka bir protein) için dizilmesi bu sendromu taşıyan iki hastaya gerçekleştirilen uygulamalarda herhangi bir anomali ortaya çıkarmamıştır. (Eddy, kişisel iletişim).



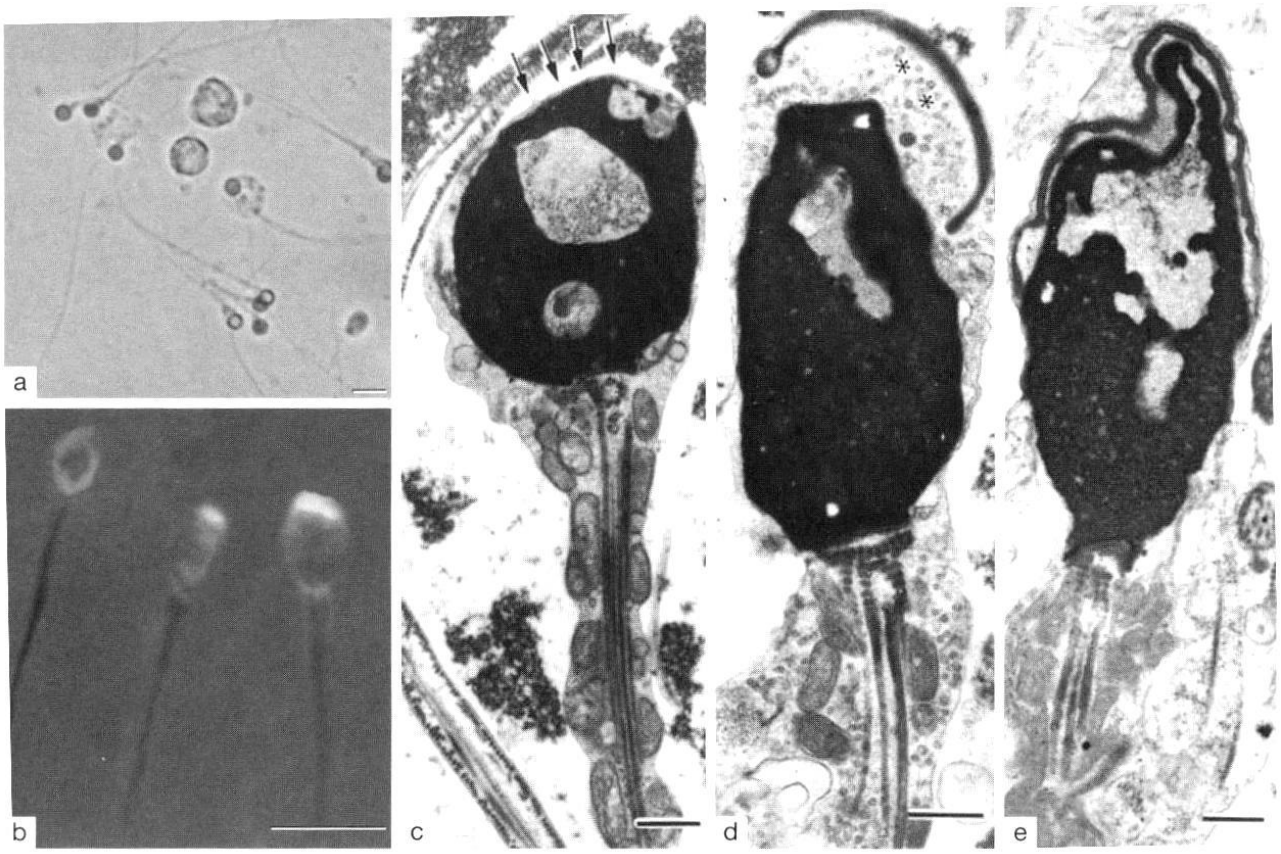
Şekil 6.2: *Bağlantı parçasında anomaliler (baş-kuyruk birleşimi). (a) görünümünde baş ve kuyruk aynı eksen üzerinde aynı seviyede yer almamaktadırlar (kuyruk un eksen dışı implemantasyonu), (b) çok küçük bir biçimde kalınlaşan asefalik spermatozoon. (ok), (c) bağlantı parçasının normal konfigürasyonu. Kuyruk içbükey implemantasyon çukuruna yerleşmiştir. (ok). Proksimal sentriol'ün (yıldız) tripletlerine ve aksonem'in başlangıcına dikkat ediniz. (d) Baş ve orta bölüm düzgün şekilde eklemlenmemiştir ve bir kabarcığımsı yapı (V) onları birbirlerinden ayırmaktadır. (e)Asefalik spermatozoon. Plazma membranı (ok) bağlantı parçasını (yıldız) kapsamaktadır. Orta bölümün yapısı uygun durumdadır. Testis biyopsisinde uzanmakta olan spermatid. Kuyruk anlajenin çekirdeğin kaudal kutba eklemlenmemesine dikkat ediniz. (oklar). Barlar = 5 um (a, b), 0.5 um (c-f). (a) ve (b) panelleri ilk olarak 62 numaralı referansta ve (c ve f) panelleri de 59 numaralı referansta yayınlanmıştır. Telif hakları Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Vakfına aittir. Oxford Üniversitesi Yayınları / İnsan Üremesi bölümünün izniyle basılmıştır.*

Üremenin ardından sperm sentriolünün tahliyesi muhtemelen insan spermatozasının boyun bölgesinde bulunan sperm protezomlarının hareketini de içermektedir[66,67]. Zigottaki protezomların deney amaçlı nötralizasyonu da defektif sperm-azalmasına ve pronükleer formasyona yol açmıştır[67]. Yakın zamanda, baş-orta bölüm kusurlarına sahip hastaların sperm protezomlarında defektif enzim aktivitesi rapor edilmiştir[68]. Şu anda, sperm patolojisinin bu heyecan uyandıran alanında bir araştırma yürütmekteyiz.

SPERM BAŞI PATOLOJİSİ: AKROZOM VE KROMATİN ANOMALİLERİ

Sperm akrozomu, spermatidlerin Golgi kompleksinden türeyen bir organeldir. Sperm başı anteriörünün üçte ikisini kaplayan yassı bir keseden oluşmaktadır ve hidrolitik enzimler bakımından zengin, yoğun bir içerikle dolu bir boşluğu sınırlayan (iç ve dış akrozomal membran adı verilen) iki membran tarafından biçimlendirilmiştir.

Akrozomun yetersiz gelişmesi ya da hiç gelişmemiş olması kısırlığa yol açan spesifik sperm noksanlığıdır. İki tanımlanmış sendromun özelliklerini belirler; akrozomsuz spermotoza ve akrozomal hipoplazi.



Şekil 6.3: *Akrozom ve kromatin anomalileri (a) Bir globozoospermi hastasından alınan spermatoza'nın ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. Kafalar karakteristik olarak küresel bir biçimdedir. (b) Patolojik akrozomlu sperm kafalarının detaylı görüntülenmesi. Immunolabeling (İmmün Etiketleme), antiakrosin antibadi akrozomda fluorosans göstermektedir. Değişken hipoplazilerin eksikliği(sol) (iki sağ spermatoza) oldukça net biçimde görülebilmektedir. (c) akrozom eksikliği çeken yuvarlak kafalı soermatozom (oklar). Ayrıca kromatinin laküner yetersizliği de bulunmaktadır. (d) Akrosomal hipoplasi, küçük ve ayrılmış akrozom. (yıldız). (e) kabaca biçimi bozulmuş amorf bir kafanın kromatininde ağır laküner yetersizlik.*

Barlar = 5 um (a, b), 0.5 um (c-e)

Spermotoza'nın akrozomsuz olması genellikle kendini küre biçimli baş görüntüsüyle gösterir. Bu da bu sendroma adını verir; "globozoospermi" ya da "yuvarlak-kafalı akrozomsuz spermotoza". Doğurtganlığa sahip bireylerin menisinde küçük oranlarda (yaklaşık olarak %0,5) görülebilmektedir. Bu oran, kısırlık akalarında %2-3'e kadar çıkabilmektedir[69]. Globozoospermi adı bu durumun spermotozanın büyük çoğunluğu üzerinde etkin olması (dışarı boşaltılan spermotoza'nın %100'üne kadar ulaşabilmektedir.) halinde verilen addır. Etkilenmiş spermotozada ayrık akrozomlar yoktur ya da akrozom formasyonunda çok küçük perinükleer yoğunluklar başarısız teşebbüsler haline gelebilir. (Şekil 6.3a ve c).

Akrozom olmaksızın spermatoza üretimi birden çok mekanizmayı harekete geçirir. Bir çok rapor bildirmektedir ki, Golgi kompleksi çekirdeğe girmekte başarısız olur ve düzensiz sekretuar aktiviteye sahip bir akrozom geliştirir. Bu yapı, olgunlaşmakta olan ve rezidüel sitoplazma ile birlikte spermiyasyon esnasında yok olacak olan spermatidlerin sitoplazması içinde serbest kalır. Bu durumda akrozomlar oluşmaktadır ancak çekirdeğe bağlı değildir[70-73]. Bazı diğer hastalarda, akrozom formasyonunda ciddi bir eksiklik ya da akrozomun tamamen olmaması sorunu vardır. Bu gibi durumlarda, spermatozon'un anteriör kutbunda gelişmemiş bir akrozom bulunabilir[71]. Bulunan bir özellik kromatinin olgunlaşmasını geciktirmektedir; sıklıkla hipodens bölgelerde tamamlanmamış sıkıştırmayla granül biçiminde görülür. Bu değişiklikler, histon-protemininin geçiş yapamaması ve DNA fragmentasyonunun oranlarının artmasıyla ortaya çıkarlar.

Akrozom eksikliğine, sperm başının biçiminin modellenmesi için gerekli olan bir sperm nükleer-perinükleer iskelet kompleksi halindeki sub-akrozomal bir yapı olan perinükleer tekanın, akrozomun çekirdeğe bağlanmasının ve sperm girişinin ardından oosit aktivasyonunun olmayışı eşlik eder [74-77]. Perinükleer tekanın bu anomalileri, muhtemelen küre biçimli sperm kafalarına, ayrık akrozomlara ve akrozomsuz spermatoza da yetersiz oosit aktivasyonuna moleküler temelde bir yanıt olarak gelişmektedir.

Globozoospermi, hasta erkeklerin ailelerinde de rapor edilmiştir ve tek ya da birden fazla gen kökeni olduğu iddia edilmiştir ancak kanıtlanamamıştır[43,72,78]. Benzeri özellikleri taşıyan birçok hayvan modeli de yakın zamanda tanımlanmıştır.

Akrozomal hipoplasi az anlaşılmış ve eksik tanımlanmış bir sperm patolojisidir. Bu patoloji Zamboni'ye göre[79], ağır teratozoospermi de sık görülen bir durumdur. Akrozomlar çok küçüktür ve sıklıkla amorf çekirdekle içerikten yoksundur. (Şekil 6.3b ve d). Chemes16 akrozomlarının olmayışı ya da akrozomal hipoplasileri hakim durumda ya da kombinasyon halinde olan 35 hasta rapor etmiştir. Bu hastaların sperm kafaları genellikle yuvarlak bazen de amorf ya da ovaldir. Teratozoospermi vakalarında akrozomal hipoplasi araştırılmalıdır ve akrozoma karşı reaksiyon geliştiren çeşitli antibadilerin kullanımı ya da bozulmamış spermatozaya lektin eklenerek elektron mikroskobu[80] altında kolayca tanımlanabilir. Spermatozanın katı kriterlerle sınıflandırılmasında bu anomaliler zayıf doğurtganlık prognosisine sahip ağır amorf çeşitlerine eklenmektedir[5.]

Kısır erkeklerde akrozomal yetersizliklerin diğer formları da rapor edilmiştir. Akrozom reaksiyonunun Prematüre olarak ortaya çıkması ve/ya geçirmedeki başarısızlığı tanımlanmış anomalilerdir[81]. Daha az rastlanılan ve özellikleri tam olarak ortaya konmamış akrozom yetersizlikleri ise "krater kusuru"[82] ve akrozomal enklüzyonlarıdır[80]. Her iki durumda da spermatozanın oositleri normal olarak dışarı boşaltamamasından dolayı doğurtganlık özelliği ortadan kalkar.

Olgunlaşmakta olan spermatidlerin kromatinleri çerkirdeğin yapısında yansıyan kimyasal ve makro moleküler değişimlerden muzdarip olurlar. Genç yuvarlak spermatidler dağılmış kromatinli ökromatik çekirdeklere sahiptir. Olgunlaşma esnasında, kromatin, yalnızca küçük (0,1-0,2 mm) hipodenslerde temiz alanların anlaşılabildiği yoğun ve homojen bir yapı kazanabilmek için bir birine yaklaşarak genişlemekte olan ayrık granüllerin yapısını aşamalı olarak yoğunlaştırır. Aşamalı olgunlaşmanın bu işlemi, somatik hücrelerde görülene benzer bir biçimde DNA ya eşlik eden nükleer histonların çok üst düzeyde sarılı olmalarına (supercolied) bağlıdır. Histonlar ilk olarak protein geçişleri ve ardından da DNA helezonunun oyuğu boyunca yan yana bulunan protaminlerle takas olarak kromatin fiberlerinin olgun spermatidlerin ve spermatozanın tipik yoğunlaştırılmış yapısını sıkıştırabilmelerine olanak sağlar [83-85]. Bu sıkıştırılmış durumdayken, kromatin granülleri bireysel olarak ayırt edilemez.

Kromatin olgunlaşması ve sıkıştırılması bozulduğunda, kromatinin sıkıştırılmış düzeninin granülofibrillerle yer değiştirdiği ya da çekirdeğin %20-50'sine kadar bir alanının "boş" alanlar tarafından işgal edildiği durumlarda spermatoza kafaları geniş (2-3 μm çaplı) laküner bozukluklar sergilemektedir. (şekil 6.3c-e)[79,86]. Bu durumlar, testis biyopsilerinde ve menide görülen olgunlaşmamış spermatidlerin de ortaya koyduğu gibi, spermiogenesisi anomalisinin bir sonucu olarak testiste temellenir. Kromatin anomalileri olan spermatoza sıklıkla anormal baş şekilleri gösterip azalmış doğurtganlık özelliğine ya da ilk üç aylık dönem düşüklerine neden olur[16]. Yetersiz kromatin yoğunlaşması, immaturite ve hücre içi lagünlerin üst-yapısal bağları olarak tek lifli DNA'lar, DNA kırılmaları, anormal histon-protamini geçişleri ya da apoptotik değişiklikler rapor edilmiştir.

Morfolojik olarak anomali gösteren spermatozanın genetik oluşumuna dair fazla bilgi bulunmamaktadır. Sperm anöploidi ile teratozoospermi arasında pozitif bir ilişki rapor edilmiştir ancak diğer çalışmalarda anormal hiçbir spermatozada artan sayısal kromozomal aberasyona rastlanmamıştır[87-89]. Meni kalitesi zayıf olan kısır erkekler üzerinde gerçekleştirilen yeni Flüoresans Hibridizasyonu (Recent fluorescence in situ hybridization-FISH) çalışmaları spermatozada anöploid seviyesinde, normal kan karyotipine rağmen bir artış olduğunu ortaya çıkarmıştır[90,91]. Bu durum anöploide yol açan faktör(ler)ün aynı zamanda teratozoospermiye de neden olduklarını ortaya koymaktadır.

Kromatin anomalilerinin edinilmiş mi yoksa genetik etiyolojiden mi kaynaklandıkları sorusu dikkat çekmektedir ancak günümüze kadar çözülebilmiş değildir. Enfeksiyöz bowel rahatsızlıkları çeken erkeklerin ve sulfasalazin uygulaması yapılan erkeklerin spermatozasında bu tip bir anomali görülebilir. Yinede bu anomalilerin patolojik prosesten mi yoksa uygulanan tedaviden mi ortaya çıktıkları bilinmemektedir. Aynı alterasyonlar varikosel, seminal enfeksiyon ve hatta testis tümörü hastalarında da görülebilir [92-95]. Bu son durumlarda, bu anomaliler diğer spesifik olmayan anomali tipleriyle karışmış olarak bulunmaktadırlar. Kromatin anomalisi görülen hastalardaki genetik etiyolojinin değerleri düzenli değildir. Histonların anormal çıkmalarını ve sperm hücrelerinden protein geçişlerini, P2 protaminin selektif eksikliğini ya da kısır bireylerin spermatozalarındaki nükleoproteinlerin bozuk oranlarını gösteren raporlar vardır ancak hiçbiri protamin genlerinde gelişi güzel mutasyonları belgelememiştir [93,95-99].

Diğer nükleer anomaliler, nükleer klivajda meitoik alterasyonlardan türeyen makronükleer ve multinükleer poliploid spermatozayı kapsamaktadır. Bu anomalide aile öyküsü rapor edilmiştir [100,102].

ANDROLOJİK KOŞULLAR VE ENDOJENÖZ YA DA ÇEVRESEL FAKTÖRLERE SEKONDER EDİNİLMİŞ SPERM ANORMALLİKLERİ

Spesifik olmayan anomaliler, astheno- ve teratozoospermik hastalarda en sık rastlanan bulgudur. Spesifik olmayan kuyruk anomalilerine asthenozoospermi patolojileri bölümünde değinilmiştir (bkz. önceki bölüm). Spesifik olmayan baş anomalileriyle bağlantılı olarak, bunlar akrozom, kromatin, baş sitoskeleti ve boyun bölgesinde çeşitli anomalilerin farklı oranlarda birarada varolduğu heterojen bir durum teşkil ederler. Bunların klinik androlojide ayrı ayrı ortaya konması spermatozoanın anormal görünümüne dayanır. Sperm morfolojisine ilişkin, katı ölçütlere dayalı olanlar da dahil olmak üzere, mevcut tüm sınıflandırmaların, temelini bunlar oluşturur. Bu sınıflandırmalar kuşkusuz verili bir meni numunesindeki üreme potansiyelinin öngörülmesinde önemli bir uygulama alanına sahiptir. Ancak, Kruger tarafından sunulan sınıflandırmada[4,5] dikkate alınan akrosom anomalileri haricinde, çoğu baş alterasyonu, kökenlerinde yatan morfogenetik mekanizmalara ilişkin patolojilere ilişkin bilgi sunmayan dış görünüşlerine gore sınıflandırılır. Kromatin olgunlaşması ve sıkışmasındaki alterasyonlar ve akrosomun yetersiz gelişimi ye da kofullanması biçimsiz sperm kafalarında sıkça rastlanan bulgulardır. Bunların şu durumlarla ilişkilendirildiği görülmektedir: inflamatuvar bağırsak hastalıkları[80], varikosel[103], alkilleştirilmiş imino şekerler ya da pestisitlere temas[104,105], yakıt, yağ, organik çözücüler, egzos dumanı ya da hidrokarbonlara maruz kalma[106], sigara içiciliği[107], iyonlaştırıcı radyasyon[108,109] ya da fizyolojik sıcaklığın üstünde sıcaklığa maruz kalma[110].

Belirli tip alterasyonları spesifik etiyolojilerle (örn. Konik formları varikoselle[1]) ilişkilendirme girişimleri olmuş olsa da, bu onaylanmış değildir ve bunların spesifik olmayan doğaları şu anda kabul edilmektedir.

SPERM PATOLOJİSİ VE ÜREME PROGNOZU: KISIR ERKEKLER ÜZERİNE ÇALIŞMALARDA SPERM PATOLOJİSİNİN ÖNEMİ

ICSI sonuçlarının çoğu sperm parametresinden bağımsız olduğu öne sürülmüştür, ancak son kanıtlar tersi bir duruma işaret etmektedir. Teratozoospermi sadece morfolojik bir anormallik olarak değil, aynı zamanda sperm fonksiyonunda buna karşılık gelişen azalma olarak da anlaşılmalıdır. Morfoloji değerleriyle örtüşecek şekilde, daha yüksek, eşiğin %4 üzerinde gebelik oranları raporlanmıştır[5] ve çeşitli raporlarda normal akrozom ve kromatin yapısının, baş-boyun birleşiminin ve sentrozomların yeterli döllenme ve gebelik için önemi üzerinde durulmuştur[16,62,111,,114]. Anormal morfolojinin ICSI sonuçlarını etkilemediği iddia edilmiştir[115,116] ancak, çalışmadaki tam kısırlık teşhisi konan 15 hastadan 10'unda, düzgün morfoloji %2'nin altındadır ve çalışmanın yazarları tarafından, döllenme yokluğu görülen 6 hastada akrosomsuz spermatozoa saptanmıştır[115,116]. Sonuç olarak, birçok çalışma göstermektedir ki, ilişkili patolojilerin yapısına bağlı olarak, ART sonuçlarında dramatik değişimler görülebilmektedir. Son dönemlerde ICSI'nin bulunması, spermatozoanın döllenmeyi sağlayan yapısal ve işlevsel özelliklerine ulaşılmasını sağlamıştır. Bu bilgi sperm kalitesi ile üreme sonuçları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için kullanılabilir ve böylece üremede, erken embriyonik gelişimde ve implantasyonda sperm bileşenlerinin oynadıkları farklılaşmış rollere ilişkin daha objektif bir tablo ortaya çıkmaktadır.

Asthenozoospermi: Kuyruk patolojileri ve üreme prognozu

Daha önce asthenozoosperminin hücrealtı temellerine değinilirken belirtildiği gibi, spesifik olmayan kamçısal anomalilerdeki (NSFA'lardaki) artan oranlar, motilite bozukluğu çeken 201 erkeğin 70%'inde rahatsızlığın altında yatan sebebi oluşturuyordu. (hızlı ilerleme %3.6)[10].

Genetik kökenli astenozoospermiye sahip hastalarda (hızlı ilerleme %0.2), primer silyer diskinezi ve lifli kılıfta displezi (PCD ve DFS) gibi spesifik sperm fenotipleri tüm spermatozoada mevcuttur[12]. Bu erkeklerdeki uzun vadeli çalışmalar göstermiştir ki NSFAlara sahip hastaların %33'ü teşhisi izleyen 2-6 yıl içerisinde kendiliğinden ya da IVF de dahil olmak üzere (ancak ICSI hariç) ART kullanımıyla döllenme ya da gebelik sağlayabilmiş, ancak DFS'ye sahip hastalrın %0'ı bu sonuca ulaşabilmiştir. Bu bulgular göstermiştir ki NSFA vakalarının üçte biri geri döndürülebilirdir ve kaydadeğer üreme sonuçları elde edilebilmektedir; ancak DFS, literatürdeki başka olumsuz sonuçların yokluğunun da gösterdiği gibi, geleneksel üreme tedavilerine yanıt vermemektedir. Kay ve Irvine imzalı bir yayında[117] primer siliyer diskineziye sahip bir hastadan alınan ileri hareket kabiliyeti olmayan spermden IVF yoluyla doğum sağlandığı rapor edilmiştir. %100 hareketsiz sperm sözkonusu olduğunda, tam astenozoospermi ile necrozoospermiyi eşitleme gibi yanıltıcı bir eğilim varlığını sürmektedir. Bu eğilim, hareketsiz (ama canlı) sperm ile ölü spermin birbirinden çok farklı olan üreme potansiyellerinin gereksiz yere birbiriyle karıştırılmasına sebep olmaktadır. Başka kaynaklar ise hareketsiz spermatozoa ile zayıf ICSI sonuçları alındığını, ama veriler dikkatli incelendiğinde bu "hareketsiz" popülasyonda hayatta kalma yeteneğinin her zaman %10'un altında olduğununun görüldüğünü; bunun ise yazarlar tarafından belirtildiği gibi, zayıf sonuçların büyük ihtimalle ölü spermatozoa'nın (canlı ama hareketsiz değil) enjekte edilmiş olduğuna işaret ettiğini ortaya koymaktadır[u5,us]. ICSI, genetik astenozoospermiye sahip erkekler için büyük fayda sağlamıştır. Gerçekten de, şimdilerde hareketsiz ana calı spermatozoa kullanrak elde edilen gebelikler raporlayan çok sayıda kaynak bulunmaktadır[118-121]. Ölü spermlerle tümüyle hareketsiz ama canlı spermler arasında ayrım yapmanın güçlüğü hipo-ozmotik şişrme testi, pentoksifilin ile hareket uyarımı ya da testiküler spermatozoanın yeniden kazanımı gibi çeşitli yöntemlerle aşılmıştır[122,125].

Son dönemlerde PCD'ye sahip 11 hasta ve DFS'ye sahip 12 hastaya ilişkin çok sayıda ICSI sonucunu incelemiş bulunmaktayız [126]. Döllenme %55-70 oranlarındadır ve çok sayıda gebelik elde edilmiş, 21 canlı doğuma ulaşılmıştır. Düşük oranı %20'dir (15 hamilelikte 3 adet). Bu teşvik edici sonuçlar, erkekten kaynaklanan şiddetli vakalara ilişkin bu alt popülasyonda hareketli ya da canlı ama hareketsiz spermatozoanın *in situ* mikroenjeksiyonu yoluyla iyi sonuçlar beklenebileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, sperm hareketsizliğine neden olan kamçısal patolojiler, sperm canlılığı etkilemediği sürece ICSI sonuçlarına gölge düşürmemektedir.

Daha önce de belirtildiği gibi, DFS ve PCD genetic durumlardır, ve bu anomalilerin yeni nesle (muhtemel) aktarımıyla ilgili kaygılar bulunmaktadır. Vakaların sayısı sınırlı olsa da, yenidoğanlarda

(PCD ve bazı DFS'lerde sık görülen bir bulgu olan) solunum hastalığı raporlanmamıştır. Üreme potansiyeli sorusu, çocukların üreme çağına gelmesine dek, daha birkaç yıllığına çözümsüz kalmayı sürdürecektir. Anne-baba adayları konuyla ilgili risklerden haberdar edilmelidir ancak ilgili genler ve bunların yeni nesle taşınma mekanizması tanımlanana dek genetik danışmanlık mümkün olmayacaktır. Bilgilendirme sonucunda rıza gösterilmiş olması elzemdir.

Hasta erkekler, Y-kromozomunda mikro-silinmelere sahip olup bu kusuru erkek çocuklarına kesinlikle geçirecek olan bireylerde olduğu gibi, üreme bozukluğu tek kaygı olduğu durumda riski kabul etme eğilimi göstermektedirler.

Bağlantı kısmındaki anormallikler durumunda üreme potansiyeli

Daha önce de dediğimiz gibi, sperm anomalileri sözkonusu olduğunda üreme sonuçları dramatik olarak değişmektedir. Bu, bağlantı kısmındaki anomalilerle ortaya konmaktadır; ki kamçısal patolojiler ile ilgili alınan görece iyi sonuçlara karşıt olarak ICSI yoluyla zayıf bir üreme prognozu göstermektedir.

Bağlantı kısmının anomalileri heterojen fenotipik göstergelere sahiptir. Bu hastaların bazılarında, menide görülen tek form kafasız spermatozoadır, bu ise döllenme girişimlerini tümüyle imkansız kılmaktadır. Başka hastalarda ise kafasız formlar daha düşük sayıda olup baş-orta kısım arası uyumda anormallikler taşıyan spermatozoa baskındır. Bu son grup hastalarda çok sayıda yeni ICSI prosedürü rapor edilmiştir. Chemes *et al*[59] baş-orta parça birleşiminde hatalı hizalanma olan spermatozoa ile yapılan ICSI'nin başarısız sonuçlarını ortaya koyan ilk rapora imza atmıştır. Dört metafaz II oositler ICSI yoluyla döllenmiş ancak pronükleer aşamada kalmış, ve singami ve bölümlenme aşamalarına giremedikten sonar dejenere olmuştur. Bundan kısa sure sonre benzer nitelikte iki başarısız girişim (Saias-Magnan *et al.*[127], bir hasta, 1 döngü; Rawe *et al.*[62], bir hasta, 5 döngü), gebelikle sonuçlanan ve canlı doğuma ulaşan iki girişim (Porcu *et al.*[63], iki hasta, beş döngü, iki gebelik; Kamal *et al.*[64], 16 hasta, üç gebelik) ve bizim hastalarımızın birinde bir başarlı girişim daha olmuştur (kişisel rapor edilmemiş bilgi). Özetle, mevcut beş rapordan anlaşıldığı üzere,[26] döngüden dört canlı doğum ve çok sayıda alıkonmuş ya da dejenere olmuş embriyo ortaya çıkmıştır. Bu farklı gelişimlerin enjeksiyon için "'doğru" spermatozoaların seçilip seçilmemiş olmasıyla ilgisi sorgulanabilir. Hastalarımızın birinde durum bunla ilgili gibi görünmekteydi. (beş başarısız ICSI girişimi), zira sperm seçim ölçütleri son derece katı tutularak "en iyi" spermatozoa mikro-enjekte edildiğinde iki kimyasal gebelik elde edilebilmişti. Ancak, Porcu *et al.* tarafından raporlanan iki gebelik[63] tersini göstermektedir, çünkü ICSI için kullanılan spermatozoanın yayında belirtilen morfolojisine göre baş-orta parça arası birleşimdeki ciddi bir hiza bozukluğuna dayanan önemli bir anormallik bulunmaktadır.

Akrozom ve kromatin anormalliklerinde erkeklerdeki üreme sonuçları

Akrozomsuz spermatozoaya sahip hastalar kısırdır çünkü spermatozoaları, fizyolojik olarak oositi çevreleyen cumulus oosphorus'un içine işlemeye ve zona pellucida'ya işleyerek bağlanmaya yarayan akrozomlardan yoksun olduğu için oositlere penetre edemez[128]. ICSI metodu kullanılmaya başladıktan sonra, mikroenjeksiyon döllenmeden önceki tüm penetrasyon aşamalarını baypas ettiği için, globozoospermiye ideal bir çözüm sunacağı hipotezi ortaya atıldı.

Akrozomsuz spermatozoa ile yapılan ICSI deneyleri durumun tam olarak böyle olmadığını göstermiştir. Pek çok örnekte döllenme elde edildiği halde, biçoğunda da başarısız olunması, bu spermatozoaların penetrasyon sorunları dışında başka kusurlar da taşıyor olabileceğine işaret etmiştir. Akrozomsuz spermatozoa ile yapılan dokuz vakada başarısız ICSI girişimleri Bourne *etal.*[m], Liu *et al*[16], Battaglia *et al.*[130] ve Edirishinge *et al.* tarafından rapor edilmiştir. Kısa zamanda anlaşılmıştır ki başarısız vakalardaki anormallik muhtemelen oositin yetersiz aktivasyonuna, spermatozoanın perinükleer tekasıyla son zamanlarda ilişkilendirilmiş olan bir işleve bağlıdır. Gerçekten de, akrozomsuz spermatozoanın perinükleer tekasında alterasyonlar bulunmaktadır ve aynı zamanda bu yapıyla ilgili pek çok protein eksiktir. (bkz. önceki bölümler). Rybouchkin *et al*[32] ve Kim *et al.*[133], akrozomsuz spermatozoa ile ulaştıkları başarılı gebeliklerde oositleri Ca^{2+} ionoforu ile active etmişlerdir. Ancak, yapay yolla indüklenmiş olan oosit aktivasyonu her zaman gebelikle sonuçlanmamaktadır[130]. Kromatin anomalileri genellikle akrozom eksikliğinden kaynaklandığından, bunların döllenme üzerindeki olumsuz

etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. Bu olumsuzlukların yanında, akrozomsuz spermatozoa ile yapılan ICSI başarılı girişimlerine dair de çeşitli raporlar bulunmaktadır, ancak döllenme oranları düşüktür (%10-50)[134,139]. Bu sonuçlar göstermektedir ki insana ait akrozomsuz spermatozoa, insan ya da hamster oositlerini dölleyebilme yeteneğine sahip olsa da ve çok sayıda çiftte gebelikler elde edilebilse de, bu anormallikler başarısız ya da sayıca düşük gebelik oranlarından ya da yapay aktivasyona duyulan gereksinimden sorumludur.

Spermiyojenez sırasında kromatinin geçirdiği olgunlaşma değişiklikleri, dölleme kapasitesi için temel bir bileşendir. Biçimsiz, uzamış ya da yuvarlak başlara sahip spermatozoadan dört kat fazla kromozom anormalliği kaynaklandığı ortaya konmuştur[87]. (Hatalı olarak nükleer koful olarak adlandırılan) büyük, intranükleer, hipo-yoğun bölgeler, DNA'nın kendisinin ya da ilişkili proteinlerin yapısal anormallikler gösterdiği alanları teşkil eder. DNA kopmaları, tek iplikli DNA, değişken büyüklükte silinmeler ve başka alterasyonlar sperm kalitesini, döllenmeyi, embriyo gelişimini ve implantasyonu ciddi ölçüde etkiler. Bu hastalarda kısırlık ya da ilk üç trimester boyunca yapılan düşükler gözlenmiştir[6,79,80,140]. Benzer sonuçlar, kromatin anormalliklerine sahip olan ya da olmayan azoospermik erkeklere ait 21 testiküler sperm ekstaksiyon (TESA)-ICSI döngülerine dair sonuçları karşılaştıran Francavilla *ei al.*[141] tarafından da rapor edilmiştir. Döllenme oranı her grupta benzer olmasına karşın, kromatin anormalliklerine sahip olan erkeklerde döngü başına düşen ulaşma oranının önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Başkaları da, poliploid olduğu ortaya konan büyükkafalı çokkuyruklu (megalohead multitailed) spermatozoaya sahip 17 erkeğe ilişkin bir çalışmada normal döllenme oranları ve düşük gebelik oranları rapor etmiştir[142]. ICSI için hareketli spermatozoanın çok yüksek çözünürlüklü ışık mikroskobu altında özenle seçilmesi, normal spermatozoa ile (anormal kromatin bileşimi kastedilerek) "nükleer kofullu" denen spermatozoa arasında gebelik oranları ve implantasyonda dramatik farklar doğurmaktadır. DNA parçalanmasının ICSI sonuçları üzerindeki olumsuz etkisi, Greco *ei al.*[144] tarafından yüksek DNA parçalanmasına sahip erkeklerde, (düşük DNA hasarı taşıyan) testiküler spermatozoa ve (yüksek DNA hasarı taşıdığı görülen) boşalma ile dışarı atılmış spermatozoa karşılaştırılarak rapor edilmiştir.

SONUÇLAR

Sperm patolojisi, spermatozoadaki yapısal ve işlevsel eksiklikleri tanımlayan bir disiplindir. Anormal sperm morfolojisine verilen bir diğer ad değildir; daha ziyade, sperm anormalliklerinin ve anormal sperm görünümünün altında yatan patojenik mekanizmaların kesin bir tanıma kavuşturulmasında çok displinli bir yaklaşıma başvuran yeni bir kavramdır. Klasik sperm morfolojisi (özellikle de katı ölçütler) ile birlikte kullanıldığında, anormal sperm biçimlerinin neyden kaynaklandığına ilişkin net bir kavrayış sunmaktadır ve anormal spermatozoanın desteklenmiş döllenmede kullanımında rasyonel bir yaklaşım sunmaktadır. Spesifik olmayan anomaliler ve genetik kökene dayalı sistematik kurular arasındaki ayrım önemlidir ve ICSI'ye başvuran çiftler böylesi durumlarda sadece üreme şansları olmadığı hakkında değil, aynı zamanda çocuklarına hastalığı aktarma risklerinden de haberdar olma hakkına sahiptir. Mümkün olduğu ölçüde, genetik danışmanlık önemlidir ve yenidoğanların gözetim altında tutulması da faydalı olacaktır. Ancak, mevcut belirsizlikler altında, özellikle de kesinleştirilebilmiş sonuçlar elde edilemediği durumlarda hastaları aşırı bilgilendirmeden korumaya da dikkat edilmelidir.

Bir diğer önemli husus da, daha önce Chemes ve Rawe[126] tarafından da belirtildiği gibi doğru adlandırma kullanılmasıdır. Biz her patolojik fenotipi patojenik mekanizmalarda rol oynayan organellerle ilişkili bir adlandırma altında incelemeye çalıştık. Adlandırma konusu önemsiz bir mesele değildir: konuşma ve yazma biçimimiz düşünüşümüzü belirler. Eğer betimleyici terimler kullanılırsa, düşünceler de görünümlerin ötesine geçemez. Ölü (hareketsiz) ile hareketsiz (canlı) spermatozoalar arasında ayrım yapmak ve her bir patolojinin temelini anlayabilmemizi sağlayan adlandırmalar kullanmak esastır. "güdük bir kuruk" bir DFS spermatozoasına ait olabileceği gibi yaşlananan bir spermatozoadaki kuyruk çözülmesine de işaret ediyor olabilir; "biçimsiz" (amorphous) bir baş akrozom eksikliğinin de anormal kromatin olgunlaşması ve sıkışmasının da sonucu olabilir.

ICSI gibi yenilikçi sağaltım yaklaşımları üreme tıbbı alanında devrim yaratmıştır. Ciddi erkek kaynaklı kısırlığa sahip erkekler için sağladığı açık faydaların yanında, sağaltıcı müdahalelerin etik ve sosyal rolü hakkında da yeni tartışmalara alan açmıştır. *Kalıtsal kısırlık* olasılığı, kuşkusuz çağımızın en kafa karıştırıcı paradokslarından biridir.

TEŞEKKÜRLER

Bu bölüm, içerdiği bilgilerin çoğu ile birlikte, önceki yayınımıza dayanmaktadır:

Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, charac terization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. Hum Reprod Update 2003; 9: 405. Bu bölümdeki şekiller 6.1a-d ve 6.3c-e aynı makaleden alınmıştır. Copyrights European Society of Human Reproduction and Embryology. Oxford University Human Reproduction'ın izniyle yeniden yayımlanmıştır.

Bu çalışma National Research Council (PIP 0900 ve 4584), ANPCyT (PICT 9591) ve CEGyR Foundation'ın bağışlarıyla desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. MacLeod J. The significance of deviations in human sperm morphology. In Rosenberg E, Paulsen AC, eds. The Human Tescis. New York: Plenum Press, 1970: 481
2. Kruger TF, et al. Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. FertilSteril 1995; 63: 134
3. Hofman GE, et al. Intraobserver, interobserver variation of sperm critical morphology: comparison of examiner and computer assisted analysis. Fertil Steril 1996; 65: 1021
4. Kruger TF, et al, Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilizationt Fertil Steril 1986; 46: 1118
5. Kruger TF, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 112
6. Gibbons IR. Structure and function of flagellar microtubules. In Brinkley BR, Porter KR, eds. International Cell Biology. New York: Rockefeller University Press, 1977: 348
7. Baccetti B, et al. Human dynein and sperm pathlogy. J Cell Biol 1981; 88: 102
8. Williamson RA, et al. Ultrastructural sperm tail defects associated with sperm immotility. Fertil Steril 1984; 41: 103
9. Ryder TA, et al. A survey of ukrastructural defects associated with absent or impaired human sperm motiliry. Fertil Steril 1990; 53: 556
10. Chemes H. The significance of flagellar pathology in the evaluation of asthenozoospermia. In Baccetti B, ed. Comparative Spcrmatology 20 years Later. Serono Symposia Publications 75. New York: Raven Press, 1991: 815
11. Wilton LJ, Temple-Smith PD, de Kretser DM. Quantitative ukrastructural analysis of sperm tails reveals flagellar defects associated with persistent asthenozoospermia. Hum Reprod 1992; 7: 510
12. Chemes H, et al. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum. Association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. Hum Reprod 1998; 13: 2521
13- Wilton LJ, et al. Structural heterogeneity of the axonemes of respiratory cilia and sperm flagella in normal men. J Clin Invest 1985; 75: 825
14. Hunter DG, Fishman GA, de Kretser FL. Abnormal axonemes in X-linked retinitis pigmentosa. Arch Ophtalmo! 1988; 106: 362
15. Afzelius BA. Immotile cilia syndrome and ciliary abnormalities induced by infection and injury. Annu Rev Respir Dis 1981; 124: 107
16. Chemes H. Phenorypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. J Androl 2000; 21:799

17. Afzelius BA, et al. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. J Cell Biol 1975; 66: 225
18. Pedersen H, Rebbe H. Absence of arms in the axoneme of immotile human spermatozoa. Biol Reprod 1975; 12: 541
19. Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. Science 1976; 193: 317
20. Afzelius BA, Eliasson R. Flagellar mutants in man: on the heterogeneity of the immotile cilia syndrome. J Ultrastr Res 1979; 69: 43
21. Camner P, et al. Relation between abnormalities of human sperm flagella and respiratory tract diseases. IntJ Androl 1979; 2: 211
22. Rossman CM, et al. The dyskinetic cilia syndrome: abnormal ciliary motility in association with abnormal ciliary ultrastructure. Chest 1981; 80: 860
23. Kartagener MI. Mitteilung: Bronchiektasien bei situs viscerum inversus. Beitr Klin Tuberk 1935; 83: 489
24. Schnceberger EE, et al. Heterogeneity of ciliary morphology in the immotile cilia syndrome in man. J Ultrastruct Res 1980; 73: 34
25. Afzelius BA. Genetical and ultrastructural aspects of the immotile-cilia syndrome. Am J Hum Genet 1981; 33: 852
26. Pennarun G, et al. Loss-of-function mutations in a human gene relaced to Chlamydomonas reinhardtii dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. Am] Hum Genet 1999; 65: 1508
27. Bloum JL, et al. Primary ciliary dyskinesia: a genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity. Eur J Hum Genet 2000; 8: 109
28. Guichard C, et al. Axonemal dynein intermediate-chain gene (DNAI1) mutations result in situs inversus and primary ciliary dyskinesia (Kartagener syndrome) . Am J Hum Genet 2001; 68: 1030
29. Bartoloni L, et al. Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:10282
30. Baccetti B. '9+0' immotile spermatozoa in an infertile man. Andrologia 1979; 11: 437
31. Baccetti B, Burrini AG, Pallini V. Spermatozoa and cilia lacking axoneme in an infertile man. Andrologia 1980; 12: 525
32. Sturges JM, et al. Cilia with defective radial spokes. A cause of human respiratory disease. N Engl J Med 1979; 300: 53
33. Sturges JM, Chao J, Turner JAP. Transposition of ciliary microtubules: another cause of impaired ciliary motility. N Engl J Med 1980; 303: 318
34. Walt H, et al. Mosaicism of dynein in spermatozoa and cilia and fibrous sheath aberrations in an infertile man. Andrologia 1983; 15: 295
35. Chemes H, Morero JL, Lavieri JC. Extreme asthenozoospermia and chronic respiratory disease. A new variant of the immotile cilia syndrome. Int J Androl 1990; 13:216,
36. Chemes HE, et al. Lack of a head in human spermatozoa from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization. Fertil Steril 1987; 47: 310
37- Rawe VY, et al. Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. Hum Reprod 2001; 16: 879
38. Rawe VY, et al. Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath. Hum Reprod 2002; 17:2119
39. Bisson JP, David G. Anomalies morphologiques du spermatozoide humain. 2) Etude ultrastructuralc. J Gynecol Obstet Biol Reprod 1975; 4: 37
40. Escalier D, David G. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and peri-axonemal anomalies. Biol Cell 1984; 50: 37
41. Chemes H, et al. Dysplasia of the fibrous sheath. An ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotilhy and primary sterility. Fertil Steril 1987; 48: 664
42. Baccetti B, et al. The short-tailed human spermatozoa, ultrastructural alterations and dynein absence. J Submicrosc Cytol 1975; 7: 349
43. Baccetti B, et al. Genetic sperm defects and consanguinity. Hum Reprod 2001; 16: 1365
44. Alexandre C, Bisson JP, David G. Asthenospermie totale avec anomalie ultrastructurale du flagelle chez deux freres steriles. J Gynecol Obstet Biol Reprod 1978; 7: 31
45. Bisson JP, Leonard C, David G. Caractere familialv de certaines perturbations morphologiques des spermatozoides. Arch Anat Cytol Pathol 1979; 27: 230
46. Carrera A, Gerton GL, Moss SB. The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. Dev Biol 1994; 165: 272
47. Turner RMO, et al. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. J Androl 2001; 22: 302
48. Miki K, et al. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. Dev Biol 2002; 248: 331
49. Baccetti B, et al. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. Hum Reprod 2005; 20: 2790
50. Bonneau D, et al. Usher syndrome type I associated with bronchiectasis and immotile nasal cilia in-two brothers. J Med Genet 1993; 30: 253
51. Rawe VY, et al. Abnormal organization of mitochondrial sheaths in two cases of severe asthenozoospermia. Int J Androl 2005; 28 (Suppl 1): 88
52. Holyoake AJ, et al. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondria! genome is associated with poor semen parameters in men. Int J Androl 2001; 243: 175

53. Thangaraj K, et al. Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility. J Androl 2003; 24: 388
54. Panidis D, et al. Headless spermatozoa in semen specimens from fertile and subfertile men. J Reprod Med 2001; 46: 947
55. Le Lannou D. Teratozoospermie consistant en. 1'absence de tete spermarique par defaut de connexion. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 1979; 8: 43
56. Perotti ME, Gloria M. Fine structure and morphogenesis of 'headless' human spermatozoa associated with infertility. Cell Biol Int Rep 1981; 5: 113
57. Baccetti B, Selmi MG, Soldani P. Morphogenesis of 'decapitated spermatozoa' in a man. J Reprod Fertil 1984; 70: 395
58. Holstein AF, Schill WB, Breucker H. Dissociated centriole development as a cause of spermatid malformation in a man. J Reprod Fertil 1986; 78: 719
59- Chemes HE, et al. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment. A human syndrome of genetic origin. Hum Reprod 1999; 14: 1811
60. Baccetti B, et al. Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. Gamete Res 1989; 23: 181 '
61. Perotti ME, Giarola A, Gioria M. Ultrastructutal study of the decapitated sperm defect in an infertile man. J Reprod Fertil 1981; 63: 543
62. Rawe VY, et al. A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. Hum Reprod 2002; 17: 2344
63. Porcu G, et al. Pregnancies after 1CSI using sperm with abnormal head-tail junction from two brothers: case report. Hum Reprod 2003; 18: 562
64. Kamal A, et al. Easily decapitated spermatozoa defect: a possible cause of unexplained infertility. Hum Reprod 1999; 14: 2791
65. Manandhar G, Schatten G. Centrosome reduction during rhesus spermiogenesis: gamma-tubulln, centrin, and centriole degeneration. Mol Reprod Dcv 2000; 56: 502
66. Wojcik C, et al. Proteasomes in human spermatozoa. Int J Androl 2000; 23: 169
67. Rawe VY. Proteasome function in mammalian fertilization: implications ferilization faileur in humans. Int J Androl 2005; 28 (Suppl 1): 13
68. Morales P, et al. Decreased proteasome enzymatic activity in sperm from patients with genetic abnormalities of the head-tail junction and acephalic spermatozoa. J Androl 2004; 25 (March-April Suppl): 41
69- Kalahanis J, et al. Round-headed spermatozoa in semen specimens from fertile and subfertile men. J Reprod Med 2002; 47: 489
70- Baccetti B, et al. Further observations on the morphogenesis of the round-headed human spermatozoa. Andrologia 1977; 9:255
71. Holstein AF, Schirren C. Classification of abnormalities in human spermatids based on recent advances in ultrastructure research on spermatid differentiation. In Fawcett DW, Bedford JM, eds. The Spermatozoon: Maturation, Motility, Surface Properties and Comparative Aspects. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1979: 341
72. Florke-Gerloff S, et al. Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. Andrologia 1984; 16: 187
73. Florke-Gerloff S, et al. On the teratogenesis of round-headed spermatozoa: investigations with antibodies against acrosin, an intraacrosomally located acrosin-inhibitor, and the outer acrosomal membrane. Andrologia 1985; 17: 126
74. Longo FJ, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perlnuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. J Cell Biol 1987; 105: 1105
75. Sutovsky P, et al. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. Dcv Biol 1997; 188:75
76. Sutovsky P, et al. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction Microsc Res Tech 2003; 61: 362
77. Oko R, et al. The sperm head cytoskeleton. In Robaire B, Chemes H, Morales C, eds. Andrology in the 21st Century. Englewood: Medimond Publishing Company, 2001: 37
78. Nistal M, Herruzo A, Sanchez Corral F. Teratozoospermia absoluta de presentacion familiar: cspermatozoides microcefalos irregularcs sin acrosoma. Andrologia 1978; 10: 234
79. Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. Fertil Steril 1987; 48: 711
80. Zamboni L. Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study. Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 325
81. Liu DY, Baker HW. Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. Hum Reprod 1994; 9: 1694
82. Baccetti B. et al. Crater defect in human spermatozoa. Gamete Res 1989; 22: 249
83. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell. Biol 1982; 93: 298
84. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod 1991; 44: 569
85. Brewer L, Corzett M, Balhorn R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. J Biol Chem 2002; 277: 38895

86. Holstein AF. Morphologische Studien an abnormen Spermatiden und Spermatozoen des Menschen. VirchowsArch 1975; 367: 93
87. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. Hum Reprod 1996; 11: 1942
88. Calogero AE,- et al. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. Hum Reprod 2001; 16: 1172
89. Kovanci E, et al. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. Hum Reprod 2001; 16: 1209
90. Lewis-Jones I, et al. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. Fertil Steril 2003; 1:212
91. Vicari E, et al. Absolute polymorphic teratozoospermia in patients with oligo-asthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. J Androl 2003; 4: 598
92. Hrudka F, Singh A. Sperrh nucleomalacia in men with inflammatory bowel disease. Arch Androl 1984; 13: 37
93. Schlicker M, et al. Disturbances of nuclear condensation in human spermatozoa: search for mutations in the genes for protamine 1, protamine 2 and transition protein 1. Hum Reprod 1994; 9: 2313
94. Evenson DP, et al. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. J Androl 2000; 21: 739
95. Tanaka H, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. Mol Hum Reprod 2003; 9: 69
96. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. Experientia 1988; 44: 52
97. Blanchard Y, Lescoat D, Le Lannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. Andrologia 1990; 22: 549
98. de Yebra L, et al. Complete selective absence of protamine P2 in humans. J Biol Chem 1993; 268: 10553
99. de Yebra L, et al. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. Fertil Steril 1998; 69: 755
100. Escalier D. Human spermatozoa with large heads and multiple flagella: a quantitative ultrastructural study of 6 cases. Biol Cell 1983; 48: 65
101. Benzacken B, et al. Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure. Hum Reprod 2001; 16: 2646
102. Devillard F, et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. Hum Reprod 2002; 17: 1292
103. Muratori M, et al. Functional and structural features of DNA-fragmented human sperm. J Androl 2000:21:903
104. Eljack AH, Hrudka F. Patterns and dynamics of teratospermia induced in rams by parenteral treatment with ethylene dibromide. J Ultrastruct Res 1979; 67: 124
105. Bustos-Obregon E, Diaz O, Sobarzo C. Parathion induces mouse germ cells apoptosis. Ital J Embryol 2001; 2: 199
106. Harrison KL. Semen parameter defects and toxin contact related occupation in infertility patients. Middle East Fertil Soc J 1998; 3: 3
107. Banerjee A, et al. Semen characteristics of tobacco users in India. Arch Androl 1993; 30: 35
108. Sailer BL, et al. Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. Environ Mol Mutagen 1995; 25: 23
109. Schevchenko VA, et al. Genetic effects of 1311 in reproductive cells of male mice. Mutat Res 1989; 226: 87
110. Mieusset R. Influence of lifestyle on male infertility: potential testicular heating factors. Middle East Fertil SocJ 1998; 3 (Suppl 1): 40
111. Tasdemir I, et al. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. Hum Reprod 1997; 12: 1214
112. Oehninger S, et al. Failure of fertilization in in vitro fertilization: the 'occult' male factor. J In Vitro Fert Embryo Transf 1988; 5: 181 - .
113. Nikolettos N, et al. Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. Hum Reprod 1999; 14: 47
114. Bartoov B, et al. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl 2002; 23: 1
115- Nagy ZP, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. Hum Reprod 1995; 10: 1123
116. Liu J, et al. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. Hum Reprod 1995; 10: 2630
117. Kay VJ, Irvine DS. Successful in-vitro fertilization pregnancy with spermatozoa from a patient with Kartagener's syndrome: case report. Hum Reprod 2000; 15: 135
118. Nijs M, et al. Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11:2180
119. Barros A, et al. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm recovered from the ejaculate. Fertil Steril 1997;67: 1091
120. Kahraman S, et al. A healthy birth after intracytoplasmic sperm injection by using immotile testicular spermatozoa in a case with totally immotile ejaculated spermatozoa before and after Percoll gradients. Hum Reprod 1997; 12: 292

121. von Zumbusch A, et al. Birth of healthy children after intracytoplasmic sperm injection in two couples with male Kartagener's syndrome. Fertil Steril 1998; 70: 643
122. Kahraman S, et al. Pregnancies achieved with testicular and ejaculated spermatozoa in combination with intracytoplasmic sperm injection in men with totally or initially immotile spermatozoa in the ejaculate. Hum Reprod 1996; 11: 1343
123. Ved S, et al. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection of immotile spermatozoa selected by the hypo-osmotic swelling-test: a case report. Andrologia 1997; 29: 241
124. Wang CW, et al. Pregnancy after intracytoplasmic injection of immotile spetm. A case report. J Reprod Med 1997; 42: 448
125. Terriou P, et al. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection.] Assist Reprod Genet 2000; 17: 194
126. Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. Hum Reprod Update 2003; 9: 405
127. Saias-Magnan J, et al. Failure of pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with decapitated spermatozoa: case report. Hum Reprod 1999; 14: 1989
128. Schmiady H, Radke E, Kentenich H. Round-headed spermatozoa - contraindication for IVF. Geburtshilfe Frauenheilkd 1992; 52: 301
129. Bourne H, et al. Normal fertilization and embryo development by intracytoplasmic sperm injection of round-headed acrosomeless sperm. Fertil Steril -1995; 63: 1329
] 30. Battaglia DE, et al. Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. Fertil Steril 1997; 68: 118
131. Edirisinghe WR, et al. Cytogenetic analysis of unfertilized oocytes following intracytoplasmic sperm injection using spermatozoa from globo-zoospermic man. Hum Reprod 1998; 13: 3094
132. Rybouchkin A, et al. Disintegration of chromosomes in dead sperm cells as revealed by injection into mouse oocytes. Hum Reprod 1997; 12: 1693
133. Kim ST, et al. Successful pregnancy and delivery from frozen-thawed embryos after intracytoplasmic sperm injection using round-headed spermatozoa and assisted oocyte activation in a globozoosperic patient with mosaic Down syndrome. Fertil Steril 2001;75:445
134. Lunding K, et al. Fertilization and pregnancy aftet intracytoplasmic microinjection of acrosomeless spermatozoa. Fertil Steril 1994; 62: 1266
135. Liu J, et al. Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. Hum Reprod 1995; 10: 626
136. Trokoudes KM, et al. Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1995; 10: 880
137. Stone S, et al. A normal livebirth after intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation: case report. Hum Reprod 2000; 15: 139
138. Nardo LG, et al. Ultrastructural features and ICSI treatment of severe teratozoospermia: report of two human cases of globozoospermia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002; 104: 40
139. Zeyneloglu HB, et al. Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletion after ICSI. Hum Reprod 2002; 17: 1833
140. Francavilla S, et al. Chromatin defects in normal and malformed human ejaculated and epididymal spermatozoa: a cytochemical ultrastructural study. J Reprod Fertil 1996; 106: 259
141. Francavilla S, et al. Ultrastructural analysis of chromatin defects in testicular spermatids in azoospermic men submitted to TESE-ICSI. Hum Reprod 2001; 16: 1440
142. Kahraman S, et al. Fertility of ejaculated and testicular megalohead spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1999; 14: 726
143- Bartoov B, et al. High power light microscope morphological examination as a tool for single sperm selection pryor IVF-ICS1. Int J Androl 2005; 28 (Suppl 1): 8
144. Greco E, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2005; 20: 226

7

Testiküler Disgenezis Sendromu: Biyolojik ve Klinik Önemi

Niels Jorgensen, Camilla Asklund, Katrine Bay, Niels E. Skakkebaek

Çeviri: *Sema Nur Ayyıldız*[*], *Ali Ayyıldız*[**]

GİRİŞ

Testiküler disgenezis sendromu (TDS)'nun testiküler kanser, hipospadias, inmemiş testis ve düşük sperm sayılarının fetal yaşamdaki genel orijinli hastalık komplekslerinin tüm semptomları olduğunu birkaç yıl önce ileri sürmüşlerdir[1] (Resim 7.1). TDS'nun etyolojisine ait bilgi halen oldukça sınırlıdır fakat çevre ve yaşam tarzı faktörleri katkıda bulunan ajanlar olarak ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, genetik polimorfizm ya da aberasyonlar, bazı kişileri özellikle bu şüpheli ekzojen ajanlarla karşı karşıya getirebilir. TDS' lu çoğu ciddi olgular bütün dört semptomu içerebilir, halbuki en az etkilenenlerde tamamen fertiliteyle birlikte sadece azalmış spermatogenezisi gösterebilir[1]. Sonuç olarak, TDS semptomlarının birisi ile tanısı konmuş kişinin diğer semptomlardan biri ya da daha fazlasını da barındırabileceği konusunda artmış risk altında olacağı göz önünde bulundurulmalıdır.

TESTİKÜLER DİSGENEZİS SENDROMUNUN PRENATAL ORİJİNİ

Hipospadias ve inmemiş testisin prenatal orijini kongenital doğası nedeniyle kanıtlanmıştır. Bununla beraber, testiküler kanserlerin daha ileriki yaşamlara kadar görülmemesi belki de en çok fetal orijinli olmasındandır. Keza, erkek semen kalitesinin potansiyeli de prenatal olarak tayin edilebilir.

Spermatogenezis

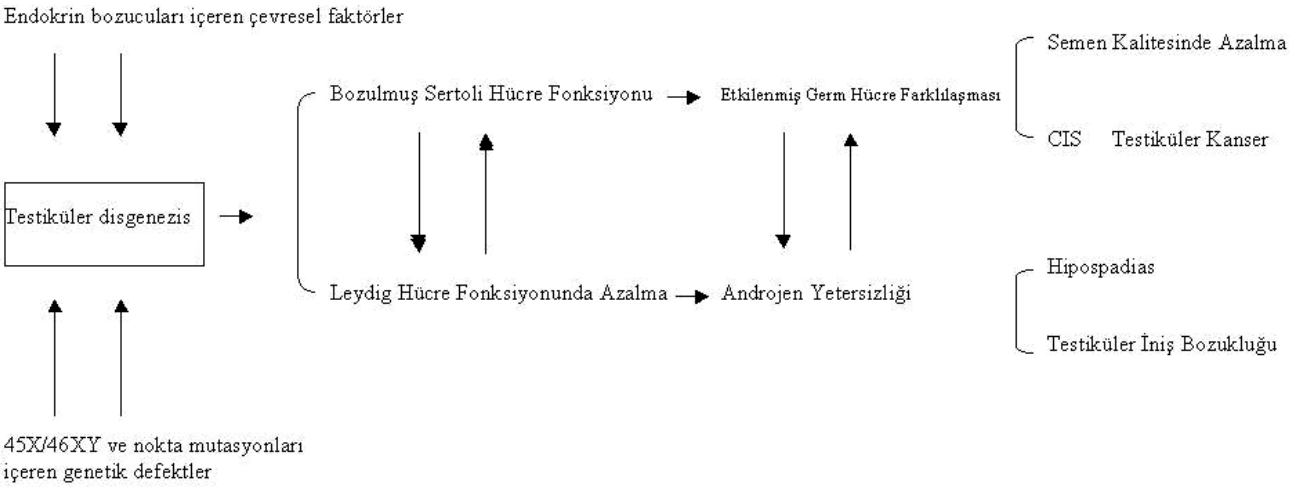
Fetal gelişimin 4. haftasının başlangıcında germ hücrelerin gonadal kabartıların çölomik epitelde sona ermesiyle mezenterin içine ve barsaklara doğru yolk sac yoluyla göç etmeye başlar[2]. İndifferent gonad üç hücre tipinden oluşur: germ hücreleri, erkek fetus sertoli hücrelerinin gelişmesini sağlayan destekleyici hücreler ve stromal hücreler. Gonadal farklılaşmanın ilk işareti sertoli hücrelerinin gelişmesi ve gelişimin 8. haftası süresince primitif seminifer kordlar içine yapışmalarıdır[3]. Bir yumurtadan ziyade testise gonadın farklılaşması, genetik olarak testiküler (sertoli) hücrelerince ifade edilen SRY genine (Y kromozomunun cinsiyeti belirleyici bölgesinin geni) bağlıdır[4]. Sertoli hücrelerinin çoğalmaları çoğunlukla fetal yaşam süresince meydana gelir ve sadece çok az bir kısım daha sonra oluşur[5]. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin sınırlı bir sayısını desteklerken adult yaşamda gelişme süresince erişebileceği en son sayıyla sonlanır[6,7]. Böylece fetal yaşam süresince sertoli hücrelerinin gelişimini ve fonksiyonunu etkileyen faktörler sertoli hücrelerinin sayısı esas olarak maksimum başarılabilir sperm

[*] Biyokimya ve Klinik Biyokimya Uzmanı, Özel Akropol Tıp Merkezi, Ankara.
[**] SB Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Üroloji Kliniği, Ankara.

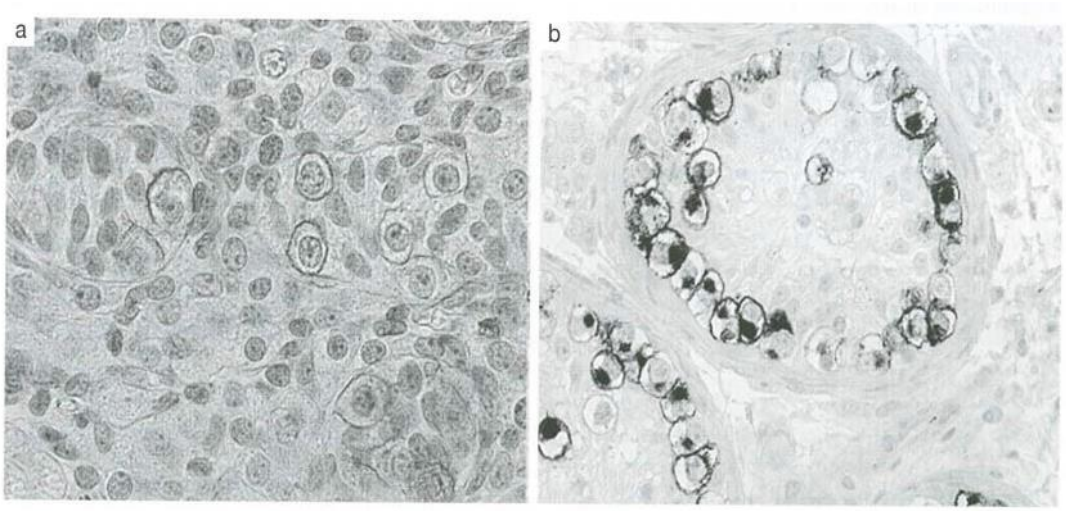
çıkışını tayin ederken bir erkeğin gelecekteki spermatogenik kapasitesi için önemli sonuçlara sahip olacaktır. Bununla birlikte, son sperm çıkımı radyasyon, medikal tedavi, pestisitler, organik solventler, metaller ve fiziksel ajanlar gibi doğum sonrası faktörler tarafından yan etki olarak etkilenebilir.

Testiküler kanser

Pubertede oluşan ve ilerleyen testiküler germ hücreli kanserler, fetal dönem süresince farklılaşmayı başaramamış gonosit benzeri transforme germ hücreleri olabileceği düşünülen testisin preinvaziv karsinoma insitusundan (CIS) kaynaklanır[8, 9]. CIS hücreleri; gonositler ve embiryonik stem cell tarafından da salgılanan genlerin örneğin alkalen fosfataz, c-kit, Oct-4, SSEA-3 (stage spesific embryonic antigen-3) ve diğerleri gibi kanıtlara sahip stem-cell özellikler içerirler[8, 10-13] (Resim 7.2). Bundan başka, CIS hücreleri ve gonositler post mayotik germ hücreleri için spesifik olan diğer genlerin salgılarından yoksundurlar[14]. Ayrıca, klinik veriler, CIS hücrelerinin adult yaşamdan önce[15] ortaya çıktığını ve hatta CIS hücrelerinin neonatal dönemde tespit edilmekte olduğunu göstermektedir[16]. Epidemiyolojik olarak,



Şekil 7.1: *Testiküler disgenezis sendromunun klinik belirtileri ve bileşenlerinin şematik görünümü. CIS, Karsinoma in situ. Kaynaklar 1'in izniyle adapte edildi.*



Şekil 7.2: *Plasental benzeri alkalen fosfotazla (PLAP) immünohistokimyasal boyama. (a) 9 haftalık fötal testisteki immatür germ hücrelerinin normaldeki salgılanması, ve (b) karsinoma in situ hücreli erişkin testisindeki salgılanma. Her iki görüntüde sertoli hücreleri veya interstisiyel hücrelerde immünohistokimyasal reaksiyon görülmediği not edilmelidir.*

İkinci Dünya Savaşı süresince doğmuş Danimarka ve diğer İskandinav erkeklerinde, prenatal yaşamları esnasında yer alacak önemli etyolojik kanıtları gösteren, ayrıntılı gösterilen insidanslarda tüm yaşlarda gelişen germ hücreli tümörlere göre umulduğundan daha düşük riske sahip oldukları gösterilmiştir[17].

Hipospadias ve inmemiş testis

Sekonder seks karakterleri yeni şekillenmiş testisler tarafından üretilen hormonlara bağlıdır. Testesteron fetal leydig hücreleri tarafından salgılanır ve Wolf kanalının epididim, vaz deferens ve seminal veziküllere farklılaşmasından sorumludur[19]. Testesteron, ikili potansiyel olan dış genitalde 5α-dihidrotestesterona çevrilir ve penil üretra, penis ve skrotumun oluşması uyarılır. Azalmış testesteron sekresyonu örneğin hipospadiasla sonuçlanarak karışıklık oluşumuna yol açar[20].

Testiküler iniş iki fazda meydana gelir. Abdomen içi iniş oldukça komplekstir ve düzenlenmesi tamamen anlaşılamamıştır, bunula beraber ikinci trimestrda meydana gelir ve çoğunlukla Leydig Hücre Hormonu İnsülin benzeri Faktör-3 (INSL-3)' e bağlıdır[21]. İnguinal kanala ve skrotumun içine doğru takip eden iniş, yeterli testesteron salgılanmasına bağlıdır[22]. Böylece bozulmuş INSL-3 ve/veya testesteron inmemiş testise yol açabilir.

TESTİKÜLER DİSGENEZİS SENDROMU İÇİN RİSK FAKTÖRLERİ

Çoğu araştırmacılar, TDS semptomlarının birbiri için risk faktörü olarak dikkat edildiğini ve sıklıkla hastaların semptomlarında biren fazlasını gösterdiğini bulmuşlardır. Testiküler kanser ve düşük semen kalitesi arasındaki ilişki kuvvetlidir. CIS hücreleri ilk kez infertil erkeklerde tespit edildi ve daha sonra Berthelsen testiküler kansere, kanser tedavisinden hemen önce kontrlateral testislerde spermatogenezin azaldığını gösterdi[24, 25]. Daha sonraki zamanlarda, unilateral testiküler kanserli erkeklerde sadece bir fonksiyone testisli bir erkekten beklenenden daha kötü semen kalitesine sahip olduğu gösterilmiştir[26]. Epidemiyolojik olarak testiküler kanser ve düşük semen kalitesi arasındaki bağlantı indirek olarak daha sonra testiküler kanser gelişen erkeklerde azalmış fertilitenin tespitiyle doğrulanmıştır[27]. Histolojik düzeyde testiküler kanserli erkeklerde tümör taşımayan testisler; karsinoma insitu (%5-8), Sertoli-cell-only tübülleri (%13.8), mikrokalsifikasyonlar (%6) ve farklılaşmamış Sertoli hücreleri (%4.6) sıklığı gösteriyorlardı. Bütünün hepsinde, histolojik testiküler disgenezis muayene edilen kontrlateral testislerin %25'inde tespit edildi[28].

İnmemiş testis hem testiküler kanser hem de kötü semen kalitesi için çok iyi bilinen bir risk faktörüdür[29-31], ve inmemiş testis ile hipospadias arasındaki ilişki iyi belgelenmiştir[31, 32].

Dört TDS semptomu arasındaki ilişki; fetal yaşam süresince anormal germ hücre ve/veya sertoli hücre gelişimine işaret etmektedir ve düşük doğum ağırlığı, premature doğum ve düşük parite gibi intrauterin çevrenin tümüyle bağlantılıdır[33-35]. Amerika Birleşik Devletlerinin aynı bölgelerinde yaşayan Kafkasyalılardan Afrikalı Amerikalıların belirgin bir şekilde daha düşük insidansa sahip oldukları gerçeğiyle gösterildiği gibi genetik faktörlerin katkıda bulunduğu görülmektedir[36, 37]. Ek olarak 45,X/46,XY mozaizm ya da androjen duyarsızlık sendromu gibi genetik bozukluğu olan hastalar inmemiş testis, testiküler kanser ve bozulmuş spermatogenezdeki risk artışı; fetal yaşamda halen bozulmuş androjen üretimi ya da fonksiyonuna bağlıdırlar. Bunun arakasındaki genetik mekanizmalar halen çizilememiştir; oysaki Y kromozomu üzerindeki genlerin uygun testiküler fonksiyon için önemli olduğu görülür[38, 39].

TESTİKÜLER DİSGENEZİS SENDROMU SEMPTOMLARINDA BÖLGESEL VE GEÇİCİ EĞİLİMLER

Yıllardır testiküler kanser sıklığı, çok sayıda Avrupa ülkesinde artmıştır[40]. Özellikle iki Nordik ülkeleri Danimarka ve Finlandiya dikkate değerdir. Danimarkalı erkekler testiküler kanserin en yüksek insidansından birine sahipken Finli erkekler en düşük insidanslardan birine sahiptirler (sırasıyla, $11.1/10^5$ ve $2.8/10^5$)[41]. Son zamanlarda doğmuş erkekler önceki dekatlarda doğmuş erkeklerden daha yüksek yarı ömür riskine sahiplerken Danimarkalı erkekler arasında keskin bir insidans artışı, doğan insan topluluklarına bağlılık gösterir[17, 42].

Testiküler kanser için gözlenen uygun coğrafik eğilimlerde; Finli yeni doğan erkeklerde hipospadias ve inmemiş testis prevalansı gözle görülür bir şekilde Danimarkalı çocuklardan daha düşüktür (sırasıyla, %2.4 vs %9 ve %0.27 vs %1.03)[43, 44].

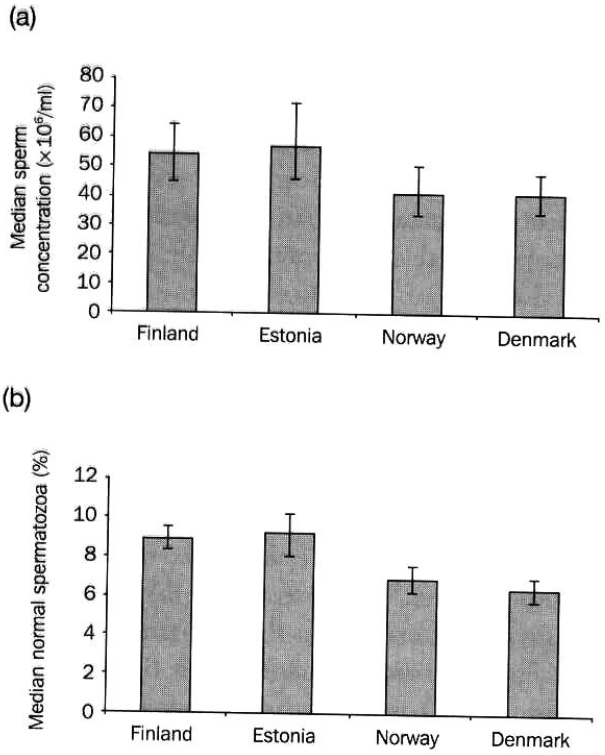
Semen kalitesi de Finliler arasında Danimarkalı erkekler arasında olduğundan daha iyi bir durumla bölgesel farklılık gösterir. Danimarka genel popülasyonunda genç, normal erkekler Finli erkeklere kıyasla ortalama sperm konsantrasyonuna sahiptirler (Finli erkekler: $54x10^6$/ml, Danimarkalı erkekler: $41x10^6$/ml) ve doğuda batı bölgelerinden (Resim 7.3) daha iyi durumdadır. Nordik-Baltık bölgesinde[45, 46] sperm konsantrasyonunda baştan başa ayrıntılı olarak bir Doğu-Batı gradienti mevcuttur.

Bununla birlikte Finli erkeklerin iyi üreme sağlıklarının kötüleşen bir eğilimi olduğunu gösteren göstergeler vardı. Düşük olmasına rağmen sperm sayıları azalıyorken[45] testiküler kanser insidansı artıyordu[40].

1992'de Carlsen ve arkadaşları[49] önceden yayınlanmış semen kalite verilerinin metaanaliz sonuçlarını bildirdiler ve Avrupa ve Kuzey Amerika'daki erkekler arasında sperm konsantrasyonunun azalmış olduğunu gösterdiler. Bunu takip ederek diğer araştırma gruplarından çeşitli bildiriler yayınlandı. Bazıları tüm zamanlarda hiçbir değişiklik bulmazlarken[50-53] diğerleri sperm sayısının belirgin bir şekilde azaldığını ileri sürdüler[54-57] ve buna ilaveten erkek üreme sağlığı eğilimlerinin ters etkilerindeki coğrafik farklılıkların varlığı da gösterilmiştir.

Bireysel TDS semptomları arasındaki bağlantılar sadece Danimarkalı ve Finli popülasyonlar arasında görülmedi. Estonya ve Litvanya'lı erkekler için tersi doğru iken[45, 46] Norveç'li erkekler yüksek testiküler kanser sıklığı ve düşük sperm sayılarına sahiplerdi. Maalesef TDS'nun oluşunu izah etmek için Nordik-Baltık bölgesi dışındaki ülkelerden çok sınırlı bilgiler mevcuttur. Japon fertil erkeklerin Danimarkalı fertil erkeklerle kıyaslanabilecek şekilde aynı düzeyde semen kalitesine sahip oldukları görülür, fakat aynı zamanda Japon erkekleri Finli erkeklerle aynı ya da daha altında testiküler kanser riskine sahiptirler[40, 58]. Bu bulgu, diğer TDS semptomları için artmış bir risk olmaksızın daha düşük sperm kalitesi olan Japon (veya Asya) erkekleriyle karşılaştırılabilirdir. Bununla birlikte daha mükemmel bir analiz kuvvetli sonuçlara erişebilmek öncesinde gereklidir.

Çalışmalar, fertil Amerikalı erkekler arasında semen kalitesinde bölgesel farklılıkların mevcudiyetini göstermektedir[59], oysaki diğer çalışmalar Afrika-Amerikalıların aynı bölgede yaşayan Kafkasyalılardan daha düşük bir testiküler kanser insidansına sahip olduklarını göstermişlerdir[37]. Bu sonuçlar, erkek üreme sistemi üzerine hem çevresel hem de genetik etkinin olmasıyla uyumludur, fakat bu çalışmalar Amerikalı erkekler arasında, farklı TDS semptomları arasındaki ilişkiler hakkında herhangi bir kuvvetli bilgi sağlamaz. Keza Kuzey Avrupa dışındaki diğer ülkelere ait bilgiler de noksandır.



Şekil 7.3: *(a) Sperm konsantrasyonundaki bölgesel farklılıkların gösterilmesi (cinsel perhiz periyodu ve laboratuarlar arasındaki değişikliklere ayarlanmış) ve (b) Nordik-Baltık bölgelerindeki genç erkeklerin normal spermatozoalarının morfolojik olarak sıklığı. Barlar median değerleri ve %95 hata düzeyi ile değerlenmeyi göstermektedir (karışıklıkları hesaba katan lineer regresyon modellerinden). İleri izahlar için tekste bakınız. 45 nolu kaynaktan adapte edildi. Kaynak 47 ve 48'deki sonuçlar, benzer barları çizmek için yeterli bilgileri sağlamayan bu yayınlardaki görünümleri içermemektedir.*

TESTİKÜLER DİSGENEZİS SENDROMU VE DOĞURGANLIK

Çoğu endüstrileşmiş ülkelerdeki doğum hızları popülasyon düzeyinden daha aşağılara indiği kaygısı bulunmaktadır. Bu ülkelerdeki sosyal yapı yüksek

doğum hızına karşı rol oynar, fakat azalmış biyolojik doğurganlığın önemli bir katkıda bulunan faktör olduğunun göz önünde bulundurulması daha çok olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sperm konsantrasyonu için referans değerin $20x10^6$ spermatozoa/ml olduğunu ifade eder[60]. Bunun uygun bir eşik değer olup olmadığı doğurganlığın prospektif çalışmasının bulgularına bağlı olarak sorgulanabilir. Yaklaşık $40x10^6$ spermatozoa/ml veya üzeri artmış sperm konsantrasyonu ile birlikte olan azalmış gebelik bekleme zamanı (TTP) gösterilmiştir[61]. Ek olarak Avrupalı fertil erkeklerin son kesitsel çalışmasında $55x10^6$ spermatozoa/ml ve üzerindeki artmış sperm konsantrasyonlarında azalmış TTP gösterilmiştir[62]. Böylece Danimarkalı ve Norveçli normal genç erkeklerin geniş bir fraksiyonu bu düzeylerin altında sperm kalitesine halihazırda sahiptiler; araştırılmış Danimarkalı ve Norveçli erkeklerin %20'si WHO referans düzeylerinin altında yaklaşık erkeklerin %40'ı $40x10^6$ spermatozoa/ml'den daha az sperm konsantrasyonuna sahipti. Sperm konsantrasyonu doğurganlık üzerine etki yapan parametrelerden sadece biridir. Guzick ve ark tarafından yapılan son yayınlardan biri, morfolojik olarak normal spermatozoaların %9'unda daha azına sahip erkekler subfertil erkek grubuna dahil oldukları ve fertil olması için normal formların %12'sinden daha fazlasında sahip olması gerektiğini göstermişlerdir[63]. Danimarkalı ve Norveçli genç normal erkekler normal formların %6'sından biraz daha fazlasına sahiptirler[45]. Bu genç erkeklerin çoğunluğu 19 yaşındadır; bununla birlikte bu erkekleri takip eden çalışmalar, onların düşük semen kalitesinin immatüritenin bir sonucu olmasının muhtemel olmadığını göstermiştir[64].

BOZULMUŞ ERKEK ÜREME SAĞLIĞINA NEDEN OLAN OLASI YAŞAM BİÇİMİ YA DA ÇEVRE FAKTÖRLERİ

Bazı popülasyonlar için en azından genetik predispozisyonun erkek üreme sağlığında gözlemlenen eğilimlerde parsiyel bir rol oynayabileceği olasıdır. Örneğin bozulmuş spermatogenez bazı çalışmalarda Y kromozumundaki ya da androjen reseptör genindeki polimorfizm ile birliktedir[39, 65]. Testiküler kanserlerde gizlenen artış hızı, yaşam tarzı ya da çevre faktörlerine katkıda bulunan ajanlar olabileceğini göstermektedir. Üstelik en azından bazı bölgelerde, zayıf semen kalitesi, inmemiş testis ya da hipospadias daha sık olmuştur[40, 43, 45] ve böylece ekzojen etyolojik faktör muhtemel görülmektedir.

Son üç çalışma inutero (hamilelik süresince annenin sigara içmesi yoluyla) sigaraya maruz kalan erkeklerin sperm konsantrasyonlarının azaldığını tespit etmiştir: tamamı maruz kalmamış erkeklerle kıyaslandığında %20'lik bir azalma[66], günde 10 sigaradan daha fazla annenin sigara içmesine maruz kalan oğulları arasında %48 azalma ve fetal tütüne maruz kalma daha düşük semen kalitesi ve oligozoosperminin daha yüksek riski arasındaki ilişki doza bağımlıdır[68]. Tütün içme hikayesine sahip erkekler, hamile iken içen annelerin sayısına bakıldığında sadece küçük bir önem arzetmektedir.

Şişmanlık Batı dünyasında artmıştır ve 25 kg/m^2 vücut kitle indeksi (BMI) sperm konsantrasyonunda, total sperm sayısı ve morfolojik normal spermatozoada azalma ile birliktedir[69]. Semen kalitesi ve BMI arasındaki herhangi bir neden ilişkisi halen çözümlenememiştir.

Genellikle, TDS'nun endokrin bozulmuş bileşikler tarafından neden olan fetal gonadal gelişmenin bozulmasıyla sonuçlandığı ileri sürülmektedir. Son dönemlerde, odaklanma androjen-östrojen dengesinin kesilmesi ve bozulmuş androjen etkisinedir[33, 70].

Son zamanlardaki deneysel kanıtlar, in utero antiandrojen dibutyl phthalate'ye maruz kalan ratlarda inmemiş testis, hipospadias, infertilite ve testis anomalilerinin TDS için olası bir hayvan modelinden gelmektedir[71, 72]. Yeni doğanlar anne sütü yoluyla phthalate'ın günlük dozlarına belirgin bir şekilde maruz kalabilirken bulgular, TDS benzeri semptomları phthalatenin indüklediğini belirtmektedir[73, 74]. Üstelik çevresel östrojenler olarak isimlendirilenlerin çoğu pestisitlerin bir çoğunu kapsayarak antiandrojenik özelliklere sahip oldukları da görülmüştür[75].

Erkek üreme sağlığı ve zararlı kimyasallara insanın maruz kalması arasındaki nedensel ilişkinin kanıtını sağlamak için olasıklıkların yokluğunda artan kaygılar oğulların üreme organlarında konjenital anomaliler ve endokrin bozucu-yıkıcı özellikler ile olan maddeler prenatal maruz kalma arasındaki ilişkiden bahseden sayısız epidemiyolojik çalışmaya rehberlik etmiştir[37, 76-80]. İlginç olarak, Amerikalı bir grup son zamanlarda insanlarda demaskülinizasyon için yeni ve daha duyarlı bir belirleyici olarak anogenital mesafe (AGD) kısaltıla-

rak kullanılmasını bildiren bir bildiri yayınladılar. 2-30 aylık 134 erkek çocukta bir takım phthalate metabolitlerinin idrar konsantrasyonları ve AGD arasında anlamlı bir şekilde ters korelasyon bulundu[81].

SONUÇ

Testiküler Disgenezis Sendromu (TDS) inmemiş testis, hipospadias, testiküler kanser ve zayıf semen kalitesi antitelerini hastalığın içine almaktadır. Antiandrojenik özellikler gösteren ya da androjen/östrojen fonksiyonlarını azaltan ekzojen faktörler TDS semptomlarına yol açarak fetal gonadın gelişmesini etkilemede şühe altında tutulmaktadır. En şiddetli formunda TDS'nun tüm semptomlarında sıkıntı olabilirken, oysaki en etkilenenler sadece fertiliteyle uygun biçimde azalmış semen kalitesine sahiptirler. En muhtemeli testiküler germ hücre kanserlerinin tüm vakalarında da TDS'a bağlıdır. Diğer üç semptom TDS'a bağlı olabilirken bununla birlikte alternatif olarak katkıda bulunan faktörlerle ilgili olabilir. Bir erkeğin potansiyel semen kapasitesi evvelce prenatal olarak tayin edilebilir, fakat postnatal olarak rol oynayan faktörler tarafından karşı olarak etkilenebilir. Yine de TDS semptomlarının birisinin tanısı diğer semptomların manifestasyonlarını özellikle insitu germ hücrelerde preinvaziv karsinomanın varlığını görmede klinisyenleri alert etmelidir. Bu hücrelerin eradikasyonu açık testis kanserinin gelişmesini önleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Skakkebaek NE, Rajpert-De ME, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod 2001; 16:972
2. Witschi E. Migration of the germ ceils of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. Contributions to Embryology, No. 209. Washington, DC: Carnegie Institute of Washington, 1948: 69
3. Jirasek JE. Principles of reproductive embryology. In Simpson JL, ed. Disorders of Sexual Differentiation. New York: Academic Press, 1976: 51
4. Gubbay J, et al. A gene mapping to the se^-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 1990; 346: 245
5. Cortes D, Muller J, Skakkebaek NE. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. Int J Androl 1987; 10: 589
6. Russell LD, Peterson RN. Determination of the elongate spermatid—Sertoli ceil ratio in various mammals. J Reprod Fertil 1984; 70: 635
7. Orth JM, Gunsalus GL, Lampcrti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoti cells produced during perinatal development. Endocrinology 1988; 122: 787
8. Skakkebaek NE, et al. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. IntJAndrol 1987; 10: 19
9. Rajpert-De Meyts E, et al. Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. APMIS 1998; 106: 198
10. Jacobsen GK, N0rgaard-Pedersen B. Placental alkaline phosphatase in testicutar germ cell tumours and in carcinoma-in-situ of the testis. APMIS 1984; 92: 323
11. Jorgensen N, et al. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. Lab Invest 1995; 72: 223
12. Looijenga LH, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. Cancer Res 2003; 63: 2244
13. Damjanov I, et al. Immunohistochemical localization of murine stage-specific embryonic antigens in human testicular germ cell tumors. Am J Pathol 1982; 108:225
14. Rapley EA, et al. Localisation of susceptibility genes for familial testicular germ cell tumour. APMIS 2003; 111: 128
15- Giwercman A, von der Maase H, Skakkebaek NE. Epidemiological and clinical aspects of carcinoma in situ of the testis. Eur Urol 1993; 23: 104

16. Müller J, Skakkebaek NE. Testicular carcinoma in situ in children with androgen insensitivity (testicular feminisation) syndrome. Br Med J 1984; 288: 1419
17. Moller H. Clues to the aetiology of testicular germ cell tumours from descriptive epidemiology. Eur Urol 1993; 23: 8
18. Adami HO, et al. Testicular cancer in nine northern European countries. Int J Cancer 1994; 59: 33
19. Wilson JD, Lasnitzki I. Dihydrotestosterone formation in fetal tissues of the rabbit and rat. Endocrinology 1971; 89: 659
20. Baskin LS. Hypospadias and urethral development. J Urol 2000; 163: 951
21. Toppari J, Kaleva M. Maldescendus testis. Horm Res 1999; 51:261
22. Wilson JD, George FW, Renfree MB. The endocrine role in mammalian sexual differentiation. Recent Prog Horm Res 1995; 50: 349
23. Skakkebaek NE. Possible carcinoma-in-situ of the testis. Lancet 1972; 2: 516
24. BercKelsen JG, Skakkebaek NE. Gonadal function in men with testis cancer. Fertil Steril 1983; 39: 68 • 25. Berthelsen JG. Andrological aspects of testicular cancer. Int J Androl 1984; 7: 451 .
26. Petersen PM, et al. Gonadal function in men with testicular cancer. Semin Oncol 1998; 25: 224
27. Moller H, Skakkebaek NE. Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. Br Med J 1999; 318: 559
28. Hoel-Hansen CE, et al. Histological evidence of testicular dysgenesis in contralateral biopsies from 218 patients with testicular germ cell cancer. J Pathol 2003; 200: 370
29. Sohval AR. Testicular dysgenesis as an etioiogic factor in cryptorchidism. J Urol 1954; 72: 693
30. Huff DS, et al. Histologic maldevelopment of unilaterally cryptorchid testes and their descended partners. Eur J Pediatr 1993; 152 (Suppl 2): Sll
31. Khuri FJ, Hardy BE, Churchill BM. Urologic anomalies associated with hypospadias. Urol Clin North Am 1981; 8: 565
32. Weidner IS, et al. Risk factors lor cryptorchidism and hypospadias. J Urol 1999; 161: 1606
33. Sharpe RM. The 'oestrogen hypothesis' - where do we stand now? Int J Androl 2003; 26: 2
34. Pierik FH, et al. Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. Environ Health Perspect 2004; 112: 1570
35. Berkowitz GS, et al. Maternal and neonatal risk factors for cryptorchidism. Epidemiology 1995; 6: 127
36. Spitz MR, et al. Incidence and descriptive features of testicular cancer among United States whites, blacks, and Hispanics, 1973-1982. Cancer 1986; 58: 1785
37. McGlynn KA, et al. Increasing incidence of testicular germ cell tumors among black men in the United States. J Clin Oncol 2005; 23: 5757
38. Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. Int J Androl 2003; 26: 70
39. McElreavey K, Quintana-Murci L. Y chromosome haplogroups: a correlation with testicular dysgenesis syndrome? APMIS 2003; 111: 106
40. Richiardi L, et al. Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004; 13: 2157
41. BrayF,etal. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. Eur J Cancer 2002; 38: 99
42. M0ller H. Trends in incidence of tescicular cancer and prostate cancer in Denmark. Hum Reprod 2001; 16: 1007
43. Boisen KA, et al. Difference in prevalence of congenital cryptorchidisrn in infants berween two Nordic countries. Lancet 2004; 363: 1264
44. Boisen KA, et al. Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placenta! weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at three months of age. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 4041
45. Jorgensen N, et al. East-West gradient in semen quality in the Nordic—Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. Hum Reprod 2002; 17: 2199
46. Punab M, et al. Regional differences In semen qualities in the Baltic region. Int J Androl 2002; 25: 243
47. Richthoff J, et al. Higher sperm counts in Southern Sweden compared with Denmark. Hum Reprod 2002; 17: 2468
48. Tsarev I, et al. Sperm concentration in Latvian military conscripts as compared wirh other countries in the Nordic-Baltic area. Int J Androl 2005; 28: 208
49. Carlsen E, et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Br Med J 1992; 305: 609
50. Vierula M, et al. High and unchanged sperm counts of Finnish men. Int J Androl 1996; 19: 11
51. Fisch H, et al. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. Fertil Steril 1996; 65: 1009
52. Paulsen CA, Berman NG, Wang C. Data from men in grearer Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. Fertil Steril 1996; 65: 1015
53. Handelsman DJ. Sperm output of healthy men in Australia: magnitude of bias due to self-selected volunteers. Hum Reprod 1997; 12: 2701
54. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. Environ Health Perspect 2000; 108: 961

55. Auger J, et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. N Engl J Med 1995; 332: 281
56. Irvine S, et al. Evidence of deteriorating semen quality in the Unired Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. Br Med J 1996; 312: 467
57. Van Waeleghem K, et al. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. Hum Reprod 1996; 11:325
58. Iwamoto T, et al. Semen quality of 324 fertile Japanese men. Hum Reprod 2006; 21: 760
59. Swan SH, et al. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. Environ Health Perspect 2003; 111: 1478
60. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999
61. Bonde JP, et al. Relation between semen quality and ferrility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. Lancet 1998; 352: 1172
62. Slama R, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. Hum Reprod 2002; 17: 503
63. Guzick DS, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med 2001; 345: 1388
64. Carlsen E, et al. Longitudinal changes in semen parameters in young Danish men from the Copenhagen area. Hum Reprod 2005; 20: 942
65. Ochsenkuhn R, De Kretser DM. The contributions of deficient androgen action in spermatogenic disorders. Int J Androl 2003; 26: 195
66. Jensen TK, et al. Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced sernen quality and testis size in adulthood: a cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five European counrries. Am J Epidemiol 2004; 159: 49
67. Storgaard L, et al. Does smoking during pregnancy affect sons' sperm counts? Epidemiology 2003; 14: 278
68. Jensen MS, et al. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. Hum Reprod 2005; 20: 2559
69. Jensen TK, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. Fertil Steril 2004; 82: 863
70. Rivas A, et al. Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the andrpgen-estrogen balance. Endocrinology 2002; 143: 4797
71. Fisher JS, et al. Human 'tesricular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. Hum Reprod 2003; 18: 1383
72. Mahood i K, et al. Abnormal Eeydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. Endocrinology 2005; 146: 613
73. Calafat AM, et al. Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 805: 49
74. Mortensen GK, et al. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). Anal Bioanal Chem 2005; 382: 1084
75. Sdhoni P, Sumpter JP Several environmental oestrogens are also anti-androgens. J Endocrinol 1998; 158: 327
76. Dolk H, et al. Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. Lancet 1998; 352: 423
77. Garcia-Rodriguez J, et al. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. Environ Health Perspect 1996; 104: 1090
78. Weidner IS, et al. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. Environ Health Perspect 2004; 106:793
79. Hardell E, et al. Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood and the risk for testicular cancer. Int J Andro! 2004; 27: 282
80. Hauser R, et al. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. Environ Health Perspect 2003; 111: 1505
81. Swan SH, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenacal phthalate exposure. Environ Health Perspect 2005; 113: 1056
82. Rorth M, et al. Carcinoma in situ in the testis. Scand J Urol Nephrol Suppl 2000: 166

BÖLÜM 2

Erkek İnfertilitesinin Tanımı

8

Subfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

Agnaldo P. Cedenho

Çeviri: *Fikret Erdemir*[*], *Mete Kilciler*[**]

GİRİŞ

Literatüre göre üreme çağındaki çiftlerin %15-20'sinin gebeliği sağlamada zorluklarla karşılaşacağı ve bir aile sahibi olabilmek için tıbbi girişimin gerekli olabileceği bilinmektedir. İnfertil çiftlerin yaklaşık olarak %30'unda izole erkek faktörü olup geriye kalan olguların %20'sinde ise erkek ve kadın faktörü birlikte bulunmaktadır[1]. Bundan dolayı, infertilite tedavisi isteyen çiftlerin yaklaşık yarısı erkek faktörünü içermektedir.

Her ne kadar erkek faktörü ile ilgili olan infertilite, çiftlerin değerlendirilmesi sonrası etiyolojide önemli bir rol oynasa da yıllar boyunca hep bir kenara itilmiştir. Gerçekten de erkek partnerin uzun süre herhangi bir görüşme ya da fizik muayene yapılmadan yalnızca semen analizi ile değerlendirildiği görülmektedir. Bununla ilgili olarak 1992 yılında intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) tekniğinin ortaya konulması ile beraber bu durum daha da kötüleşmiştir[2]. ICSI'nin tartışmasız olarak erkek infertilite tedavisinde önemli bir keşif olduğu kabul edilmektedir. Ancak, bu teknik ile fertilizasyon için var olan bütün doğal engeller aşıldığı için erkek faktörünü içeren infertilite araştırması hızını kaybetmiştir. Böylece hekimlerin ve hastaların çoğu dikkatlerini erkek infertilitesinde yalnızca tedavi sonu gebeliği sağlamaya yöneltmişlerdir. Neyseki tıp biliminde sıklıkla görüldüğü gibi zaman ve elde edilen kanıtlar her şeyi yeniden yerine koymuştur. Günümüzde, geçmişe göre daha çok olmak üzere subfertil erkekler, infertilitenin gerçek nedeninin bulunması için daha geniş araştırmalara ihtiyaç duymaktadırlar. Bunun nedeni, infertiliteye sebep olan faktörün bulunmasıyla hekimin çiftler için en iyi tedavinin ne olduğuna karar verebilmesidir (en iyi olasılık ve yarar/zarar oranını göz önünde bulundurarak). Böylece, kanıta dayalı androloji, çiftlerin çocuk sahibi olamamasından kaynaklanan büyük stresten kurtulmasına olanak sağlayacaktır.

Birkaç dekattır infertilitenin bir yıllık süre boyunca çiftlerin istemelerine rağmen çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmış olup bir yılın sonunda herhangi bir korunma yapmayıp bir yıl boyunca düzenli cinsel ilişki kurmalarına rağmen çocuk sahibi olamayanların incelenmesinin gerekli olduğu belirtilmiştir. Bu dönem, epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre ortaya konulmuş olup bir yılın sonunda çiftlerin yaklaşık %85'inde gebeliğin sağlandığı bildirilmiştir.[3] Bu nedenle, bir yılın sonunda çiftlerin yalnızca %15'i infertilite nedeniyle değerlendirilmeye ihtiyaç göstermektedir. Bu kanıtın arkasında mantıklı bir neden olmasına rağmen infertil çiftlerin hikayeleri ve son durumlarına göre yaklaşımlar değiştirilebilmektedir.

Örneğin, eğer kadın 35 yaşın üzerinde ya da eşlerden birinin gebeliği sağlamada klinik olarak bilinen bir engeli varsa bu süre kısaltılabilir. Öte yan-

[*] Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı.
[**] Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.

dan, infertilite nedeniyle erkek partnerin incelenmesi kolay ve hızlı olmasının yanı sıra pahalı ve invaziv olmadığından infertil çiftler herhangi bir sağlık kurumuna gittiklerinde kolaylıkla incelenebilir. Bundan başka, erkek partner istediğinde bu inceleme yapılabilir.[4] Erkek partnerin değerlendirilmesi hasta öyküsü, fizik muayene, laboratuvar ve görüntüleme yöntemlerini içeren temel tıbbi kılavuzları takiben yapılmalıdır. Hastanın hikayesi ve fizik muayene, bütün hastalarda en önemli kısmı oluştursa da gerektiğinde görüntüleme ve laboatuvar incelemeleri de yapılmalıdır. Birçok hastada, yalnızca iki adet semen analizinin yapılması yeterli iken bir kısmında da infertilitenin gerçek nedenini bulmak için pek çok testin yapılması gerekecektir. Her bir hasta kendi bireysel özelliklerine göre değerlendirilmelidir.

HASTANIN ÖYKÜSÜ

Hastanın öykü ve fizik muayenesinin infertil çiftlerde erkek partnerin değerlendirilmesinde önemli bir yeri vardır. (Tablo 8.1). Her ne kadar kitabın bu bölümü infertil erkeğin değerlendirilmesine yoğunlaşsa da kadın partnerin de değerlendirilmesi sadece yararlı olarak kalmayıp aynı zamanda tedavi planının oluşmasında da önemli olacaktır. Bizler infertilitenin yalnızca birbirinden bağımsız iki ünite yerine tek bir ünite olduğu gerçeğini unutmamalıyız. Bu nedenle kadının menstrüel siklus düzenini öğrenmeli, daha önceki infeksiyon öyküleri, gebelik, düşükleri, abdominal cerrahi girişimler ve cinsel yolla bulaşan hastalık ile ilgili risk faktörlerini incelemeliyiz (STDs).

Birçok hastada seminal inceleme ile beraber kadın partnerin pelvik ultrasonografi ve histerosalpingografi gibi incelemeleri muayene edilen çiftin hala doğal yöntemle çocuk sahibi olup olamayacağına karar verecektir. Öte yandan, reprodüktif öykü, infertil çiftin değerlendirilmesinde önemli bir alandır. Çiftlerin ne zamandan beri denemelerine rağmen çocuk sahibi olamadıklarını bilmek çok önemlidir. Özellikle bu dönemin 7 yılın üzerinde olması doğal gebelik şansını azaltırken önemli faktörlerin infertilite etiyolojisinde yer alabileceğini düşündürmektedir. Bu durum özellikle kadın partner normal menstrüel siklüslere sahip olduğunda, düzenli siklusleri olduğunda ya da siklus boyunca düzenli cinsel ilişki olduğunda önem kazanmaktadır.

Tablo 8.1: *Kronolojik sıraya göre öykünün incelenmesi*

Konsepsiyon	Doğal konsepsiyon ya da ART gerekli olmuştur.
Prenatal	İlaçlar, farmakolojik çevresel ajanlar ve endokrin bozukluklar.
Çocukluk	İnmemiş testis, inguinal herni operasyonu, mesane boynu ve pelvik ya da retroperitoneal cerrahi, testis torsiyonu
Puberte başlaması	Erken ya da geç püberte, testiküler travma ya da torsiyon.
Adelösan ya da genç erişkin	Seksüel davranış ve STDs, viral ya da bakteriyel orşit, İlaçlar, anabolik steroidler, inguinal cerrahi, trisiklik antidepresanlar
Erişkin	Trisiklik antidepresanlar, antihipertansifler, sülfasalazin nitrofurantoin, simetidin, kemoterapi, radyoterapi, retroperitoneal lenfadenektomi, inguinal cerrahi, diyabet, multipl sklerozis, kronik respiratuvar stres
Reprodüktif sorunlar (kadın)	Menstrüel siklus, infeksiyonlar, gebelikler, düşükler STDs, daha önceki araştırma ve tedaviler
Reprodüktif sorunlar (erkek)	Daha önceki paternite, araştırma ve tadaviler, potens.
Reprodüktif sorunlar (çift)	İnfertilite süresi, cinsel ilişki sıklığı ve zamanı, koitus tekniği, fertil dönem hakkında bilgi.

Ayrıca çiftlere menstrüel siklus boyunca fertil dönemi bilgileri sorulmalıdır. Son veriler, spermin kadın reprodüktif sistemine girmesi için en iyi dönemin ovulasyondan önceki dönem olduğunu göstermiştir. Bu süre, 6 güne kadar uzayabilir ve ovulasyondan hemen sonra servikal mukus pregestasyonel etkiye bağlı olarak sperm için uygun olmayan ortam haline gelir.[5]

Seksüel davranışın öğrenilmesi infertilitenin altında yatan nedeni anlamamızda tek başına bile önemli bilgiler sağlayabilir. Cinsel ilişki sırasında kullanılan lubrikanlar genellikle spermisidal etkili olup sperm motilitesinin azalmasına neden olurlar. Bu nedenle, çiftlerin ilişki sırasında herhangi bir madde kullanıp kullanmadıklarını öğrenmek gerekmektedir. En yaygın kullanılan lubrikanlar K-Y® jel, lubrifx®, Keri losyonu ve hatta tükrüktür[6-8].

Değerlendirilmesi yapılan erkeğin daha önceki ilişkisine bağlı çocuğunun olması her ne kadar üreme potansiyelini ortaya koysa da fertilite için bu durum her zaman garanti teşkil etmemektedir. Varikoselin sekonder infertiliteye neden olacağı gösterilmiştir[9]. Daha önce yapılan herhangi bir araştırma ya da tedavi çiftin değerlendirilmesine yardımcı olacak ve böylece zaman kaybı, para kaybı ve tekrarlayıcı muayeneler olmayacaktır. Hastanın değerlendirilmesi sırasında öykü alımındaki en önemli nokta, bunun kronolojik sıraya göre oluşturulmasıdır. Bu durum, erkek faktörü değerlendirilirken hastanın gelişimindeki değişik aşamalar ile ilgili bilgileri verecektir.

Prenatal dönemde ilaçlara maruz kalma, farmakolojik ajanlar ya da çevresel ajanlar tespit edilmelidir. Fetal dönemde dietil stilbestrol (DES) tedavisine maruz kalma epididimal kist, artmış inmemiş testis riski ve erişkin dönemde sperm parametrelerinin değişimine neden olabilmektedir[10]. Hipospadiaslı hastalar testosteron sentezindeki değişime bağlı olarak endokrinoljik anormaliklerle başvurabilirler[11]. Öte yandan, endokrin bozukluklara yol açabilecek maddelerin ya da patolojilerin erkek infertilitesinde önemli olduğunu vurgulamalıyız. Bu ilaçlar ve bunların ürünleri farmakolojik endüstride kullanılmakta olup serum endokrin düzeylerini etkileyebilir ya da hormon etkisini, salınım ve eliminasyonlarını bozarak değiştirebilir. Bu zararlı etkiler, havyan modellerinde gösterilmiştir. Bu ajanların değerlendirilmesi, sperm konsantrasyonları üzerine olan anormal etkileri ve üreme sisteminde anormaliklere yol açma insidanslarındaki yüksek potansiyelleri nedeniyle dünyanın pek çok yerinde giderek daha fazla ilgi çekmektedirler [12].

Yakın gelecekte, bu bilgilere rağmen nasıl gebelik sağlandığı gerekli olacaktır. ICSI yöntemi Y kromozomundaki bazı mikrodelesyonlar gibi genetik defektlerin babadan çocuğa aktarılmasına neden olduğundan ironik olarak düşünüldüğünde infertilitenin klinik bir miras olarak görüldüğü anlaşılmaktadır.

İnmemiş testis, doğumda erkek çocukların %2-5'ini etkilemekte olup bu durum infertilitenin önemli bir nedenini oluşturmaktadır[13]. Çalışmalar tek taraflı inmemiş testisi olan çocukların %30'unun ve iki taraflı inmemiş testisi olan çocuklarında %50'sinin erişkin dönemde semen parametrelerinde değişiklik olacağını göstermiştir. Ayrıca, önceki endikasyonların aksine çok genç yaşta orşiyopeksi operasyonu yapılmış olsa bile bu durumun gelecekteki infertiliteyi önleyemeyeceği belirtilmektedir[14].

Çocukluk çağındaki inguinal herniler ile bu bozukluğun cerrahi olarak düzeltilmesi için yapılan operasyonlar infertilite etiyolojisinde rol oynamaktadır. İnguinal herni onarımı testis kan desteğini bozarak ya da vaz deferenste iyatrojenik obstrüksiyon oluşturarak infertiliteye neden olabilir[15,16]. Erişkinlerde herniorafi operasyonu sırasında iyatrojenik vaz deferens yaralanması oranı %0.3 olarak bildirilirken çocuklarda vaz deferensin yaklaşık %0.8-3 oranında iyatrojenik olarak etkilendiği bildirilmektedir[17,18]. Dahası, vaz deferens üzerine olan iyatrojenik yaralanmalar daha fazla olmasına rağmen sıklıkla tek taraflı olduğu için fertilitenin her zaman etkilenmeyeceğini düşünebiliriz.

Ejakülatuvar yapılar ya da ejakülasyonun normal yolu, çocukluk döneminde mesane boynu, pelvis ya da retroperitoneal alana yapılan cerahi girişimlere bağlı olarak olumsuz şekilde etkilenebilir. 1960'lı yılların başında üretral defekt ile başvuran pek çok çocuğun mesane boynunun tamir edilmesi için YV prosedürü olarak bilinen bir operasyon geçirmiş oldukları bildirilmektedir. Bu cerrahi işlem, internal üretral sfinktere, mesane boynunun anormal kapanmasına yol açan ciddi zararlar vermektedir. Erişkin dönemde bu hastalar azalmış ejakülasyon volümü (<1 ml) ve retrograd ejakülasyon yakınmaları ile başvurmaktadırlar. Bu tanı ejakülasyon sonrası idrarda sperm saptanması ile doğrulanabilir.

Puberte, erkek çocuklarda sıklıkla 11-12 yaşlarında görülmeye başlar. Puberte başlangıcı erken olursa bu durum adrenogenital sendromu düşündürmelidir. Öte yandan puberte gecikecek olursa Klinefelter's sendromu ve idiyopatik hipogonadizm gibi sekonder endokrinopatiler düşünülebilir.

Testiküler torsiyon yenidoğan döneminde ya da adelösanlarda görülüp testiküler atrofiye yol açabilir. Testiküler torsiyon geçiren olguların yaklaşık %30-40 kadarının semen parametrelerindeki değişikliklere bağlı olarak çocuk sahibi olmada zorluklar yaşadığı bildirilmektedir[19,20]. Her ne kadar geçmiş-

te, spermatogenezisteki değişikliklerin kan testis bariyerinin bozulmasına bağlı olarak oluştuğu belirtilmişse de torsiyonun olduğu yerin karşı tarafındaki normal testiste yapılan çalışmalar burada da histolojik değişiklikler olduğunu ve bu durumun spermatogenetik defektlere neden olabileceğini göstermiştir[21].

Adelösan ve erişkin yaşam arasındaki seksüel yaşam göz önünde bulundurulduğunda STDs (cinsel yolla bulaşan hastalıklar) için oluşan risk oldukça önemlidir. Her ne kadar önemi azalmış olsa da üretritler hala prostat, epididim ve testisler için infeksiyon kaynağı olarak göz önünde bulundurulmalıdırlar. Üretrite en sık sebep olan mikrorganizmalar; *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum ve Trikomonas vaginalis* olarak bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde *C. Trachomatis* nongonokoksik üretrit ve akut epididimitlerin en önemli nedenidir ve erkeklerin %10-15'i asemptomatiktir. Olgular bazen de artmış seminal lökosit değerleriyle kliniklere başvurabilirler[22].

Viral orşitler, özellikle başlangıçları postpübertal dönemde ise testiküler fonksiyonları olumsuz olarak etkileyebilirler. Kabakulak virüsü, %30 oranında tek taraflı orşite ve %10 oranında da iki taraflı orşite neden olarak testiküler volüm ve içeriğin azalmasına yol açacaktır[23].

Uzamış ateşin başlıbaşına spermatogenez bozukluğunun kaynağı olabileceğini hatırlatmak gerekmektedir. Spermatogenez siklusunun 74 gün sürmesinden dolayı bu etkiler hemen ortaya çıkmayacaktır. Bu sürede, tip B spematogonia matür sperme dönüşecektir. Ayrıca, spermlerin ejakülasyon öncesi ejakülatuvar sisteme geçmesi içinde 15 günlük süre bulunmaktadır. Böylece, eğer ısı artışının ya da verilen tıbbi tedavinin spermlere zarar verdiği düşünülüyorsa seminal incelemeler 90 gün sonra yapılmalıdır.

İlaçların kötüye kulanımının pek çok çalışmada erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu ve bununla bağlantılı olarak alkol[24,25], tütün kullanımı[26], marihuana[27], kokain[28,29] ve anabolik steroidlerin[30,31] testiküler bozukluğa yol açabilecekleri gösterilmiştir. Alkol, serum testosteron seviyesini düşürerek etki eder ve bu etkisini birçok yol üzerinden gösterir. Bunlar hipotalamus, hipofiz ve testiküler leydig hücreleri olarak sıralanabilir. Alkol leydig hücrelerini doğrudan etkileyip düşük testosteron seviyelerine yol açarken, hipotalamik ve hipofiz hormon üretimine etki ederek luteinizan hormon ve folikül stimüle edici hormonu negatif olarak etkileyebilmektedir[24,25].

Öte yandan, tütün testiküler atrofi, sperm morfolojisindeki değişiklikler oluşturma, düşük sperm hareketleri, azalmış semen volümü, bozulmuş spermatogenez, kötü akrozom reaksiyonu, sperm penetrasyon yeteneğinin azalması, oksidatif DNA hasarı, kromozom 13 anöplöidilerinde artmış risk ve artmış serum prolaktin ve östradiol seviyeleri gibi etkilere neden olabilir[26]. Marihuana ve kokainin spermatogenez bozukluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiş olup azalmış sperm konsantrasyonu ve hareket ile birlikte sperm morfolojisi değişmiş spermlere neden olabilirler[29]. Bundan başka, yüksek kokain dozları erektil disfonksiyona neden olabilmektedir[29]. Son olarak, ekzojen testosteron ve metaboliti ile birlikte östrojen, hipotalamustan üretilen gonadotropin hormonun salınımının baskılanmasına (GnRH) yol açabilir. Bu durum hipofizden luteinizan hormonun (LH) salınımının azalmasına neden olur. Sonuçta, testiste leydig hücrelerinde testosteron yapımı azalır[31]. Bu ajanların kullanımının kesilmesinden sonra 3 ile 6 ay içinde spermatogenezin normale dönmesi beklenir. Her ne kadar nadir olsa da steroidler tarafından oluşan hipofiz baskılanması geri dönüşümsüz olabilir[32].

Ejakulatın kalitesi ve kantitesini etkileyerek spematogenez bozukluğuna yol açan ilaç uygulamaları bulunmaktadır. Antidepresan tedavi, kan prolaktin seviyelerini artırarak gonadotropinlerin üretiminin bozulmasına yol açar[33]. Kalsiyum kanal blokörleri (nifedipin, diltizem) akrozom reaksiyonunu bloke edebilir ve spermin yumurtaya bağlanmasını engelleyebilir[34,35]. Alfa blokör antihipertansifler (prazosin, terazosin, fenoksibenzamin) retrograd ejakülasyon ve hatta aspermiye yol açabilir[36]. Sülfasalazin[37,38] ve simetidin[39] gibi ilaçlar, kullanılan doz ve tedavi süresine bağlı olarak spermatogenezisi bozmaktadırlar.

Testis kanseri, Hodgin lenfoma ve lösemi, genç erişkin erkeklerde en sık görülen 3 kanser tipini oluşurmaktadır. Bu hastalıkların insidansı 15-35 yaş arasında en yüksektir. Giderek artan sayıda genç erkek kansere bağlı olarak kemoterapi ve radyoterapi ile başarılı olarak tedavi edilmektedirler. Bunlar içerisinden testiküler kanser infertilite ile yüksek oranda ilişkili olup orşiyektomi, kemoterapi, radyoterapi ve retroperitoneal lenf nodu diseksiyonu ile sağkalım oranları %90'lara kadar yükselmiştir[40]. Bu tedaviler çok önemli olup kalıcı ve geçici infertilite ile birlikte olmaktadırlar[41].

Sitototoksik ilaçlarla olan testiküler hasar ilk olarak 1948 yılında nitrojen mustard tedavisinin azoospermiye yol açmasıyla tanımlanmıştır. Diğer pek çok ajanında gonadotoksik olduğu gösterilmiş olup spermatogeneze en sık etki eden ilaçlar alkilleyici ajanlar (siklofosfamid, klorambusil, busulfan, prokarbazin, estramustin, melfalan), antimetabolitler (sitarabin, 5-florourasil, metotreksat), vinka alkaloidleri (vinblastin, vinkristin) sisplatin ve analogları ve topoizomeraz interaktif ajanlar (bleomisin, doksorubisin, aktinomisin) olarak bilinmektedir[43]. Her ne kadar fertilite ile ilgili yan etkileri en aza indirgemek için çabalar sürse de bu tedaviler sonrası çocuk sahibi olmak zorlaşmaktadır[44].

Alkilleyici ajanlar, spermatogenezi en fazla bozan ajanlar olarak bilinmektedirler ve etkileri kümülatiftir. Alkilleyici ajaların dozu >400 mg/kg olarak kullanıldığında prepübertal çocukların %30'u ve erişkin erkeklerinde %70-90'ında gonadal disfonksiyon meydana gelecektir[45,46]. Öte yandan, radyoterapi >400 cGy dozunda kullanıldığında kalıcı hasar oluşturabilir. Toplam >300 cGy dozunda kullanıldığında değişik derecelerde oligoospermiye neden olmaktadır[47]. Kemoterapi ve radyoerapinin spermatogenez üzerine olan olumsuz etkileri 4 ile 5 yıla kadar sürebileceğinden tedavi öncesi semen analizi yapılmaldır.

Tesitküler kanser öyküsü olan hastaların %50'si oligozoospermik olup %7-10'u da tedavi almadan önce azoospermiktir[48]. Tedavi sonrası spermatogenez görülmesi kullanılan kemoterapi ve radyoterapinin tipine bağlıdır. Spermin kriyoprezervasyon yöntemi ile saklanması kanser hastalarında fertilitenin sağlanmasında yardımcı olacaktır. Bu hastalarda, mümkün olan en uygun zamanda bir ya da daha fazla sperm örneği alıp dondurularak yetkili bir sperm bankasına gönderilmelidir. Her ne kadar hormonal manipülasyonlar ile sperm elde edilmesi mümkün olsa da günümüzde kanser hastalarında spermlerin sperm bankasında saklanması en uygun yoldur[43].

Kemoterapi ve radyoterapinin testiküler fonksiyonlara olan olumsuz etkilerinden başka retroperitoneal lenfadenektomi de ejakülatuvar disfonksiyona yol açabilir. Bu hastaların çoğunluğu sempatik nöral zincir ya da sakral pleksus ve hipogastrik sinirler gibi periferal dalların etkilenmesi sonucu aspermik hale gelecektir[49] Son zamanlarda, sinir koruyucu tekniklerin yoğun olarak kullanılmasıyla yan etkiler daha da azalmaya başlamıştır[50].

Cerrahi sonrası aspermi ya da daha nadir olarak retrograd ejakülasyon ile gelen hastalarda sempatomimetik tedavilerle (efedrin sülfat gibi) antegrad ejakülasyon oluşturulabilir[51]. Farmakolojik ajanlarla yapılan girişim yetersiz olduğunda semen pH ve osmolaritesi kontrol edildikten sonra spermler inrauterin inseminasyon (IUI) ya da ICSI yönteminde kullanılmak üzere idrar yoluyla elde edilebilir. Bununla birlikte, testis kanserli hastada fertliteyi korumanın en iyi yolu üreme çağında, onkolojik tedavi öncesi gametlerin dondurularak saklanmasıdır. Özellikle, çok az sayıda spermle bile fertilitenin sağlanabildiği ICSI gibi bir yöntemin gelişmiş olmasından dolayı saklama işlemi gereklidir.

Son olarak, sistemik hastalıklar erkek üreme sistemini etkileyebilirler. Örneğin, diyabet ve multipl skleroz ejakülatuvar cinsel işlev bozukluğuna yol açabilir. Solunum sistemi hastalıkları İmmotil Silia Sendromu ve Kartagener Sendromu gibi sperm konsantrasyonunun normal ancak flagellumda defektlerin olduğu patolojilere bağlı olarak immotil sperm oluşup infertilite meydana gelebilir.

FİZİK MUAYENE

Genel fizik muayene boy, kolların ve bacakların uzunluğu ile ağırlığını içermelidir. Bütün sistemlerin dikkatli bir şekilde gözlenmesi erkeğe ait infertilitenin tanısına katkıda bulunacaktır. Bu durum, özellikle birçok organın çalışmasındaki farklılaşmanın üreme sistemini etkilemesinden dolayı önemlidir. Örneğin, spesifik bir yakınması olmadan başvuran olgularda fasial ve pubik kıllanmanın yetersiz olması ya da jinekomasti olması hipognadizm ya da Klinefelter Sendromunu düşündürmektedir. Öte yandan, yetersiz virilizasyon ve anozmi Kallman Sendromu ile ilişkilidir.

Her ne kadar infertil erkeğin değerlendirilmesinde kronik hastalıklar sıklıkla araştırılmasa da erken ya da geç adrenal fonksiyon değişiklikleri, kronik alkolizm ya da diyabetes mellitus gibi hastalıklar dikkatli fizik muayene ile tanınabilir. Bununla birlikte genital fizik muayenenin ideal sıcaklık (>23 C) ve ışık koşullarında yapılması erkek partnerin infertilitesinin değerlendirilmesinde önemli bilgilerin verilmesini sağlayacaktır.

Muayene hasta ayakta iken başlar. Bu durum penis, skrotal büyüklük, testis pozisyonu, testis asimetrisi ve testiküler yapılar için en uygun pozisyonu oluştururken pleksus pampiniformisin venöz dönüşü içinde önemlidir. Penis göz önünde bulundurulduğunda, üriner meatusun yeri hipospadiyasın vajinal kanala girişinde ejakülat yetersizliğine yol açma durumu nedeniyle önemlidir.

Küçük skrotum, obez bir hastada çok zor palpe edileceğinden hastalara ultrasonografi yapılması gerekebilmektedir. Muayene sırasında testislerin büyüklüğü, içeriği ve regülaritesi kaydedilmelidir. Normal semen analizine sahip hastalar genellikle prader orkidometresi ile tespit edildiğinde 4.5 cm boy ve 2.5 cm genişliğine ve en az 15 ml olan testis volümlerine sahiptirler. Çok şaşırtıcı olmayan bir şekilde testiküler volüm ve içerik genellikle semen analizini öngörmektedir. Özellikle, seminifer tübülüslerin %85'inin testis volümünü oluşturduğu göz önünde bulundurulduğunda bu öngörü daha da gerçekçi olmaktadır.

Öte yandan küçük testisi olan hastalar değişik derecelerde oligoospermi ya da azoospermi ile başvurmaktadırlar. Pübertal dönemde erkek çocuklar nomal gonadal gelişim göstermezler ise erişkin yaşlarda bu çocuklar büyük olasılıkla küçük (<8 ml) ve sert testislere sahip olacaklardır. Bu durum özellikle Klinefelter Sendromunda görülmektedir. Bununla birlikte, gonadlar normal gelişmesine rağmen viral ya da bakteriyel orşitlerde olduğu gibi etkilenirlerse boyutları ya da içerikleri azalacaktır.

Testislerin muayenesini takiben epididimler bir el nazikçe testisi tutup kaldırmışken diğer elle epididim baş, gövde ve kuyruğunun başparmak ya da işaret parmağı ile muayenesini içermelidir. Epididimal volüm, içerik, regülarite, kistler ve testise olan uzaklığı kaydedilmelidir. Epididimin testisten daha pron pozisyonda olması anomalilere işaret edeceği gibi epididdimal efüzyonu da düşündürebilir.

Epididim başında kistlerin görülmesi oldukça yaygın olmasına rağmen bu kistler sıklıkla 0.7 cm'den küçük olup klinik olarak anlam ifade etmemektedirler. Bununla birlikte, bu kistler geniş ya da çok sayıda ise epididimi tıkayarak sperm pasajını engelleyebilirler.

Erkek üreme sisteminin incelenmesinde duktus deferens de değerlendirilmelidir. Bu yapılar sert, silindirik şekilde olup çapları 3 mm kadar ölçülmektedir. Bu yapılar, muayene sırasında spermatik kordonun diğer yapılarından kolaylıkla ayrılmaktadırlar. İdeal oda sıcaklığının sağlandığı ve hasta kooperasyonunun iyi olduğu durumlarda duktus deferensler her zaman palpe edilirler. Bu nedenle, hastaların çoğunda duktus agenezisi yalnızca fizik muayene ile diğer yardımcı teknikler ya da cerrahi eksplorasyon olmadan tanınırlar. Değişik derecelerdeki epididimal malformasyonlar, agenezis ya da seminal veziküllerin hipoplazisi sıklıkla vaz deferens anomalilerine eşlik etmektedir. Fizik muayene, vaz deferensin kalınlaşmış ya da sert olduğunu gösterirse bu durum daha önce geçirilmiş infeksiyona ve sıklıkla da cinsel yolla geçen bir infeksiyona bağlıdır. Vazektomi operasyonu geçirmiş hastalar ağrılı ya da dilate epididimler ile başvurabilirler.

Fizik muayenede bakılacak son yapı spermatik kordondaki pleksus pampiniformislerdir. Burada anormal asimetriler, şişlikler ve büyümeler görülebilir. Hasta ayakta pozisyonda iken testis volümleri ölçülür ve simetrik olup olmadıkları kaydedilir. Grade II ve grade III varikosel sıklıkla sol taraftadır ve testis volümünü azaltabilir. Ayrıca testis aksını vertikalden horizontal yöne doğru değiştirebilir. Varikosel spermatogenezdeki değişikliklere bağlı olarak seminifer tübülüs çapını ya da testis volümünü azaltabilir. Tek taraflı varikoseli olan hastalarda testiküler asimetri bulunması yaygındır. Bu durumda aynı taraftaki testis karşı taraftaki testise göre 2 ml daha küçük olacaktır.

Grade I varikosel tanısı için hastaya valsalva manevrası yaptırılır. Valsalva manevrası öncesi ya da valsalva maneverası sırasında yapılan dikkatli muayene genişlemiş pleksus pampiniformislerin görünmesini sağlayacaktır. Subklinik varikoseller fizik muayenede tanınanamazlar. Bu varikosellerin klinik önemleri son dönemlerde sorgulanmaktadır. Spermatik kord, skrotum boyunca değerlendirilmeli spermatik kordon kisti ve inguino-skrotal herni açısından gözlenmelidir.

Genital muayenenin yapılıp genitallerin gözlenmesi sadece erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde değil aynı zamanda infertil çiftlerin prognozu açısından da önemlidir. Her ne kadar seminal sıvının incelenmesi hala çok önemli olsa da değerlendirme de farklı laboratuvarlarda farklı protokollerin uygulanması nedeniyle farklı sonuçların elde edilebilmesi olasılığından dolayı tam bir standardizasyon sağlanamayabilir. Sonuç olarak, farklı laboratuvarların değerlendirilmesinin karşılaştırılması oldukça zordur. Seminal incelemenin hastanın fertil olup olma-

dığını tam olarak ortaya çıkarmadığı bilinmelidir. Özellikle, fertilite çiftlere ait bir fenomen olduğu için bu durum akılda tutulmalıdır. Son yöntemlerin ayrıntılı tanımlamaları ve semen analizinin ilişkileri diğer bölümlerde tartışılmaktadır.

Her ne kadar semen analizi, infertil erkek olguda, değerlendirmenin başında yapılsa da bu tetkik fertilite potansiyeli hakkındaki bütün soruları cevaplandıramamaktadır. Hastaya sadece tek bir semen analizi yapılmasıyla fertilite potansiyelini tam olarak ortaya koymak zor olup bu durumda hekimin genellikle birden fazla semen analizi yaparak bunların ortalamasını alıp değerlendirme yapması önerilmektedir. Bu durumlar göz önünde bulundurularak kendi kliniğimizde hastaları doğal konsepsiyon potansiyellerine göre 3 gruba ayırıyoruz (tablo 8.2).

Bu tablo yalnızca hastanın durumunu tartışmayı göstermektedir. Daha önce bahsedildiği gibi buradaki sınır değerler hala yoğun olarak tartışılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre semen volümünün referans değeri 2.0 ml'dir[52]. Hastalar orgazm sonrası hiç sperm çıkaramazlar ise aspermi olarak adlandırılırlar. Bu durum, iki taraflı sempatektomi, iki taraflı retroperitoneal lenf nodu diseksiyonu, sempatik akımı bloke eden antihipertanisf ilaçlar, transüretral ya da mesane boynunun açık cerrahileri ya da prostatın açık cerrahileri, geniş pelvik cerrahi ve diyabetik nöropatiye bağlı olabilir.

Tablo 8.2: *İki semen örneğinin ortalaması alınarak semenin sınıflandırılması*

	Doğal konsepsiyon için potansiyel		
Değişkenler	Yüksek	Orta	Düşük
Volüm (ml)	>2	1-2	<1
Konsantrasyon ($x10^6$/ml)	>20	10-20	<10
Motilite (% motil)	>50	40-50	<40
Morfoloji	>14*	<20**	>30**

* Kruger strict kriterlerine göre sınıflandırılmıştır, 1986
** Dünya Sağlık Örgütü'ne göre sınıflandırılmıştır

Semen pH'ının spermatozoa olmadan 7.4'ten düşük olması ejakulatuvar kanal obstrüksiyonu ya da seminal veziküllerin konjenital yokluğunu düşündürür. Seminal svının spermatozoa olduğu halde pH'ının 7.4 ve altında olması seminal sıvıda açılıp kapanan mukus plağının olduğunu düşündürür ve bu tıkanma spontan olarak kaybolabilir[53].

ERKEK ÜREME SİSTEMİNİN ENDOKRİNOLOJİSİ

Klinik bakış açısı ile erkek infertilitesi ile ilgili en önemli hormonlar folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinizan hormon (LH) ve testosterondur. FSH, temel olarak sertoli hücreleri üzerine etki ederek androjen bağlayan hormonun (ABP) yapımını stimüle eder ve bu da testosteronu bağlayarak seminal tübüllerde yoğunlaşmasını sağlar[54]. Sertoli hücreleri ayrıca inhibin A ve inhibin B üretirler. Bu maddeler de, FSH'ın hipofizer sentezini azaltır. Bu durum, testiste sadece spermatozoa olduğunda bile olmaktadır. İnhibin üretimi bu durumda dahi FSH seviyesini normal düzeye getirebilmektedir. FSH seviyesi bu nedenle spermatogenetik bütünlüğü değerlendirmede sınırlı etkiye sahiptir[55]. LH, leydig (ya da interstisyel) hücreleri üzerine etkir. Leydig hücrelerine etki ederek testosteron yapımını stimüle eder. Dolaşımdaki testosteronun yalnızca %2'si bağlanmamış olarak (serbest testosteron) bulunmakta olup asıl hormonal etkilerden sorumlu olan kısımda bu serbest olan testosterondur. Dolaşımdaki testosteronun %30'u spesifik olan seks hormonu bağlayan globuline, %68'i albumine ve geri kalanı da diğer spesifik olmayan proteinlere bağlıdır[56]. Testosteron, FSH'a benzer yaklaşımla sertoli hücre fonksiyonlarını stimüle ederek spermatogenezi uyarır. Testosteron ayrıca, periferal dokularda dihidrotestosterona çevrilir. Bu hormon erkek sekonder seks karakterlerinin oluşmasından sorumludur[57].

Hipofizer bezden sekrete edilen prolaktinin üretimi dopamin tarafından inhibe edilir. Prolaktin ayrıca, tiroid stimülan hormon tarafından (TSH) artırılır. Her ne kadar prolaktin doğrudan spermatogenezis üzerine etki etmese de kronik hiperprolaktineminin GnRH etkisini değiştirdiği bilinmektedir. Bu durum, FSH ve LH'ın sekresyonunun değişmesine yol açarak libido, seksüel işlev bozukluğu, jinekomasti ve spermatogenez bozukluğu gibi değişikliklere yol açmaktadır[58].

Erkek endokrin profili (FSH, LH ve testosteron) normal semen analizi olan erkeklerde gerekli değildir. Sperm konsantrasyonu $10x10^6$ hücre/ml altında olduğunda bile doğal konsepsiyonun olduğu gösterilmiştir[59]. Öte yandan, sperm konsantrasyonu $5x10^6$ hücre/ml ve biraz üzerinde olan hastaların belirgin olarak düşük fertilite oranları vardır[60]. Hormonal profil bu nedenle şiddetli oligoospermi ve

azoospermik hastalarda tablo 8.3'te gösterildiği gibi yararlıdır.

Sadece dolaşımdaki FSH seviyelerini düşündüğümüz zaman oligoospermi ya da azoospermi ile ilgili birkaç pratik sonuca ulaşabiliriz. Bunlar aşağıda belirtilmiştir;

- Normal FSH: Değişim posttestiküler (obsrüktif) ya da testiküler (normogonadotropik hipogonadizm) şeklinde olabilir.
- Post testiküler ise hormonal tedavi gerekmemekte ve fertilizasyon vazektominin geri döndürülmesi ya da ICSI (konjenital bilateral vaz deferens yokluğu gibi) aracılığıyla epididimal ya da testiküler (TESE) aspirasyonla sağlanabilir[61]. Eğer değişiklikler testiküler ve androjen rezistansını gösteriyorsa hormonal tedaviler hasta için yararlı olabilir. Bu olmazsa, olgu mastürbasyonla (oligoospermik ise) sperm elde edilerek ya da TESE (azoospermik ise) ve ICSI için yönlendirilir[62].
- Düşük FSH: Değişim hipotalamik ya da hipofizyel olabilir. Tedavi buradaki primer patolojilerin düzeltilmesini içerir. Simültane hormon tedavisi bazen Kallman Sendromu gibi durumlarda gereklidir.
- Yüksek FSH: Öykü ve karyotip incelemesi bu hastalarda kesin tanının konulmasında yararlı olabilir. Tedavi etiyoloji ve ejakülat ya da testisteki sperm varlığına bağlı olacaktır[63]. Uygun sperm bulunduğunda, fertilizasyon ICSI ile gerçekleştirilebilir. Eğer bulunamazsa, çiftler donör semeni kullanmak zorunda kalacak ya da evlatlık edinmek için aile hekimine başvuracaklardır.

ÜREME SİSTEMİNİN GÖRÜNTÜLENMESİ

Erkek üreme sisteminin değerlendirilmesinde pek çok görüntüleme yöntemi olsa da anomaliler için en sık kullanılanı ultrasonografi[64] ve nükleer manyetik rezonans (MR)[65] incelemeleridir. Bilgisayarlı tomografi, hem iyonizan radyasyon içermesi hem de manyetik rezonans görüntüleme ya da transrektal ultrasonografi (TRUS) ile kıyaslandığında daha etkili olmaması nedeniyle daha az endikedir. Günümüzde vazografi giriş sahasında risk oluşturabilmesi açısından çok az kullanılmaktadır. Bununla birlikte vaz deferens yaralanması ile ilgili bir şüphe olduğunda ya da önceki herni onarımına bağlı klinik şüphe varsa seçilecek inceleme modelidir.

Tablo 8.3: *Serum hormon seviyeleri ile oligoospermi ve azoospermi etiyolojisinin orijini arasındaki ilişki*

Oligospermi ya da azoosperminin tipi	Serum hormon seviyeleri
Post testiküler (obstrüktif)	
Vazektomi	FSH, LH ve testosteron sıklıkla normal
Vaz deferensin konjenital bilateral yokluğu	
Pretestiküler (sıklıkla hipotalamik ve hipofizer hastalıklarda görülüp hipogonadotropik hipogonadizm ismini alır)	Düşük FSH ve sıklıkla düşük LH ve testosteron
Testiküler (hipergonadotropik hipogonadizm)	
Genetik sendromlar (Klinefelter, myotonik distrofi)	
Embriyolojik malformasyonlar (inmemiş testis)	Artmış FSH, değişken LH ve testosteron
Sitotoksik ilaçlar (kemoterapi)	
Viral hastalıklar (kabakulak)	
Testiküler (normogonadotropik hipogonadizm)	Normal FSH, artmış LH ve testosteron
Androjen rezistansı	Normal FSH, LH ve testosteron
Sertoli cell only sendromu ve matürasyon arresti	Normal FSH, LH ve testosteron
Y kromozom mikrodelesyonları	

FSH, Folikül stimüle edici hormon; LH, Luteinizan hormon.

Skrotum

Dikkatli bir hekim, hastalar ayakta iken sıcak bir odada, skrotum içindeki bütün yapıları muayene edip gözlemleyebilir. Bunlar testiküler ve epididimal volüm, testisin içeriği ve regülaritesi, vaz deferensin varlığı ya da yokluğu ve çapları ile varikosel olarak bilinir. Son dönemlerde, subklinik varikosellerin infertilitedeki rolü tartışmalı olduğu için[66] ve fizik muayene ihtiyacımız olan bilgileri verdiğinden skrotal yapının görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilmesi sık olarak kullanılmamaktadır. Bunun bir istisnası, kısa skrotumu olan ya da obez hastaların değerlendirmesinde yardımcı olacağı için görüntüleme yönteminin kullanılmasıdır.

Duktal obstrüksiyon

Her ne kadar deferensiyal kanalların komplet obstrüsiyonu oldukça nadir de olsa tedavi edilebilir olmasından dolayı değerlendirilmelidir[67]. Bu durumda, en iyi görüntüleme yöntemi yüksek frekanslı transrektal ultrasongrafidir (TRUS). Bunun nedeni bu görüntülemenin prostat, seminal veziküller ve ejakülatuvar kanalların mükemmel görüntülerini vermesinden dolayıdır[68]. Bu yöntem aynı zamanda basit, kolaylıkla ulaşılabilen ucuz bir incelemedir. Diğer bir görüntüleme yöntemi MRI olup rektal probla ya da rektal prob olmadan yapılabilir. Her ne kadar bu yöntem oldukça iyi sonuçlar verse de her istenildiğinde kolay ulaşılamaz ve oldukça pahalıdır. Bununla birlikte, TRUS'un aksine MRI muayenede ayrı bir beceri gerektirmemektedir[69].

Normal skrotuma sahip ancak düşük ejakülat volümü (< 1 ml) olan ve seminal sıvıda fruktozun olmadığı hastalar, semen koagülasyon bozukluğu ya da büyük olasılıkla komplet ejakülatuvar kanal obstrüksiyonuna sahiptirler. TRUS incelemesi yapıldığında geniş ejakülatuvar ve/veya seminal vezikülleri olan (anteroposterior çapı 1.5 cm'den büyük) yapıları gösterebilirler. Ancak, normal vezikül çaplarının duktal obstrüksiyon olasılığını ekarte edemeyeceği akılda tutulmaldır. TRUS kılavuzluğu altında seminal sıvı aspirasyonu ve vezikülografi yapılabilir[70]. Seminal vezikülde çok sayıda bulunan spermatozoa tanıyı kesinleştirir. Komplet ejakülatuvar kanal obstrüksiyon tanısının konulması nispeten kolay olarak kabul edilirken inkomplet kanal obstrüksiyonu tanısı bazı araştırmacılarında belirttiği çok kolay değildir. Başka klinik yada laboratuvar bulguları olmadan sadece düşük ejakülat volümü ile başvuran oligoospermik ya da astenozoospermik hastalar parsiyel obstrüksiyon açısından incelenmelidir. Bu hastalarda, seminal sıvının iğne ile aspirasyonu özellikle ejakülasyonu takiben hızla yapıldığında önemli olmaktadır. Bunun nedeni, parsiyel obstrüksiyonun seminal vezikülden eflüksü bozmasına neden olmasından dolayıdır. Bu durumda, çok sayıda sperm, aspirasyon sıvısında bulunacaktır.

Hipofizer bez

Erkek infertilitesinde intrakraniyal bilgisayarlı tomogafi ya da MRI yapılmasını gerektiren en yaygın endikasyon hipogonadotropik hipogonadizm tanısını ortaya çıkarmak için hipofiz bezinin incelenmesidir[65]. Hipogonadizm, infertilite etiyolojisinde oldukça nadir bir neden olsa da, gonadotropin yetmezliği ile ilişkili olup özel incelemeyi gerektirmektedir. Hipogonadizm infertilitenin düzeltilebilir bir kaç nedeninden bir tanesidir.

VARİKOSEL

Varikosel pampiniform pleksusustaki dilate venlere bağlı olarak anormal skrotal volüm artışı olarak tanımlanmaktadır. Her ne kadar erkeklerin %15-25'sinde görülse de infertil erkekler arasındaki prevalansı %40'a kadar ulaşmaktadır[71,72]. Hastaların çoğu asemptomatik olmasına rağmen bazıları fiziksel aktiviteler ya da uzun süreli ayakta kalmaya bağlı olarak gelişen ağrı yakınması ile başvurabilirler. Bununla birlikte, ağrı yakınması supin pozisyonunda geçmekte olup bu durum hastaların neden sabahları ağrı yakınması olmadığını açıklamaktadır.

Tanı, sıcak bir odada (>23 C) dikkatli bir fizik mauyene ile ayakta iken yapılabilir. Valsalva manevrası öncesi pleksusu pampiniformisin palpasyonu saptandığında tanı doğrulanıp varikosel, dilatasyonun derecesine göre grade I, grade II ve grade III olarak yapılır.

- Grade I varikoselin gözle görülmesi zordur ancak valsalva manevrası ile kolaylıkla palpe edilir

- Grade II varikosel gözle görülür ve valsalva manevrası sırasında da şişlik olduğu saptanır.
- Grade III varikosel kolaylıkla görülür ve valsalva manevrası sırasında yüksek reflü bulunmaktadır.

Literatürde yeterli kanıtlarla gösterildiği üzere varikosel testislerde makroskopik, mikroskopik ve fonksiyonel değişiklikler oluşturmaktadır[73,74]. Varikosel, genellikle sol tarafta daha sık ve daha erkenden ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni, aynı tarafta internal spermatik venin anatomik farklılıklar nedeniyle aynı tarafa dönüşünün daha zor olmasındandır[75,76]. Makroskopik değişiklikler, bu hastaların sıklıkla geç başvurmalarından dolayı adelösanlarda daha belirgindir. Bu gecikme, erişkinlerde iki testis arasında 2 ml'den fazla olan testiküler asimetriye yol açar[77,78].

Histolojik olarak varikoseli olan hastalar matürasyonel eksiklikler göstermekte olup bunlar adlüminal kompartmandaki yapısal organizasyon bozuklukları, spermatogenezin değişik aşamalarında matürasyon arresti, desmozomların kaybı, spermatidlerin lümene erken salınması şeklindedir. Bunlar seminifer tübül epitelinin incelmesi ve tübülüs lümeninin artmasına bağlı olarak meydana gelmektedir[79,80].

Venöz ektazi, interstisyel ve intratübüler kompartmanda görülebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), çok merkezli bir çalışmada varikoseli olan ya da olmayan genç hastaları değerlendirmiştir. Bu çalışma, varikosel hastalarının düşük testosteron seviyelerine sahip olduğunu bunun da leydig hücre disfonksiyonu ve steroidogenez bozukluğunu karakterize ettiğini belirtmiştir. Seminifer tübülüsteki değişiklikler seminal parametrelerde değişimlere yol açarak sperm konsantrasyonları, motilite ve normal morfolojide azalma yapabilir[81]. Ayrıca, varikoselli hastalardan elde edilen spermlerin zona pellusidaya bağlanmasının zayıf olduğu kanıtlanmıştır[82].

Varikoselin testisler üzerine olan olumsuz etkisi bir kaç dekat önce klinik[83,84] ve deneysel çalışmalarla[85] gösterilmiştir. Günümüzde her ne kadar bir kaç teori ortaya atılsa da hala venöz reflü ve ektazinin tam olarak testiküler bozukluğa yol açtığı kanıtlanamamıştır.

Etiyoloji

Testiküler kan akımı ve hipertermi

Varikoselin etiyopatogenezinde testiküler kan akımını içeren teori oldukça önemlidir. Bununla birlikte pek çok çelişki hala tam olarak açıklanamamıştır[87,88]. Bazı çalışma grupları, kan akımındaki bu artışın varikosel tek taraflı olsa bile iki taraflı olarak görüldüğünü göstermişlerdir[89]. Testiküler kan akımındaki değişikliklere rağmen bunun varikosel ile olan ilişkisi direk olarak tanımlanamamıştır. Artmış kan akımının hipertemi ile ilişkili olduğunun düşünülmesi önemlidir. Bu durumda, karşı taraftaki yapılarında nöronal ve hormonal mekanizmalarla benzer bir cevap vereceği düşünülebilir.

Testiküler hipertermi varikoselli olgularda sekonder değişiklikler ile ilişkili en önemli mekanizma olarak düşünülebilir[90]. Skrotum 5 önemli anatomik yapı sayesinde sıcaklığı vücut sıcaklığından daha aşağıda tutmaktadır. Bunlar;

1. Dartos kası
2. Kremaster kası
3. Counter-current olarak adlandırılan ısı değişim sistemi
4. Adipoz dokunun yokluğu
5. Bazı ter kanallarının varlığı

İki sistem ısı düzenlenmesinde temel rol oynamaktadır. Skrotal sistem, dartos ve kremaster kası yardımı ile counter-current sistemindeki ısı değişimini düzenler. Bu sistem, arteriyel sistemdeki ısıyı venöz dönüş sırasında ısı değişimi ile kontrol ederek dengeyi sağlar[90]. Varikosel, ısı değişim mekanizmasını bozar ve bundan dolayı arteriyel kan testise girmeden soğutulamaz. Kan akımındaki bu değişim testisi düşük sıcaklıkta korumayı önler.

Testiküler ısıda artış doğrudan spermatik germ hücrelerini etkileyerek Sertoli hücrelerinin fonksiyonunu, DNA sentezini, apopitosis oranını, besin içeriğini ve testis çevresindeki oksijenizasyonu bozup enzimatik aktiviteyi azaltarak arteriyovenöz şantın artışına bağlı olarak vasküler değişikliklere yol açar[91,92]. Yüksek testiküler ısı, androjenik supresyonla da ilişkili olup spermatogenezin değişik evrelerini değiştirerek düşük sperm konsantrasyonlarına yol açabilir[93].

Spermatogenezis ve apopitosis

Spermatogenezis sürekliliği proliferatif bir işlem olup hergün milyonlarca spermin üretimine neden olmaktadır. Apopitosis ya da programlı hücre ölümü hem patolojik hem de fizyolojik şartlarda görülmekte ve fertil yada infertil erkeklerde gametogenez sırasında saptanmaktadır. Apopitosis nükleer DNA fragmantasyonu ile ilişkili olup[94] spermatogenez boyunca spermatogonia, spermatositler ve spermatidlerde görülmektedir[95].

Apopitosis süreci geniş olarak çalışılıp dökümante edilmiştir[96-102]. Her ne kadar ısı artışı, androjen azalması ve toksik maddelerin testiste birikiminin apopitosisi artırdığı bilinse de varikosel modellerinde varikoselin indüklediği apopitosis ile ilgili moleküler mekanizmaların çalışılmasına ihtiyaç bulunmaktadır[103].

Apopitosisin indüklediği DNA fragmantasyonu son zamanlarda bir çok farklı teknikle değerlendirilmiştir. Bunlar arasında TUNEL (terminal deksinükleotid transferaz aracılı dUTP) ve Cmet (yada tek hücre jel elektroforezis) tayinleri kayda değer yöntemlerdir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, grade II ve grade III varikoselli adelösanlarda, DNA fragmantasyon oranlarının anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir[104].

Sperm hareketi

Varikoseli olan birçok erkek düşük sperm hareketi ile başvururken bu durum diğer sperm parametrelerindeki değişikliklerle birlikte olabilmektedir[105]. Birçok çalışmada düşük sperm hareketine yol açan üç temel neden gösterilmiştir. Bunlar:

1. Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) artması,
2. Antisperm antikorlarının varlığı ve
3. Mitokondrial aktivitenin azalmasıdır[106].

ROS konsantrasyonu sperm hareketi ile ters orantılıdır[107]. Her ne kadar ROS normalde hücrede var olup düşük konsantrasyonları gerekli ise de aşırı ROS üretimi lökospermi ve artmış anormal sitoplazmik artık gibi bozukluklarla ilişkilidir[108]. Varikosel tanısı olan erkekler yüksek ROS konsantrasyonları ve düşük antioksidan kapasite ile başvurabilirler[109]. Bu durum, önemli bir mitokondrial koenzim olan Q1O'un[110] düşük konsantrasyonuyla mitokondrial oksidatif fosforilasyonun defektif olduğu göstermektedir. Aynı zamanda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazın da yetersiz olduğunu göstemektedir[114].

Sperm morfolojisi

Sperm morfolojisinde varikosel ile ilişkili klasik değişiklikler füziform formlar ve amorf şekillerde artış şeklinde olsa da[112] katı kriterler ile tayin edilen son veriler normal sperm morfolojisinde azalma olduğunu göstermiştir[113]. Her ne kadar varikosel ile ilişkili sperm anomalileri fuziform yapıda ve amorf hücrelerde artış oduğunu gösterse de[112] yakın zamanda yapılan çalışmaların sonuçları normal sperm morfolojisinde de azalma[113] olduğunu göstermiştir. Kadmiyuma maruz kalanları içeren değerlendirmeler bu maddenin testis üzerine olumsuz etki yaptığını ve HSP (heat shock protein)'nin ekspresyonunu artırdığını gösterimiştir. HSP proteinlerinin aktin koruyucu ya da aktinin polimerizasyonunun inhbitörü olup olmadığı henüz bilinmemektedir[114]. Varikoseli olan hastalar yüksek kadmiyum konsantrasyonlarına maruz kaldıkları için gelecekteki çalışmalar HSP'nin sperm morfolojisine nasıl etki ettiğini anlamamızı sağlayabilir.

Diğer bir önemli nokta da spermatik hücrelerin orta kısmında sitoplazmik damlacıkların görülmesidir. Varikoseli olan hastalardaki bu bozukluk daha sonra düşük sperm motilitesine yol açmaktadır[115].

Varikoselli hastalarda akrozom reaksiyonunun belirlenmesi de önemlidir. Akrozom reaksiyonu ile ilgili fonksiyonel testler yapılmalı ve zona pellusidaya olan bağlanması değerlendirilmelidir. Varikoseli olan adelösanların varikoseli olmayanlarla kıyaslandığı bir çalışma, bu hastalardaki spermlerin zona pellusidaya bağlanma kapasitesinin azalmış olduğunu göstermiştir (hemizona tayini, HZA)[82].

Akrozom reaksiyonu

Varikosel hastalarındaki sperm fonksiyonlarında olan değişikliklerin sperm morfolojisi ve konsantrasyonlarından daha önemli olduğu görünmektedir. Bu durum, akrozom reaksiyonu ve zona pellusida bağlanmasını içermektedir[116].

Varikoselli olgulardan alınan spermler, kalsiyum giriş mekanizmasının bozuk olduğunu da göstermiştir[117]. Metaller gibi kofaktörler bu değişimi artırabilirler. Metallerin etkilemesi sonucu oluşan değişiklikler normal bir semen analizinden infertiliteye kadar gidebilen değişiklikleri içerebilmektedir. Bu farklılıklar kalitatif ve kantiatif protein ekspresyon değişiklikleri ile açıklanabileceği için çalışmalar bu defektteki şüpheli genleri bulmak üzerine kurulmalıdır[118].

Akrozom reaksiyonu, kalsiyum bağımlı olup birkaç motil sperm bu ekzositozu tamamlamaktadır[119]. Kolesterol salınmasını takiben kalsiyum iyonları hücre içine girer ve mannoz reseptörlerinin eksternalizasyonunu stimüle ederek miyozin aktivitesi ile ekzositozu başlatırlar[117]. Kalsiyum girişi voltaj bağımlı kanallar tarafından kontrol edilir[120]. Varikoselli hastaların kalsiyum kanallarındaki porlarda aminoasit azalması gösterilmiştir. Bu bozukluk, sonuçta infertilitenin genetik nedenini oluşturabilir. Bu kanallar, çevresel birtakım ajanlarla değiştirilebilir[121]. Testiküler kadmiyum konsantrasyonu varikoseli olan erkeklerde çinko konsantrasyonundan düşük olduğu için kadmiyumun kalsiyum kanallarını negatif olarak etkilediği öne sürülmüştür[18]. Varikoselektominin yada çinko verilmesinin bu kanallarda kadmiyumun etkisini geri çevirip çevirmediği henüz bilinmemektedir[106].

Varikosel ile spermatogenez arasındaki ilişkinin anlaşılmasında oldukça büyük ilerlemeler sağlanmasına rağmen bazı tartışmalar hala devam etmektedir. Prospektif olarak yapılacak çaışmalar sadece erkek infertilitesinde varikoselin intrinsik mekanizmasının anlaşılmasını değil aynı zamanda pek çok tedavinin yapılmasına da olanak sağlayacaktır.

AZOOSPERMİ

Santrifüj sonrası seminal sıvıda spermin komplet olarak bulunmaması olarak tanımlanır. Azoospermi, erkek inertilitesinde çok önemli bir konu olup özel bir ilgiyi gerektirmektedir. Bu patoloji tüm ekeklerin %1'inde ve infertil erkeklerinde %15'inde görülmektedir[122,123]. Azoospermi ile ilgili ilk konu gerçekten azoospermi ile mi yoksa şiddetli oligoospermi ile mi ilgilendiğimizdir. Bu iki durum arasında farklılık yalnızca bir mantık değil aynı zamanda temel bir sorundur. Bunun nedeni, birkaç spermatozoa görülmesinin bile genetik baba olup olmamayı sağlamasından kaynaklanmaktadır.

Özellikle, 1992 yılında, ICSI'nin uygulanmasıyla bu durum daha da önemli hale gelmiştir. Bu nedenle, WHO kılavuzları spermatozoa bulunamazsa bütün semenin 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilmesini önermektedir. Böylece pellet incelenmelidir[52]. Dahası başlangıçta azoospermik olarak değerlendirilen bir olguda sonraki spesimende sperm bulunması da beklenmedik bir şey değildir[124]. Bundan dolayı, azoospermi iki ayrı semen örneğinde dikkatli bir inceleme yapılmadan önce kesin bir şekilde tanımlanmamalıdır.

Azoospermi, çeşitli nedenlere bağlı olarak oluşur ve öykü, fizik muayene, hormon profili genetik ve görüntülme çalışmaları sadece azoospermiye neden olacak sebebin değil aynı zamanda en iyi tedavi modelinin ortaya konulmasını da sağlayabilir. Bazı etiyolojik faktörler potansiyel olarak düzeltilebilir. Buna karşın, bazı bozukluklar geri dönüşümsüz olsa da erkek eşten alınan spermler ile yardımcı üreme yöntemleri kullanılarak tedavi edilebilir. Bazı bozukluklar ise geri dönüşümsüz olup hiçbir tedaviye yanıt vermez ve bunlar donör semeni ya da evlatlık alma için yönlendirilebilir.

Bu bölüm azoospermi ile ilgili olacak spesifik durumları değerlendirip tartışmaktadır.

Küçük testislerle birlikte olan azoospermi

İki taraflı küçük testislerle ilişkili azoospermi primer ya da sekonder testiküler nedenlere bağlı olarak oluşabilir. Bu iki klinik durumla ilgili ayırıcı tanı endokrin testlerle yapılabilir. FSH ve LH seviyeleri yüksek olup düşük serum testosteron düzeyleri olan hastalar primer testiküler yetmezlik olarak kabul edilmektedir. Bu olgular, sperm hücreleri ya da leydig hücrelerinde bozukluğu olan hastalardır. Artmış gonadotropin seviyeleri primer testiküler yetmezliğin hipotalamik-hipofizer nedenlerden ayırımını sağlar. Klinefelter sendromu ve bu bozukluğun farklı kombinasyonları primer testiküler yetmezliğin tipik örnekleridir. Bu değişiklikler karyotip örneklemesi ile kontrol edilir. Bu durum azoospermiklerin %14'ünde görülür[125]. Öte yandan bazı azoospermik hastalar artmış FSH ile birlikte normal testosteron ve LH seviyeleri ile başvurabilirler. Bu olgular, total hipogonadal bozukluk göstermezken bu tablo primer testiküler yetmezlikli hastalar gibi düşünülür ve klinik olarak tedavi edilemez hastalar olarak kabul edilirler. Düşük FSH, LH ve testosteron seviyeleri ile

başvuran hastalarda sekonder hipogonadizm düşünülebilir. Bu olgular, farklı şekillerde başvurmakta olup spesifik tedavilerin bu hastalar için uygun olabileceği söylenebilir. Konjenital ya da edinsel hipogonadotropik hipogonadizm infertilite kliniklerinde nadiren görülmektedir. Bununla birlikte, görüldüklerinde, hipofizer hormonların yetmezliği açısından kontrol edilmelidir (tiroid stimülan hormon, adrenokortikotropik hormon ve büyüme hormonları)[126].

Gonadotropin seviyelerinde değişme ve beraberinde anozmi ve hipozmi de olan hastalar Kallman sendromunu düşündürmektedir. Bu durumda, görsel test, serum prolaktin ölçümleri ve hipofizer bölgenin radyolojik incelemelerini içeren nörolojik değerlendirme hipofizer fossadaki adenomu ortaya çıkarabilir. Hipoandrojenizasyon ve impotans olmadan prolaktinemi olması çok sık rastlanan bir durum olmasa da hiperprolaktineminin herhangi bir hipotalamik ya da hipofizer lezyon olmadan görülebileceğinin akıldan çıkarılmaması gerekmektedir.

Konjenital vaz deferens yokluğu

Toplam 3 mm kalınlığında olan vaz deferens, fizik muayenede kolay tanındığı için tek taraflı ya iki taraflı vaz deferens agenezisi kolaylıkla anlaşılmaktadır. İleri tanısal yöntem ya da cerrahi eksplorasyon yapılması tanı için gerekli olmayıp bazen başka anomalileri göstermek için yapılabilir. İki taraflı konjenital vaz deferens agenezisi olan erkeklerin yaklaşık olarak %10'u ve tek taraflı agenezisi olan hastaların ise %25'inde abdominal ultrasonogafi ile gösterilen renal agenezi bulunmaktadır[127]. Dahası, seminal veziküller ve vaz deferens Wolf kanalından oluştuğu için bu hastalarda değişik derecelerde seminal vezikül anomaliler de beklenebilir. Vaz agenezisi nedeniyle transrektal ultrasonografi incelemesine (TRUS) gönderilen pek çok hastada seminal vezikül hipoplazisi ya da agenezisi gözlenecektir. Benzer embriyolojik nedenler için tek taraflı vaz deferens agenezisi olan hastaların neden kontrlateral segmental vaz deferens anormalliği olduğunu ya da azoospermi ile birlikte seminal vezikül anomalisi olduğunu açıklamak olasıdır. Seminal vezikül açısından konjenital bilateral vaz deferens agenezisi olan olgular düşük ejakülat volümü, düşük fruktoz içeriği ve semen PH'ına sahiptirler.

Konjenital bilateral vaz deferens açısından diğer bir önemli klinik bulgu da bu bozukluğun kistik fibrozis transmembran regülatör geni (CFTR) ile olan ilişkisidir. Kistik fibrozisi olan hastaların hemen hemen tamamı konjenital bilateral vaz deferens agenezisi ve konjenital bilateral vaz deferensi olan olguların ise %70'i CFTR genine sahiptirler. Bunun yanında, rutin laboratuvar incelemelerinin iki taraflı konjenital vaz deferens olgularında CFTR genini göstermeyebileceği ve dolayısıyla tanının ekarte edilemeyeceği unutulmamalıdır.

CBVDA olan hastalarda, değerlendirmeler sonucu %100 CFTR genini içermeyeceğini söyleyemeyiz. Bu hastaların eşlerinin de CFTR gen mutasyonları açısından incelenmesi gerekmektedir. Kadınların bu geni taşıma oranları %4 civarınadır[130].

Obstrüksiyon/spermatogenez yetersizliğine bağlı azoospermi

Bilateral testiküler atrofi ve vaz agenezisi ekarte edildiğinde azoosperminin reprodüktif sistemin herhangi bir yerindeki tıkanıklığa ya da yetersiz sperm üetimine bağlı olarak gelişebileceği düşünülmelidir. Azoospermi etiyolojisini saptamak için FSH ölçümleri, ejakülat volümü ve testiküler biyopsinin yapılması gerekebilmektedir.

Normal ejakülat volümü

Duktal ejakülatuvar kanal obsrüksiyonu ile spermatogenez bozukluğu olan olgularda bile normal ejakülat volümü olacağından sonraki aşama FSH ölçülmesi olmalıdır. FSH seviyeleri yüksekse (normal limitlerin 2 kat üzerinde olması) bu hastanın şiddetli germ hücre ve sertoli hücre disfonksiyonuna sahip olduğunu göstereceğinden tanı için testiküler biyopsiye gerek yoktur. Bununla birlikte, ICSI için testiküler sperm alnması düşünülüyorsa prognostik gidişi öngörmek için başlangıçta testiküler biyopsi endike olabilir. Öte yandan, hastalara biyopsi sırasında sperm bulunmasının sonraki ICSI işleminde de sperm bulunacağı anlamına gelmediği hatırlatılmalıdır. Bu nedenle, yüksek FSH varlığında testiküler biyopsinin rolü tartışmalıdır. Bununla birlikte, normal FSH seviyeleri olan hastalarda testiküler biyopsi tanısal amaçlı olarak yapılmalıdır. Bunun nedeni, normal FSH seviyesinin normal spermatogenezin garantisi olmamasındandır. Testiküler biyopsi hastanın durumuna göre tek ya da

iki taraflı olarak yapılabilir. Tek taraflı olarak yapılırsa testiküler biyopsinin iyi olan testiste yapılması tercih edilmelidir.

Testiküler biyopsi hem standart açık insizyon tekniği hem de perkütan yöntemlerle yapılabilir. Genel anestezi altında yapılan cerrahi biyopsi testiküler dokunun histolojik incelenmesi ve kriyoprezervasyon için yeterli doku alınmasını sağlamaktadır. Alınan taze semen örneğinde sperm görülmesi tekrar cerrahi işlem yapılmasından kaçınmayı sağlamaktadır. Normal testiküler histoloji olduğu doğrulanırsa semen yolunun herhangi bir safhasında obstrüksiyonun lokalizasyonu saptanabilir.

Vazektomi, tartışmasız duktal obstrüksiyonun en yaygın nedenidir. Bu işlemden sonra gelişen bilateral epididimal obstrüksiyon, obstrükstif azoosperminin en yaygın nedeni olarak düşünülür ve mikroskopik cerrahi eksplorasyon dilate epididimal tübülleri gösterebilir.

Düşük ejakülat volümü

Azoospermi ve düşük ejakülat volümü (<1 ml) gibi patolojiler gonadotropin yetmezliği, konjenital bilateral vaz deferens agenezisi ya da ejakülatuvar kanal obstrüsiyonlarına (EDO) bağlı olabilir. Ejakülasyon bozuklukları azoospermiye neden olmayıp daha çok oligoospermi ile birlikte aspermi ve hipospermiye neden olmaktadır.

Semende pH ve fruktoz konsantrasyonu gibi ilave parametrelerin incelenmesi seminal kanal total EDO (ejakülatuvar kanal obstrüksiyonu) varlığını gösterebilir. Bunun nedeni seminal veziküllerin fruktoz içeren alkalinizan konsantrasyona sahip olmalarıdır. Bununla birlikte semen pH ve fruktoz sonuçlarının uygun şartlarda alınmadığında yanılgılara yol açabileceğine dikkat edilmelidir. EDO tespit edilmesi sonrası seçilecek yol transrektal ultrasonogafi (TRUS) yapılmasıdır[70,131].

Vazografı alternatif bir yöntem olarak gözönünde bulundurulmasına rağmen TRUS minimal invaziv olup vazografi ile ilgili olası riskleri içermemektedir. Bu bölümün okurları, daha ayrıntılı bilgi için reprodüktif sistemin görüntülenmesi bölümünü okumalıdırlar.

GENETİK DEĞERLENDİRME

İnfertil erkeklerde genetik değişiklilerin incelenmesi genellikle şiddetli oligoospermi ve obstrüktif olmayan azoospermi ile konjenital iki taraflı vaz deferens yokluğuna bağlı gelişen azoospermide yapılmalıdır. Genetik değişikliklerin kökenini anlamak için yapılan en sık testler karyotip incelenmesi, Y kromozomu mikrodelesyonları ve kistik fibroz genlerindeki mutasyonlardır. Genetik incelemeler ayrıca varikosel ve inmemiş testislerde de tavsiye edilir. Bunun nedeni birden fazla etkenin olması olasılığındandır.

Karyotip

Birkaç dekattır infertil erkeklerde, fertil erkeklere kıyasla yapısal kromozom anomalilerin daha fazla olduğu bilinmektedir[132]. Bunlar sperm konsantrasyonunu olumsuz olarak etkilemektedir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %5(%2-8)'inde kromozomal değişiklikler bulunmasına[132,134] rağmen bu oran azoospermik grupta %15'e kadar çıkmakta ve bu durum çoğunlukla 47XXY anöploidisine ya da Klinefelter sendromuna bağlı oluşmaktadır. Klinefelter sendromu, şiddetli infertil erkeklerde en sık görülen sendromdur[135]. 47XXY karyotipine sahip erkeklerin hemen hemen hepsi azoospermik iken 46XY/47XXY mozaik erkeklerin ejakülatlarında minimal oranda ejakülat bulunabilir. Testiküler sperm elde edilmesi sırasında (TESE) 47XXY erkeklerde %50 oranında sperm bulunur[136] ve bunların çoğu 23,X ya da 23,Y olup 24 XX yada 24XY hücrelerinde artış şeklinde olabilir. Azoospermik erkeklerde kromozomal anomalilerin çoğu seks kromozomları ile ilişkili iken resiprokal ve Robertsonian translokasyonlar, inersiyonlar, duplikasyonlar ve delesyonlar gibi çok sayıda anomali de tanımlanmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda, normal yöntemlerle çocuk sahibi olanların ICSI gibi yöntemlerle çocuk sahibi olanlarla karşılaştırılması sonucu ICSI ile çocuk sahibi olanlarda gebelik süresince prenatal olarak artmış seks kromozomal anomalilerinin olduğu saptanmıştır[137]. Bu anomalilelere sahip olduğu bilinen erkeklerle ilgili olarak artmış abortus riski, genetik ya da konjenital anomalilerle doğma riski olduğu bildirilmiştir. Bundan dolayı, azoospermi ya da şiddetli oligoospermi ile gelen hastalarda ICSI öncesi karyotip analizi yapılması gerekmektedir.

Y-Kromozom mikrodelesyonları

Tieplo ve Zuffardi'nin[140] orijinal çalışmalarından bu yana pek çok çalışma erkek infertilitesi ile Y kromozomumun uzun kolu arasındaki ilişkiyi (Yq) göstermiştir.[141,142]. Karyotip incelemesi, bu mikrodelesyonları göstermeyeceği için polimeraz zincir reaksiyonu gibi (PCR) moleküler teknikler kullanılmalıdır.

Bu lokalizasyonda, spermatogenezis ile ilgili AZFa, AZFb ve AZFc olmak üzere 3 adet loküs bulunmakta olup bunlar azoospermi faktörleri olarak isimlendirilirler. İnfertil erkeklerde pek çok aday gen tespit edilmiştir: DBY ve USPY9 AZFa'da saptanmıştır[143,144]. Bundan başka, RBMY1 AZFb'de[145] ve DAZ'da AZFc'de[146] saptanmıştır. Diğer genler, Yq'de saptanmış ancak bunların AZF genine katkıları henüz bilinmemektedir. Y kromozom mikrodelesyonları azoospermi ve şiddetli oligoospermi ile karakterize olan primer testiküler yetmezliğe neden olabilirler.

Y mikrodelesyonlarının %60 kadarı AZFc bölgesinde görülürken %15'i AZFb ve %5'i de AZFa bölgesinde görülmektedir[141]. Diğer %20'lik kısım ise birden fazla AZF bölgesini kapsamaktadır. İnfertil erkeklerin %10-15'i Yq mikrodelasyonları ile başvurmaktadır[142]. Şiddetli oligoospermili hastalarda bu oran %18'e idiyopatik azoospermide ise %20'ye kadar çıkmaktadır. Mikrodelesyonun görüldüğü bölge, spermatogenezisin nasıl etkilendiği hakkında da bilgi vermektedir. AZFa mikrodelesyonları, germ hücrelerinin komplet yokluğu ile karekterizedir. Bu sendrom, Sertoli Cell Only Sendromu olarak bilinmektedir. AZFb mikrodelesyonları, matürasyon arrestini gösterir. Son olarak AZFc mikrodelesyonları AZFa ve AZFc'nin aksine spermatogenezisin diğer spesifik fazları ile ilişkilidir. Fenotipik değişiklikler, azoospermiden oligoazoospermiye kadar değişebilir[147]. AZFa ve AZFb mikrodelesyonlarının görülmesi testislerden sperm elde etme şansını azalttığı için obstrüktif olmayan azoosperminin değerlendirilmesinde Y mikrodelesyonların araştırılması önemlidir[148]. Varikosel ve inmemiş testis gibi klinik durumlar ile ilişkili önemli sperm değişiklikleri olan erkekler Yq mikrodelesyonları ile başvurabilirler[149-151].

AZFc mikrodelesyonlarını taşıyan hastalar her zaman azoospermik değildirler. Bundan dolayı, testis ya da ejakulatta sperm elde edilip ICSI için aday olabilirler. Bu hastalarda, Y kromozom ilişkili sperm, mikrodelesyonlarla transporte olabilir. Bu nedenle, bu hastalardan doğan çocuklar benzer mikrodelesyonları taşıyabilirler[152-154]. Son dönemde yapılan bazı çalışmalarda, Yq mikrodelesyonlarına sahip hastalardan doğan çocuklarda gonadal değişiklikler ve Turner Sendromu (45, X0)'nun artmış olduğu bildirilmiştir[155-158]. Bu durum, önemli etik tartışmaları da beraberinde getirmektedir.

Obstrüktif olmayan azoospermi ve şiddetli oligoospermisi olan hastalar testiküler lezyonlar belirgin olsa bile ICSI'nin bu mikrodelesyonları çocuğa aktarma riski olacağı için Yq mikrodelesyonları açısından incelenmelidirler. Öte yandan, sperm sayısı $10x10^6$ ve üzerinde olan hastaların incelenmesine gerek bulunmamaktadır. Bunun nedeni, bu hastalarda Yq mikrodelesyonlarının son derece nadir olmasıdır.

CTFR geni

Kistik fibrozis (CF) yerlilerde en sık görülen otozomal resesif hastalık olup etkilenen kişi prevalansı 2500 doğumda bir olarak bidirilmektedir. Etkilenenler içerisinden her 25 kişiden biri asemptomatik heterozigottur. CF, kistik fibroz transmembran regülatör geninin (CFTR) kodlanmasındaki mutasyona bağlı olarak gelişmektedir. CTFR genindeki en sık rastlanan mutasyon, fenilalaninin 508 (Δ508) pozisyonundaki delesyonudur. Bununla birlikte, CTFR online data tabanında (www.genett.sickkids.on.ca/ctfr) görüleceği üzere 1000'in üzerinde mutasyon tanımlanmıştır. Konjenital bilateral vaz deferens agenezisinin (CBVAD) bulunduğu olguların bir kısmında inkomplet ya da orta erecede CF olduğu gözönünde bulundurulmalıdır. Bu erkeklerin yaklaşık %70-80 kadarı CTFR mutasyonları için heterozigotturlar[159,160]. CBVAD ile ilişkili bir diğer mutasyon inron 8'de olan 5 adet timin'in varlığıdır. Bu 5t allelini düzenlemektedir. Bu değişiklik ekzon 9'un transkripsiyonunun oluşmamasına yol açar ve buna bağlı olarak CFTR düşük seviyede kalır[161]. CBVAD, infertil erkek olguların %1.5'inde tanınır. Heterozigotik mutasyonların çoğu (%60) karışık mutasyonlardır (CFR geninin her kopyası için farklı mutasyolar)[162]. Konjenital olarak vaz deferensin tek taraflı agenezisi (CUAVD) de CFTR mutasyonları ile ilgilidir. Her ne kadar bu hastalarda, mutasyonların prevalansı oldukça farklılık gösterse de (%10-73)[163,164], CUAVD'nin görülmesinin CFTR proteininin defektif üretiminin olması ile ilişkili

olduğu ortaya konulmuştur. Bundan dolayı, CFTR gen mutasyonları olan hastaların klinik görünümleri azoospermik yada oligospermik olup sırası ile CBAVD ve CUAVD ile ilişkili olabilir. Bu hastalarda normal spermatogenez olabileceğinin akılda tutulması önemlidir.

Bu nedenle, bu hastalar epididim ya da testisten sperm elde edilmesi sonrası ICSI için adaydırlar. Bu hastaların eşleri CFTR mutasyonu için heterozigot ise bunların çocukları da klasik kistik fibrozis görülmesi açısından risk taşımaktadırlar. Bu nedenle, hastalar CBAVD ya da CUAVD ile başvururlarsa her iki çift CFTR gen mutasyonları açısından uygun genetik inceleme yapılarak değerlendirilmelidirler.

SONUÇLAR

İnfertil çiftlerin %30'unda izole erkek faktörünün olmasını bekleyebiliriz. Erkek ve kadının birlikte olduğu faktörler %20 oranındadır. Her ne kadar erkek faktörleri, infertil olguların %50'sini oluştursa da erkek infertilitesindeki patolojik mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Buna göre, bu hastalar etiyolojik tanıdan çok idiyopatik oligoastenoteratozoospermi olarak tanımlanmaktadırlar. Sonuç olarak, gonadotropin yetmezliği hariç tedavide belirgin bilimsel bir kanıt bulunamamaktadır. Özellikle ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinin kullanılması kuraldır ve hekimler ile hastalar son amaç olarak gebelikten ziyade infertilitenin nedenine odaklanmalıdırlar. İnfertilitede var olan durumu geri çevirmek ve altta yatan mekanizmayı ortaya çıkarmak için erkek faktörünün tanısında kullanılan araçlara, protein ve gen kökenli tedavilerle yeni kapılar açacak olan genetik ve post reseptör mekanizmaların vurgulanmasına itiyacımız bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Thonneau P, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1.850.000) of three French regions (1988-1989). Hum Reprod 1991; 6: 811
2. Palermo G, er al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocytc. Lancet 1992; 340: 17
3. Stein ZA. A woman's age: child bearing and child rearing. Am J Epidemiol 1985; 121: 327
4. Sharlip ID, et al. Best practice policies for male infertility. Fertil Sceril 2002; 77: 873
5. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation: effects on the probability of conception, survival of pregnancy, and sex of the baby. N Engl J Med 1995; 333: 1517
6. Goldenberg RL, White R. The effect of vaginal lubricants on sperm motility in vitro. Fertil Sreril 1975; 26: 872
7. Tagatz GE, Okagaki T, Sciarra JJ. The effect of vaginal lubricants on sperm motility and viability in vitro. Am J Obstet Gynecol 1972; 113: 88
8. Tulandi T, Plouffe L Jr, Mclnnes RA. Effect of saliva on sperm motility and activity. Fertil Steril 1982; 38: 721
9. Gorelick JI, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. Fertil Steril 1993; 59: 613
10. Whitehead ED, Letter E. Genital abnormalities and abnormal semen analyses in male patients exposed to diethylstilbestrol in utero. J Urol 1981; 125: 47
11. Klip H, et al. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: A cohorr study. Lancet 2002; 359: 1102
12. Sharpe RM, Environment, lifestyle and male infertility. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2000; 14: 489
13. Thompson ST. Preventable causes of male infertility. World J Urol 1993; 11: 1 VI
14. Lee PA. Fertility in cryptorchidism: does treatment make a difference? Endocrinol Metab Clin North Am 1993; 22: 479
15. Pollack R, Nyhus LM. Complications of groin hernia repair. Surg Clin North Am 1983; 63: 1363
16. Wantz GE. Complications of inguinal hernial repair. Surg Clin North Am 1984; 64: 287
17. Lynn, HB, Johnson, WW. Inguinal herniorrhaphy in children. Arch Surg 1961; 83: 573
18. Sparkman RS. Bilateral exploration in inguinal hernia in juvenile patients. Review and appraisal. Surgery 1962; 51: 393
19. Bartsch G, et al. Testicular torsion: Late results with special regard to fertility and endocrine function. J Urol 1980; 124:375
20. Anderson JB, Williamson RC. Fertility after torsion of the spermatic cord. Br J Urol 1990; 65: 225

21. Hadziselimovic F, et al. Testicular histology in children with unilateral testicular torsion. J Urol 1986; 136: 208
22. Karam GH, et al. Assymptomaric Chlamydia trachomatis infections among sexually active men. J Infect Dis 1986; 154: 900
23. Werner CA. Mumps orchids and testicular atrophy, occurrence. Ann Intern Med 1950; 32: 1066
24. Emanuele MA, Emanuele NV. Alcohol's effect on male reproduction. Alcohol Health Res World 1998; 22: 195
25. Kucheria K, Saxena R, Mohan D. Semen analysis in alcohol dependence syndrome. Andrologia 1985; 17: 558
26. Sofikitis N, et al. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. J Urol 1995; 154: 1030
27. Kolodny RC, et al. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use. NEnglJ Med 1974; 290: 872
28. Bracken MB, et al. Association of cocaine use with sperm concentration, motility, and morphology. FertilSteril 1990; 53: 315
29. George VK, et al. Effects of long-term cocaine exposure on spermatogenesis and fertility in peripubertal male rats. J Urol 1996; 155: 327
30. Alen M, Reinila M, Vihko R. Response of serum hormones to androgen administration in power athletes. Med Sci Sports Exerc 1985; 17: 354
31. Dohle GR, Smit M, Weber RF. Androgens and male fertility. World J Urol 2003; 21: 341
32. Jarow JP, Lipshultz LI. Anabolic steroid-induced hypogonadotropic hypogonadism. Am J Sports Med 1990; 18:429
33. Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR. Baseline prolactin and L-tryptophan availability predict response to antidepressant treatment in major depression. Psychopharrnacology (Berl) 2003; 165: 216
34. Endres G. Clinical approaches to male infertility with a case report of possible nifedipine-induced sperrn dysfunction. J Am Board Fam Pract 1997; 10: 131
35. Aaberg RA, et al. Effects of extracellular ionized calcium, diltiazern and cAMP on motility of human spermatozoa. J Urol 1989; 141: 1221
36. Hommonai ZT, Shilon M, Paz GF. Phenoxybenzamine - an effective male contraceptive pill. Contraception 1984; 29: 479
37. Delaere KP, Strijbos WE, Meuleman EJ. Sulphasalazine-induced reversible male infertility. Acta Urol Belg 1989; 57: 29
38. Fukushima T, et al. Effects of sulfasalazine on sperm acrosome reaction and gene expression in the male reproductive organs of rats. Toxicol Sci 2005; 85: 675
39. Van Thiel DH, ct al. An evaluation of the antiandrogcn effects associated with H2 antagonist therapy. Scand J Gastroenterol Suppl 1987; 136: 24
40. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. Eur Urol 1993; 23: 136
41. Giwercman A, Petersen PM. Cancer and male infertility. Bailliere's Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2000; 14: 453
42. Spitz S. The histological effects of nitrogen mustard on human tumours and tissues. Cancer 1948; 1: 383
43. Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. Hum Reprod Update 2001; 7: 363
44. Chung K, et al. Sperm cryopreservation for male patients with cancer: an epidemiological analysis at the University of Pennsylvania. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 113(Suppl 1): S7
45. Petersen PM, et al. Dose-dependent impairment of testiculat function in patients treated with cisplatin-based chemotherapy for germ cell cancer. Ann Oncol 1994; 5: 355
46. Brougham ME, et al. Male fertility following childhood cancet: cutrent concepts and future therapies. Asian J Androl 2003; 5: 325
47. Naysmith TE, et al. Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future? Hum Reprod 1998; 13:3250
48. Pont J, Albrecht W. Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancer. Fertil Steril 1997; 68: 1
49. Kedia KR, Markland C, Fraley EE. Sexual function following high retroperitoneal lymphadenectomy. J Urol 1975; 114:237
50. Jewett MAS, et al. Retroperitoneal lymphadenectomy for testis tumor with nerve sparing for ejaculation. J Urol 1988; 139: 1220
51. Fossa SD, et al. Post-treatment fertility in patients with testicular cancer. 1. Influence of retroperitoneal lymph node dissection on ejaculatory potency. Br J Urol 1985:57:204
52. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. New York: Cambridge University Press, 1999
53 Jeyendran RS, Interpretation of Semen Analysis Results. A Ptactical Guide, 1st edn. Cambridge: Cambridge University Ptess, 2000
54. Means AR, et al. Follicle stimulating hormone, the Settoli cell and spermatogenesis. Recent Prog Horm Res 1976; 32: 477
55. Bergmann M, Behre HM, Nieschlag E. Serum FSH and testicular morphology in male infertility. Clin Endocrinol 1994; 40: 133
56. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterohe-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. J Clin Endocrinol Metab 1981; 53: 58
57. Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the tcstcs and male reproductive tract. In Wilson JD, Foster DW, eds. Textbook of Endocrinology, 17th cdn. Philadelphia: WB Saunders, 1985: 259
58. Carter JN, et al. Prolactin-secreting tumors and hypogonadism in 22 men. N Engl | Med 1978; 299: 847

59. Jouanet P, et al. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. 1. Study of sperm concentration. IntJ Androt 1988; II: 379
60. Burini AS, et al. A low sperm concentration does not preclude fertility in men with isolated hypogonadotrophic hypogonadism after gonadotropin therapy. Fertil Steril 1988; 50: 343
61. De Croo I, et al. Fertilization, pregnancy, and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. Hum Reprod2000; 15; 1383
62. Devroey P, et al. Pregnancies after tesricular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1995; 10: 1457
63. Jezek D, Knuth UA, Schulze W. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. Hum Reprod 1998; 13: 1230
64. Kuligowska E, Fenlon HM. Transrectal US in male infertility: spectrum of findings and role in patient care. Radiology 1998; 207: 173 65-
65. Parsons RB, et al. MR imaging in male infertility. Radiographics 1997; 17: 627 66.
66. Eskew LA, et al. Ultrasonographic diagnosis ofvaricoceles. Fertil Steril 1993; 60: 693 67-
67. Jarow JP. Transrectal ultrasonography of infertile men. Fertil Steril 1993; 60: 1035
68. Littrup PJ, et al. Transrectal US of the seminal vesicles and ejaculatory ducts: clinical correlation. Radiology 1988; 168:625
69. Schnall MD, et al. The seminal tract in patients with ejaculatory dysfunction: MR imaging with an endotectal surface coil. AJRAm J Roentgenol 1992; 159:337
70. Belker AM, Steinbock GS. Transrectal prostate uitrasonography as a diagnostic and therapeutic aid for ejaculatory duct obstruction. J Urol 1990; 144: 356
71. PryorJL, Howards SS. Varicoccle. Urol Clin North Am 1987; 14:499
72. Meacham RB, ct al. The incidence of varicoccles in the general population when evaluated by physical examination, gray scale sonography and color Doppler sonography. J Urol 1994; 151: 1535
73. Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. J Urol 1994; 152:788
74. Sigman M, Jarow JP. Ipsilateral testicular hypotrophy is associated with decreased sperm counts in infertile men with varicoceles. J Urol 1997; 158: 605
75. Shafik A, Bedeir GA. Venous tension patterns in cord veins. I. In normal and varicocele individuals. J Urol 1980; 123:383
76. Buschi AJ, et al. Distentcd left renal vein: CT/ sonographic normal variant. AJR Am J Roentgenol 1980; 135:339
77. Haans LC, et al. Testis volumes, semen quality and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele. Fertil Steril 1991; 56: 731
78. Sawczuk IS, et al. Varicoceles: effect on testicular volume in prepubertal and pubertal males. Urology 1993;41:466
79. Dubin L, Hotchkiss RS. Testis biopsy in subfertile men with varicocele. Fertil Steril 1969; 20: 51
80. Cameron DF, et al. Ultrastructural alterations in the adluminal testicular compartment in men with varicocele. Fertil Steril 1980; 33: 526
81. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. Fertil Steril 1992; 57: 1289
82. Cedenho AP, et al. Adolescents with varicocele have an impaired sperm-zona pellucida binding capacity. Fertil Steril 2002; 78: 1339
83. Chehval MJ, Purcetl MH. Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. Fertil Steril 1992; 57: 174
84. Villanueva-Diaz CA, et al. Sperm dysfunction in subfertile patients with varicocele and marginal semen analysis. Andrologia 1999; 31: 263
85. Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. Hum Reprod Update 2001; 7: 78
86. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. Hum Reprod Update 2001; 7: 473
87. Saypol DC, et al. Influence of surgically induced varicocele on testicular biood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. J CHn Invest 1981; 68: 39
88. Ross JA, Watson NE Jr, Jarow JE The effect of varicoceles on testicular blood flow in man. Urology 1994; 44: 535
89. Green KF, Turner TT, Howards SS. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. J Urol 1984; 131: 1208
90. Dahl EV, Herrick JF. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. Surg Gynecol Obstet 1959; 108: 697
91. Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. Int J Androl 1995; 18: 169
92. Simsek F, et al. Role of apopitosis in testicular tissue damage caused by varicocele. Arch Esp Urol 1 998; 51:947
93. Lue Y, et al. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the 'two-hit' approach to male contraceptive development. Endocrinology 2000; 141: 1414
94. Batistatou A, Greene LA. Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. J Cell Biol 1993; 122: 523
95. Hikin AP, et al. Spontaneous germ cell apopitosis in humans: evidence for ethnic differences in suscepti-

bility of germ cells to programmed cell death. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 152
96. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. Science 1995:267: 1449
97. Lee J, et al. The Fas system is a key regulator of germ cell apopitosis in the testis. Endocrinology 1997; 138:2081
98. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer proteascs. Trends Biochem Sci 1997; 22: 299
99. Moll UM, Zaika A. Nuclear and mitochondria! apoptotic pathways of p53. FEES Lett 2001; 493: 65
100. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. Nat Med 2000; 6: 513
101. Antonsson, B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. Exp Cell Res 2000; 256: 50
102. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. Hxp Cell Res 2000; 256: 12
103. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apopitosis in human ejaculated sperm cells. J Submicrosc Cytol Pathol 1996; 28: 587
104. Bertolla RP, et al. Apopitosis and varicocele: sperm cell DNA fragmentation. J Urol 2003; (Suppl 1)169:417
105. Schlesinger MH, Wilets IF, Naglcr HM. Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis. Urol Clin North Am 1994; 21: 517
106. Marmar JL. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. Hum Reprod Update 2001; 7: 461
107. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. J Androl 1992; 13: 368
108. Aitken RJ, et al. Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. J Reprod Ferril 1992; 94:451
109. Barbieri ER, et al. Varicocelc-associated decrease in antioxidam defenses. J Androl 1999; 20: 713
110. Mancini A, et al. Coenzyme Ql 0 concentrations in normal and pathological human seminal fluid. J Androl 1994; 15: 591
111. Gagnon C, et al. Reactive oxygen species and human spermatozoa. Ann NY Acad Sci 1991; 637: 436
112. MacLeod J. Seminal cytology in the presence of varicocele. Fertil Steril 1965; 16: 735
113. Schatte EC, et al. Varicocelectomy improves sperm strict morphology and motility. J Urol 1998; 160: 1338
114. Kamengwa S, et al. Heat shock proteins: an autoprotective mechanism for inflammatory cells? Semin. Immunol 1991; 3: 49
115. Zini A, et al. Effect of varicocelectomy on the abnormal retention of residua! cytoplasm by human spermatozoa. Hum Reprod 1999; 14: 1791
116. Virgil P, et al. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. Andrologia 1994; 26: 55
117. Benoff S, et ai. The effect of calcium ion channel blockers on sperm fertilization potential. Fertil Steril 1994; 62: 606
118. Benoff S, et al. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. Fertil Steril 1997; 67: 336
119. BenofFS, et al. Classification of mate factor infertility relevant to in vitro fertilization insemination strategies using mannose U'gands, acrosome status and anti-cytosketetal antibodies. Hum Reprod 1996; 11: 1905
120. Benoff S, *ft* al. Variation in region [S6 of the L-type voltage-dependent calcium (Ca+2) channel (L-VDCC) alpha-1 subunit in testis and sperm: implications for role of cadmium (Cd+2) in varicocele-associatcd infertility (VAl). Fertil Steril 2000; 74: 555
121. Platt B, Busselberg D. Combined actions of Pb+2, Zn+2 and Al+3 on voltage-activated calcium channel currents**.** Cell Mol Neurobiol 1994; 14: 831
122. Willott CM. Frequency of azoospermia. Forensic Scilnt 1982; 20: 9
123. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. J Urol 1989; 142: 62
124. Odival T Jr, et al. Search and identification of spermatozoa and spetmatids in the ejaculate of non-obstructive azoospermic patients. Int Bra?. J Urol 2005:31:42
125. Rao MM, Rao DM. Cytogenetic studies in primary infertility. Fertil Steril 1977; 28: 209
126. Sokol RZ, Swerdloff RS. Endocrine evaluation. In Lipshultz LI, Howards SS, eds. Infertility in the Male, 3rd edn. St Louis: Mosby-Year Book, 1997: 210
127. Schlegel PN, Shin D, Goldstein M. Urogenital anomalies in men with congenital absence of the vas deferens. J Urol 1996; 155: 1644
128. Anguiano A, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. JAMA 1992; 267: 1794
129. Chillon M, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. N Engl J Med 1 995; 332: 1475
130. The Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urologicaf Association, and the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on evaluation of the azoospermic male. Fertil Steril 2004; 82 (Suppl): 131
131. Jarow JP. Seminal vesicle aspiration in the management of patients with ejaculatory duct obstruction. J Urol 1994; 152:899
132. Chandley AC. The chromosomal basis of human infertility. Br Med Bull 1979; 35: 181

133. Hargreave T. Genetically determined male infertility and assisted reproduction techniques. J Endocrinol Invest 2000; 23: 697
134. Gekas J, et al. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. Hum Reprod2001; 16: 82
135. de Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. Hum Reprod 1991; 6: 245
136. Palermo GD, et al. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. N Engl J Med 1998; 338: 588
137. Van Opstal D, et al. Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997; 12: 682
138. Meschede D, et al. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic spetm injection - prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. Hum Reprod 1998; 13: 576
139. Colombero LT, et al. Incidence of sperm aneuploidy in relation to semen characteristics and assisted reproductive outcome. Fertil Steril 1999; 72: 90
140. Tiepolo L, Xuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y-chromosome long arm. Hum Genet 1976; 34: 119
141. Foresta C, Moro E, Fcrlin A. Y-chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. EndocrRev2001;22:226
142. Pryor JL, et al. Microdeletions in the Y-chromosome of infertile men. N Engl J Med 1997; 336: 534
143. Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa-genes on rhe human Y-chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. Hum Mol Genet 2000; 9: 1161
144. Sun C, et al. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosornal gene USP9Y. Nat Genet 1999; 23: 429
145. ElHott DJ, et al. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y-chromosorne long arm. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 3848
146. Reijo R, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y-chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat Genet 1995; 10:383
147. Vogt PH. Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. Curr Pharm Des 2004; 10: 471
148. Hopps CV, et al. Detection of sperm in men with Y-chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. Hum Reprod 2003; 18: 1660
149. Moro E, et al. Y-chromosome microdeletions in infertile men with varicocele. Mol Cell Endocrinol 2000; 161:67 1 50.
150. Foresra C, et al. Y-chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 3660
151. Krausz C, et al. A high frequency of Y-chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 3606
152. Kent-First MG, et al. The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after incracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. Mol Hum Reprod 1996; 2: 943
153. Page DC, Silber S, Brown LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. Hum Reprod 1999; 14:1722
154. Oates RD, et al. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y-chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. Hum Reprod 2002; 17:2813
155. Siffroi JP, etal. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y-chromosome long arm deletions. Hum Reprod 2000; 15:2559
156. Jaruzelska J, et al. Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFc deletion. J Med Genet 2001; 38: 798
157. Papadimas J, et al. Ambiguous genitalia, 45,X/46,XY mosaic karyotype, and Y-chromosome microdeletions in a 17-year-old man. Fertil Steril 2001; 76: 1261
158. Patsalis PC, et al. Effects of transmission of Y-chromosome AZFc deletions. Lancet 2002; 360: 1222
159. Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. J Endocrinol Invest 2000; 23: 684
160. Casals T, et al. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. Hum Reprod 2000; 15: 1476
161. Chu CS, et al. Genetic basis of variable exon-9 skipping in cystic fibrosis transmembrane regulator mRNA. Nat Genet 1993:3: 151
162. Patrizio P, et al. Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. Hum Reprod 1993; 8:215
163. Dork T, et al. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. Hum Genet 1997; 100:365
164. Casals T, et al. Extensive analysis of 40 infertile patients with congenital absence of the vas deferens: In 50% of cases only one CFTR allele could be detected. Hum Genet 1995; 95: 205.

9

Temel Semen Analizi

Roelof Menkveld

Çeviri: *Fikret Erdemir*[*], *Uğur Boylu*[**], *Mete Kilciler*[***]

GİRİŞ

Erkeğin fertilite potansiyeli ile ilgili bilimsel yaklaşımın oluşturulması 1677 yılında van Leeuwenhoek'un Londra Royal Akademi'ye Johan Ham ile birlikte insan spermatozoasının keşfini tanımladıkları bir mektubu yazmaları ile başlamıştır. Schirren'e göre van Leeuwenhoek, sterilite şeklinde tanımlanabilen evlilik durumunda bu sorunun kimden kaynaklandığını tespit etmek için mikroskopik inceleme yapılmasının önemini ortaya koymuştur. Semen analizi ile ilgili daha bilimsel yaklaşım 19. yüzyılın sonunda oluşturulmuştur. Buna göre Lode[2], semen sayımını incelemeden önce hemositometre aracılığı ile dilüsyone etmiştir. Sonunda, araştırılan dört erkek olguda, ortalama sperm konsantrasyonunu $68.88x10^6$ olarak tespit etmiştir. Bundan sonra 1941 yılında Hotchkiss[3] sperm motilitesinin degerlendirilmesinde daha sonraları 1945 yılında Macleod ve Heim[4] tarafından da modifiye edilen bir derecelendirme sistemi bildirmiştir. Modifiye edilen bu sistemde sperm hareket ve progresif aktiviteleri ayrı ayrı kaydedilerek ileriye doğru olan hareket "0" ile "4" arasındaki skala ile belirtilmiştir. Sonraki dönemlerde Belding[5] günümüzde de kullandığımız semen incelemelerine katkıda bulunmuştur. Buna göre, spermdeki baş, orta kısım ve kuyruk anomalilerinin tek tek ya da kombine olarak belirtilebileceğini ifade etmiştir. Bu çalışmayı 1934 yılında, Williams'ın[6] spermin baş kısmındaki vakuollerin varlığı ile akrozomu tanımlamaları izlemiştir. Bahsedilen bu zaman aralığından sonra semen örneklerinin incelenmesi için çeşitli semen parametreleri ve standartlarını içeren farklı yöntemler bildirilmiştir[4,5'7-12]. Normal semen standartları ve semen analiz etkinliği 1951 yılında Amerika Fertilite Birliği tarafından oluşturulmuştur[13]. Bunu, özellikle, sperm morfolojisi gözönünde bulundurularak MacLeod ve Gold[14] ile Freund'un[15,16] 1960 yılındaki ve Eliasson'un[17,18] ise 1970 yılındaki katkıları izlemiştir. Semen analizinde en iyi standardizasyonu sağlamak için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kitapçığının ilk olarak 1980[19] yılında yayınlanmasından sonra bunu sırası ile 1987[20], 1992[21] ve 1999[22] yıllarındaki farklı basımları takip etmiştir.

Günümüzde olduğu gibi semen analizinin tam yapılmasının gerekliliği spermatoloji ve androloji gibi yardımcı üreme teknikleri (ART) alanındaki yeni gelişmeler ve zamana bağlı olarak değişikliklere uğramaktadır. Günümüzde tam bir semen incelemesi mikst antiglobulin reaksiyon (MAR)[23] ve lökosit peroksidaz test[24] gibi antisperm antikorlarını ortaya koyan tarama testlerini içermelidir. Ayrıca bu testler polimorfonükleer lökositlerin tanınmasını da hedeflemelidir.

[*] Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı.
[**] Tulane University, Department of Urology, New Orleans.
[***] Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.

Diğer testlerden olan sperm servikal mukus penetrasyon testi[25], preovulatuvar insan servikal mukusu ya da insan mukusunun sığır mukusu[26] ile yer değiştirmesi şeklinde; hyaluronatla[27] yer değiştirmesi şeklinde, sperm servikal mukus kontakt testi[28], zonası çıkarılmış hamster servikal mukus penetrasyon testi[29] ve hemizona testleri[30] şeklinde yapılmakta olup açıklanamayan gebelik ile yetersiz ART uygulamalarından sonra düşünülmelidir. Spermatozoanın DNA içeriği[31], akrozom reaksiyonu[32], özellikle lökositler olmak üzere spermatozoanın reaktif oksijen radikalleri (ROS) aktivitesi[33] ve seminal plazmanın antioksidan kapasitesi[34] gibi yeni geliştirilen testler son zamanlarda oldukça ilgi çekmektedirler.

Bununla birlikte yeni gelişme ve özellikle intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) gibi ART tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde McDonough[35] standart semen analizinin gelecekteki yeri konusunda kuşku duyduğunu belirterek şu ifadeyi kullanmıştır: Klinik bir test olan geleneksel semen analizi atalarımızdan kalan bir miras haricinde gelecekte bizim için hiçbir anlam ifade etmeyebilir. 1940'lı yıllarda uygulanan ve günümüzde sadece anılarımızda kalan laparatomi operasyonu gibi yalnızca bilen kişilerce sporadik olarak yapılan bir yöntem olarak kalabilir. Buna göre bazı şeylerin sonuna geldik. Geleneksel sperm analizi için bazıları geçmişi kazmak isteyecekler ya da buraya bir mozale koymamız daha iyi olacaktır.

Yukarıdaki düşüncelere aynen katılmak mümkün değildir. Özellikle ICSI olmak üzere invitro fertilizasyon (IVF) gibi yeni gelişmelerin ışığına ragmen semen analizi hem şimdi hem de gelecekte erkeğin fertilite potansiyelinin araştırılmasında çok önemli olacaktır. Bundan dolayı sperm analizinin uygun ve büyük bir beceri ile yapılması gerekmektedir. Hastanın kısa hikayesi gibi geçmişe ait veriler olduğunda infertil çiftlerin araştırılmasında erkeğin semeninin değerlendirilmesi önemli bir nokta olacaktır.

Tam bir semen değerlendirmesi dört gruba ayrılabilir. Bunlar (1) geçmişe ait veriler, (2) fizik muayene, (3) mikroskobik inceleme ve (4) ilave işlemleri kapsamaktadır. Biyokimyasal ve fonksiyonel testler ART yönteminin uygulanması ile olumsuz ve beklenmedik sonuçların alındığı durumlarda yapılmalıdır.

TEMEL SEMEN ANALİZİ

Sperm örneğinin alınması

Semen örnekleri, human immumodeficiency virüs (HIV), hepatit B ve herpes gibi mikroorganizmaları içermesi olasılığından dolayı tehlike taşımaktadırlar. Bundan dolayı semen örnekleri her zaman dikkatli bir şekilde toplanmalı ve infekte olma olasılığına karşı koruyucu maddeler takılmalıdır (eldiven, maske ve gözlük gibi). Daha fazla bilgi WHO'nun 1999'daki el kitabında verilmektedir[36].

Hastanın geçmişine ait veriler

Semen örneğinin tam olarak değerlendirilmesi için cinsel perhiz süresi ve spermin kullanıldığı kap gibi hastaya ait bazı bilgilerin bilinmesi gerekmektedir. Bu faktörler semen inceleme sonuçlarını etkileyebileceği için aşağıda tartışılmaktadır. Bu faktörler geçmiş ait veriler olarak adlandırılırlar ve semen örneği alınırken kısa bir tıbbi öyküyü de içermelidir.

Semen üretimi için yöntemler

Günümüzde semen analizinin bu konuda deneyimli bir ekip tarafından alınıp incelenmesi beklenmektedir. Gerekli olduğu zaman yapılacak olan spesifik testler için semen örneğinin uygun oda ve havalandırma koşulları iyi olan bir laboratuvarda verilmesi uygun olacaktır[37,38]. Bu durum semen üretimi ile değerlendirilmesi arasında kısa bir süre olması gibi bir avantaja sahiptir. Böyle bir durumda koagülasyon varlığı ve likefaksiyonun ortaya çıkması görülebilir. Aynı zamanda sperm elde edilme şekli de kontrol edilmiş olur. Hastaların birçoğu semen verme işlemini geri çekme yöntemi ile ya da evlerinde spermisidal kondom kullanarak yapmaktadırlar. Geri çekme yöntemi semen örneğinin kaybedilme olasılığı gibi bir olumsuzluğa sahiptir. Bir başka olumsuz yanı da geri çekme sırasında vajinal epitel hücreleri ile semenin kontamine olabilme olasılığıdır[38].

Hasta, semen örneğini laboratuvar ortamında verdiğinde hem hasta ile ilişki kurulup daha sağlıklı ve doğru bilgiler alınabilir hem de hastanın öğrenmek istediği konular kolaylıkla cevaplandırılır. Sıklıkla, semenin evde elde edilerek herhangi bir bilgi olmadan laboratuvara gertirilip sayıldığı görülmektedir. Bu şekilde, semen inceleme so-

nuçları tam olarak değerlendirilemez ve bununla ilişkili olarak sonuçlar, alınma biçimine bağlı olarak etkilenebilir. Bu durumda, cinsel perhiz süresi ve ejakulasyon zamanı ile ilgili bilgiler tam olarak alınamamaktadır.

Mastürbasyonla semen elde edilmesinde sorun olan ya da zorluk çeken hastalar için semenin laboratuvara ulaştırılması için oldukça farklı çeşitleri olan silastik (Seminal kolleksiyon aleti™, HDC corp., Milipitas, CA, USA)[39], polietilenden yapılan Seminal Pos™ (Mileks uretimi., Sikago USA), poliüretendan yapılan kondomlar (Erkek faktörü Pak™: Fertipro NV, Bernem, Belçika) ve komplet kitler (Hy-gen™) gibi özel kondomlar bulunmaktadır[22]. Normal lateks kondomlar spermidisal etkilerine bağlı olarak sperm motilitesini etkileyecekleri için kullanılmamalıdırlar. Bundan dolayı semen örnekleri mastürbasyonla temiz, plastik içerikli kaplara verilebilir. Aksi halde, örnekler laboratuvarda steril olarak ayrılmalıdır. Hasta, idrar yapması için bilgilendirilir ve ardından ellerini sabun ve su ile yıkamalıdır. Ardından, semen örneği vermeden önce penisi sadece su ile yıkamalıdır.

Hastaya cinsel perhiz süresi sorulup kısa tıbbi öyküsü alınmalıdır. Hastanin tıbbi öyküsü özellikle son üç ayda olmak üzere daha önce geçirmiş olduğu infeksiyon yada hastalıkları içermelidir. Kliniğe daha önce gelerek semen örneği verip vermediği sorulmalıdır. Ayrıca öyküsünde son üç aydaki anestezi uygulamaları ve ilaç alımları sorgulanmalıdır. Özelllikle mesane ve inmemiş testis ile ilgili olmak üzere orşiektomi, varikoselektomi, testiküler biyopsi yada testislere yönelik şiddetli yaralanmalar gibi ürogenital sistem operasyonları ve orşit öyküsü alınmalıdır. Bundan başka sigara içimi ve alkol kullanıp kullanmadığı akılda bulundurulmalıdır[40].

Semen kapları

Semen örneğinin incelenmesinde ilk yıllarda cam kaplar kullanılmasına rağmen virüs kontaminasyonu olasılığından dolayı bu uygulama günümüzde terk edilmiştir. Ayrıca bu kapların yıkama sırasında yada semen örneği alınırken kırılma olasılıkları bulunmaktadır [40]. İdeal kap 60-100 ml genişliğinde plastik ağızlı olup polipropilenden yapılmış olmalıdır. Ayrıca bu kapların kapağının döndürülebilir ve bu sayede semen örneğinin kaybolmasını engelleyecek şekilde sıkı olması gerekmektedir. Bizim deneyimimize göre bazı plastik tipleri (polistren) vizkoziteye yol açması, spermatozoa için toksik olması ve motiliteyi negatif olarak etkilemesi nedeniyle olumsuzluklara sahiptirler. Laboratuvara yeni taşıyıcı kapların gelmesinden önce bunların semen örneği ve ART sonuçları üzerine negatif etki edip etmedikleri test edilmelidir[39,40].

Cinsel perhiz

Cinsel perhiz süresinin özellikle semen miktarı ve konsantrasyonuna olan etkisi iyi bilinmektedir[41]. Bundan dolayı cinsel perhiz süresi optimum sonuçların alınması için standardize edilmiş durumlara göre tanımlanıp uygun cinsel perhiz aralığında yapılarak her bir sperm analizinin sonuçları ile karşılaştırılmalıdır. İnceleme bu şekilde yapılmazsa aynı kişide semen örneğindeki parametreler ile aynı hastada zaman içindeki normal varyasyonlar ve iki semen örneğinin farkı tam olarak anlaşılamayabilir. WHO kitabına göre 2-7 günlük cinsel perhiz süresi[42] çok uzun olup[42] 3-4 gün olarak standardize edilmiştir[40-43.] Günümüzde bu sürenin saat olarak tam şekliyle belirtilip belirtilmeyeceği tartışılmaktadır[42]. Rutin semen analizi için birkaç gün kabul edilebilir bir süre olmasına rağmen tibbi girişimler için belirli saatlerin olması tavsiye edilmektedir.

Semen örneğinin verilmesinden sonra bu örnek tam likefaksiyon görülene kadar 37 derecede inkübatörde saklanır. Alınan örnek daha sonra degerlendirilmesi için hazırlanarak daha fazla işlem için konik şekilli test tüpüne transfer edilir.

Fiziksel parametreler

Semen örneğinde görülen parametrelerin incelenmesi Freund[44] ve Zaneveld ve Palakoski[45] tarafından fiziksel parametreler ismiyle tanımlanmıştır. Bu tanımlama, renk, likefaksiyon ve vizkoziteyi içerirken koagülasyon ve koku gibi etkenler de bu sınıflamaya dahil edilebilir. Her ne kadar biyokimyasal parameter olduğu belirtilse de pH'da bu incelemelere dahil edilmektedir. Bu parametrelerin değerlendirilmesi basit ve kolay olup genellikle gözlemler ile ortaya konulur.

Koagülasyon

Koagülasyon semen analizinin önemli bir parçası olmasına rağmen genellikle pek çok araştırmacı tarafından gözardı edilmektedir. Bunun temel nedeni, pek çok semen örneğinin laboratuvar yerine evde hazırlanıp getirilmesinden kaynaklanmaktadır. Semen, ejakulasyon sırasında likefiye yapıda ol-

masına rağmen hızlı bir şekilde semisolid ya da koagulan yapıya dönüşür. Bu durum büyük olasılıkla seminal vezikülden salgılanan protein kinaz aracılığı ile olmaktadir[46]. Normal şartlarda hemen hemen bütün semen örneği koagüle olurken çok küçük bir parçası da likefiye olarak kalmaktadır. Bu bölümün genellikle semenin motil sperm içeren ilk kısmını içerdiği düşünülmektedir. Koagülasyonun oluşmadığı olgularda bu durum koagülan enzimlerin seminal veziküllerden kaynaklanmasından dolayı konjenital vaz deferens yada seminal veziküllerin yokluğuna bağlı olabilir. Ayrıca seminal plazmada bulunan fruktozun eksikliği ile de ilişkilidir.

Likefaksiyon

Normal semen örneğinde likefaksiyon 10-20 dakika içinde gerçekleşmektedir. Bu durum prostattan salgılanan fibrinolitik enzimler ile meydana gelmektedir[47]. Bunun yanında fibrinogenez ve aminopeptidaz olarak bilinen iki proteolitik enzim ile olmaktadır[48]. Likefaksiyon bu nedenle normal prostatik fonksiyonu gostermektedir.

Tam olarak gerçekleşen likefaksiyon sonrası semen örneği, homojen yapı ve renkte görünmektedir. Küçük yuvarlaksı partiküller bazı semen örneklerinde görülebilmesine rağmen bu durum normal olarak düşünülmelidir. Bu durum sıklıkla bir saat içinde çözünmektedir. Likefaksiyon süresinin 20 dakikanın üzerinde olması prostatın fonksiyonunun normal olmadığını göstermekte olup bu durum sıklıkla prostatitlere ikincil olarak gelişmektedir. Bazı olgularda, likefiye olmayan semen infertilite sebebi olabilmektedir. Bu patoloji spermatozoanın koagulumdan salınımının olmaması nedeniyle meydana gelecektir[40].

Viskozite

Yaklaşık olarak 1893 yılında Cary ve Hotchkiss[7] semenin içeriğini sudan daha vizkoz olarak tanımlamışlardır. Vizkoziteyi saptamak için en uygun yol modifiye pipet metodunun kullanılmasıdır[37]. Semen, Pastör pipetinden aşağı damlatılarak yavaşça serbestleştirilir. Pipetten 20 mm uzaklıkta tek bir damlanın serbestleşmesi normal olarak kabul edilir. Eğer bu durum olmaz ya da 20 mm'den daha uzun olursa viskozitenin artmış olduğu düşünülür[40].

Bundan başka likefaksiyondaki gecikme süresi (homojen olmayan görünüm) ile artmış vizkozitenin (homojen fakat yapışkan) ayırt edilmesi son derece önemlidir. Artmış vizkozite, seminal vezikül ve prostat gibi genital yapıların infeksiyonuna sekonder olarak anormal prostat fonksiyonunun ortaya çıkmasıyla oluşabilir[49]. Bu durum ayrıca, uygun olmayan saklama kaplarının kullanımı ya da hastanın sık ejakülasyon yapması gibi fizyolojik bir nedene bağlı olarak oluşmaktadır. Vizkozitenin kalıcı olarak artması infertilitenin in vivo oluşumunu engelleyen bir neden olarak her zaman gözönünde bulundurulmalıdır. Bu durum ayrıca, spermatozoa konsantrasyonu ve motilitenin olumsuz olarak etkilenmesine de neden olabilir[45].

Alfa amilaz ve kimotripsin gibi biyokimyasal yapılar semen vizkozitesini düşürmek için kullanılabilirken diğer bir yöntem de eşit miktarda fosfat-buffered salin ya da kültür medium gibi yapıların geniş pipetler aracılığı ile eklenmesidir[52]. Bu olgularda, ilave edilen sıvının oluşturduğu dilüsyon nedeniyle sperm konsantrasyonunun dikkatli ölçülmesi gerekliliği unutulmamalıdır[53].

Volüm

Semen volümünün ölçülmesinde günümüzde hala kullanılmakta olan yöntem semen örneğini 15 ml büyüklüğündeki konik tüpe koymak ve 0.1 seviyesine kadar olan yerlerde okumaktır. Volüm hesaplanması semen kabının boş ağırlığını ve ardından semeni koyup ağırlığı tespit ettikten sonra ikisinin farkının hesaplanması şeklinde de yapılabilir.

Ejakülatın normal volümü 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası 2-6 ml kadardır. Hotchkiss, semenin bu volümünün asidik vaginal sekresyonlara karşı olan etkisi açısından önemli olduğunu belirtmektedir[11]. Semen volümü 1 ml'den daha azsa semen örneğinin uygun olarak alınıp alınmadığının kontrol edilmesi önemlidir. Bu nokta semen örneğinin ilk kısmının en yüksek oranda sperm içermesi ve en yüksek motiliteye sahip olması dolayısı ile oldukça önemlidir. Düşük semen volümü genital sistemin daha önceki infeksiyonlarına yada konjenital bilateral vaz deferens ve seminal vezikül agenezisine ikincil olabilir. Bu durum fruktoz yokluğu ile ilişkili olacaktır[45]. Düşük volüm, hasta daha önce prostat yada mesane boynu cerrahisi operasyonları tanımlıyorsa retrograd ejakülasyonla ilişkili olabilmektedir. Retrograd ejakulasyon, ejakülasyon sonrası idrarın incelenmesi ile ortaya konulabilir.

Renk

Semenin dikkatli incelenmesi olası patolojileri ortaya koyması açısından önemli olabilir. Cary ve Hotchkiss, semenin normal rengini, opak, grimsi ve

cinsel perhiz süresinin artmasi ile sarımsı olarak tanımlamışlardır[7]. Hotchkiss, taze kanın semenin rengini kırmızımsı, eski kanınsa kahverengimsi yaptığını bildirmiştir[11]. İnflamasyonu olan hastalarda daha sarı renk gözlenebilirken düşük sperm konsantrasyonunun olduğu olgular saydam yada su görünümünde olacaktır. Schirren, antibiyotikler gibi bazı ilaçların semenin rengini değiştireceğini saptamışlardır.

Koku

Her ne kadar semen güçlü ve ayırt edici bir kokuya sahip olsa da prostattaki sekresyonlara bağlı olan bu parametreler değerlendirmede nadiren kullanılmaktadır. Bu koku, kestane ağacı çicekleri yada St. John ağacı kokusuna benzemektedir. Bu kokunun prostattan salgılanan spermin oksidasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Koku olmadığında yada karakteristik koku olmadığında bu durum sıklıkla infeksiyon[45] yada uzun dönemli cinsel perhizi[37] düşündürmektedir.

pH

pH ölçümleri, hijyen ve olası seksüel geçişli hastalıkların cam elektrod metodu kullanılmasıyla transfer riskinden dolayı özel pH ölçer kağıtlar aracılığı ile yapılmalıdır (6.4-8.0 arasında değişen, Merck#9557). Likefaksiyon sonrası bir damla semen örneği indikatöre konularak renk skalasında değerlendirilir. Ejakülatın normal pH'ı 7.2 ile 7.8 arasında değişmektedir[22].

Akut prostat, vezikülit ve iki taraflı epididimit durumlarında pH değeri her zaman 8.0'den büyük olacaktır[45]. Yukarıda bahsedilen organların kronik infeksiyonlarında, pH her zaman 7.2'nin altında ve olasılıkla da 6.6'nın altında olacaktır. Ejakülatuvar kanalların obstrüksiyonunda yada yalnızca prostatik sekresyonlar olduğunda pH 7.0'dan düşük olacaktır. Semen örneği, azoospermik ise bu durumda düşük pH, iki taraflı vaz deferens örneğini işaret edebilir[22].

Mikroskopik analiz

Semen hazırlığının incelenmesi

Fiziksel incelemenin tamamlanmasından sonra tüpler dönen yada "cradle" sistem olarak bilinen sallanan bir sisteme yerleştirilir. Bu işlem oda ısısında yada 37 derecede yapılır. Nazikçe karıştırılmayı takiben 10 dakika sonra pozitif basınçlı pipet ile semenden bir damla örnek alınır. Bu oluşum daha önce yıkanmış cam tüpe 37 derecede korunacak şekilde konulur. Semenden alınan damlanın boyu, kullanılan lamelin boyutuna bağlıdır. Sıvının derinliği mikroskop camı ile lamel arasında 20 mikrometredir. Standart damla boyu, 20x20 mm lamel için 10 µl olarak bilinir. Bu durum, spermatozoaya hem maksimum hareket hem de 40x büyütmede optimum görünme olanağı sağlar. Toplam 20x20 mm lamel için standart olarak kullanılan damla 10 µl olarak bilinir. Birçok çalışmada, değişik boyuttaki lameller ve uygun damla büyüklükleri için standart kılavuz tablolar tanımlanmıştır[22,39,53]. Hazırlanan materyalin incelemeden önce stabilize olması için birkaç dakika yerinde bırakılması gerekmektedir.

Genel görünüm Hazırlanan ıslak materyalin tamamı faz kontrast optiklerde incelenir. Önce 100x yada 150x olarak bilinen düşük büyütmede (10x ya da 15x objektiflerle) (LPF) daha sonra da 400x ya daha büyük büyütmede (40x objektifle) (HPF) incelenir. İnceleme mikroskop altında semen analizinin genel özelliklerini anlamak icin 10 LPF alanına bakılması ile başlar. Burada saptanan etkiler kaydedilir. Yeterli spermatozoa saptanırsa MAR testi[23], motilite az olduğunda vital boyama testi[54] gibi sonraki işlemler kaydedilir. Her bir HPF alanında görülen spermatozoaların toplam sayısı hesaplanır. Bu sayım semen konsantrasyonunun hesaplanması için örneğin dilüsyonunda kullanılılacaktır. Ayrıca damla büyüklüğü, sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için alınan örneğin hazırlanmasında kullanılır.

*Aglütinasyon ve diğer h*ücreler Semen örneği ayrıca sperm aglütinasyonunun değerlendirilmesi amacıyla da incelenir. İlk aşamada sperm aglutinasyonu spesifik olmayan faktörlere bağlı olarak oluşabilir. Çoğu olguda seminal plazmada motil olmayan spermatozoanın hücreye adezyonu görülür. Bu durum sözkonusu olduğunda agregasyon olarak adlandırılır[39]. İkinci olarak spesifik aglütinasyona bakılır. Bu aglütinasyon tipi motil spermatozoa kümeleri ile hafif oranda olan diğer hücre ve debristen oluşmaktadır[39]. Aglütinasyon negatif, nadir (+-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++)[40] olarak tanımlanır. Bunun haricinde uygun olmayan yüzde şeklinde ifade edilir ki bu da yaklaşık %5'lik oranı içermektedir. İnceleme sırasında, yuvarlak hücreler ve spermin fosfat kristtalleri gibi aglütinasyonda yer alan diğer hücrelerin olup olmadığı da incelenir. Ayrıca herhangi bir mikroorganizmanın olup olmadığı da kaydedilir.

Kalite parametrelerinin analizi

Bu parametreler pek çok araştırmacı tarafından semen analizinin komplet olarak yapılmasının sağlanması amacıyla gözönünde bulundurulmaktadır. Buna göre, bu araştırmalar sperm motilitesinin derecesi ve yüzdesini, sperm hareketi yetersiz olduğunda gerekli ise canlı olan hücrelerin yüzdesini saptamak için vital boyama yapılmasını içermektedir. MAR test[23] ve lökosit peroksidaz testi[24] rutin prosedür olarak düşünülür[55].

Motilite ve ileri hareket Günümüzde motilite iki şekilde tanımlanmaktadır. Birincisi, faz kontrast optiklerde semen örneğinin manuel olarak gözlenmesidir. Çok yakın dönemlerde otomatik bilgisayar yardımlı semen inceleme tekniği (CASA) değişik derecelerdeki başarı oranları ile tanımlanmıştır[22,39].

Manuel yöntem için hazırlanan lam örneği başlangıç incelemesinde kullanılır. Burada inceleme, WHO[22] ve Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji derneğinin (ESHRE) tanımladıkları gibi yapılır[53]. Başlangıç hazırlığı ile motilitenin görüldüğü zaman arasındaki süre uzunsa yeni hazırlık yapılmalı ve hazırlanan örneğin incelenmesi semen damlasının düşmesi kesilir kesilmez yapılmalıdır. Bu oluşum, bir dakika içinde görülmezse inceleme için yeni hazırlık yapılmalıdır[53].

Spermatozoa ileriye doğru olan ilerleyici hızına göre 4 kategoriye ayrılır. Bunlar aşağıda gösterilmiştir;

Grade a= İleri hızlı progresif motilite

Grade b=Yavaş ve yerinde progresif hareketli

Grade c=Progresif olmayan motilite

Grade d=Hareketsiz

Hızlı ve ilerleyici motilite için yapılan tanımlar incelemenin oda ısısında yada 37 derecede mikroskop altında yapılmasına bağlı olarak değişebilir. 37 derecede hızlı motilite için, spermatozoa saniyede 25 μm'nin üzerinde, oda ısısında ise saniyede 20 μm yada üzerinde ileriye doğru hareket etmelidir. Bundan başka 37 derecede hareket ederken 4 yada 5 baş büyüklüğünde hareket etmelidir[22]. İleri progresyon saniyede <5 baş büyüklüğü kadar ise hem oda ısısında hem de 37 derecede spermatozoanın nonprogresif yada grade c motilitesinde olduğu kabul edilmelidir. Bu sınırlar içerisinde spermatozoa, grade b yada yavaş ileri hareketli olarak düşünülmelidir.

En az 200 spermatozoanın, 5 ayrı yüksek büyütme alanında faz kontrast mikroskop yardımı ile sayılması gerekmektedir. Farklı kategorilerin yüzdesinin toplamı %100'e ulaşmalıdır. Bu sayım farklı hazırlanmış örneklerde tekrarlanmalıdır. Bu farklı sayımların sonuçlarının ortalamaları alınarak değerlendirilmelidir[53].

Kötü motilite yada astenozoospermiye pek çok faktör neden olabilmektedir. Bunlardan birkaçı sperm için toksik olan kondom kullanımı, vajinal sekresyonlarla kontamine olma, lubrikanların kullanılması[56,] tam olmayan örnek ve laboratuvara örnegin geç ulaştırılmasına bağlı olarak çevresel etkenlere ve ısıya maruz kalma gibi yanlış semen örneği toplama yöntemleri ile ilişkili artefaktlar olarak sıralanabilir. Artefaktlar, laboratuvarda soğuk ortamlarda muhafaza edilen toplayıcı kaplar ve pipetler ile farklı derecede uygun olmayan ortamda depolanan toplayıcı kaplara bağlı olarak oluşabilir[57,58]. Ayrıca hazırlanan örneğin uygun olmayan kalınlıkta olmasına bağlı olarak (<10 μm'nin altı) spermin serbest rotasyonel hareketleri bozulabilir[59]. Bozuk motilite, spermin orta kısmının yapısal anomalilerine[60] yada kısa kuyruk ve immotil silia ya da Kartagener sendromuna bağlı da olabilir[62]. Zayıf motilite ayrıca, spermatozoaların sertoli hücrelerinden serbestlenmesinden önce çevresel nedenlere ikincil olarak gelişen anomalilerine bağlı oluşabilir[63,64]. Bundan başka, epididimdeki transport[65] bozukluğu, akut infeksiyon yada aksesuar bezlerin inflamasyonuna bağlı olarak prostat ve seminal veziküllerin anormal fonksiyonları nedeniyle duktal sistemdeki normal iletimin azalmasına ikincil olarak oluşabilir. Zayıf sperm motilitesine neden olan diğer faktörler, hematospermi varlığı, varikosel, kromozomal bozukluklar, bakteriyel infeksiyonlar ve anormal pH[58,66] ile bazı metal ve metal iyonları şeklinde olabilir[67].

Sperm konsantrasyonu 1929 yılında Mcomber ve Sanders[68] tarafından günümüzde de oldukça iyi bilinen bir makalede yayınlanmıştır. Bu makaledeki sperm sayım tekniği günümüzde hala uygulanan birçok teknik için temel teşkil etmektedir. Burada, hematositometride, 1:20 dilüsyonluk beyaz kan hücresi pipeti yardımıyla eklenerek sayım yapılır. Dilüe sıvı, %52lik sodyum bikarbonat solüsyonu ile ardından ilave edilen %1'lik formalin solüsyonundan oluşmaktadır.

Yıllar içerisinde dilüsyonların hazırlanması için kullanılan pipetlerin değiştiği görülmüştür. Eliasson[18] 1:50, 1:100 ve 1:200 oranlarındaki dilüsyonları

sağlamak için beyaz hücre pipeti yerine mikropipetler kullanmıştır. Van Zyl[69], beyaz hücre pipeti yerine tüberkülin pipetini kullanmıştır. Bu yöntemle 1:10, 1:20 ve 1:100 oranlarında dilüsyon sağlamak mümkün olmaktadır. Menkveld ve arkadaşları[70] beyaz hücre pipet yöntemi ile tüberkülin pipetinin karşılaştırıldığı çalışmalarında oldukça başarılı sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. 1979 yılında Makler, sperm sayımında özel bir kamera geliştirmiş olup bu yöntem 1980 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Makler kamera ile dilüe olmayan semende doğrudan spermleri saymak mümkündür. Bu sayım, spermatozoanın 60 derecede sıvıda immobilizasyonu sonrası yapılmaktadır. Burada, sayım için standart hemositometre kullanılarak yapılan dilüsyonların hazırlığı kadar semenin miktarının tam olarak ayarlanması önemli değildir.

Her yüksek büyütme alanında gözlenen spermlerin sayısına göre 1:10, 1:20 ve 1:50 şeklinde dilüsyonlar yapılırken bazı laboratuvarlar 1:100 dilüsyonları da yapmaktadırlar[40]. Semenin transferi için pozitif değiştirmeli pipetlerin kullanılması önerilirken normal hava değiştirmeli pipetler dilüsyonel sıvıyı dağıtmak için tavsiye edilmektedir. Toplam 1:10 dilüsyon için 900 µm dilüsyonel sıvı küçük bir tüpe yerleştirilerek 100 µm semen örneği pozitif yer değiştirmeli pipetler aracılığı ile dilüsyonel sıvıya transfer edilir. Sperm solüsyonu vorteks ile karıştırılır ve Neubauer ile geliştirilmiş hemositometrinin iki tarafına dikkatli bir şekilde etrafa dökmeden kameranın üstüne doldurulur. Hematositometri, 10 dakika boyunca spermatozoanın kameranın en altına yerleşmesi için nemli Petri kabına konulur [40]. Santral çerçevenin en üstte sol tarafındaki blokta (16 bloktan oluşmaktadır) spermatozoalar, kırmızı kan hücrelerini saymak için kullanılır.

Referans tablosu için WHO[22] ve ESHRE[53] el kitaplarında 25 bloğun değerlendirilmesi gerektiği ve böylece en az 200'den fazla spermatozoanın sayılacağı bildirilmektedir. Sayım işlemi daha sonra diğer tarafta da yapılır. İki el kitapçığının[22,53] sağladığı tablolar kullanılarak başlangıçtaki dilüsyon ve hemositometrinin her iki tarafında sayılan bloklara bağlı olarak gerçek konsantrasyonlar saptanabilir. Bu arada, WHO ve ESHRE yöntemlerindeki el kitaplarına göre iki tablodaki konversiyon faktörlerinin farklı olduğunu unutmamak gerekmektedir. Elde edilen sayılar sonuçların kabul edilebilir sınırlar içinde olup olmadığını ortaya koymak için iki el kitabında elde edilen formüle göre karşılaştırılır. Sayılar normal sınırlar içinde değilse bütün sayım işlemi yeniden yapılır. Sperm konsantrasyonunun bilgisayarlı yöntemlerle (CASA) hesaplanması büyük kazanç sağlamış olup günümüzde laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır[23,39].

Sperm konsantrasyonu konusunda hangi değerin normal olarak kabul edilmesi konusunda farklı görüşler bulunmaktadır ve buna göre araştırmacılar farklı cut-off değerleri ortaya atmışlardır. Buna göre Macomber ve Sanders[68] $60x10^6$, Eliasson[18] $20x10^6$, MacLeod ve Gold[72] $20x10^6$ ve Van Zyl[69] ile Van Zyl ve arkadaşları da[73,74] $10x10^6$ değerlerini normal olarak kabul etmişlerdir.

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi 1999 WHO el kitabında[22] sperm morfolojisinin değerlendirilmesinin katı Tygerberg kriterlerine göre yapılması önerilmektedir. Tygerberg kriterleri aracılığı ile sperm morfolojisinin değerlendirilmesindeki prensipler Menkveld ve arkadaşları tarafından bildirilmiş olup[41] in vitro uygunluğuna göre klinik kullanımı Kruger ve arkadaşları tarafından yapılmıştır[77]. İn vitro fertilizasyon sonuçlarına göre strict kriterler prognostik kategorilere ayrılmıştır. Buna göre, normal spermatozoa morfolojisi <%4 ve altında olan hastalar kötü prognostik olarak adlandırılan P grubunu, sperm morfolojisi %5-14 arasında olan hastalar iyi prognostik olarak adlandırılan G grubunu ve spermatozoa yüzdesi >%14 ve üzeri olan hastalarda normal grubu oluşturmaktadırlar[76,77].

Katı kriterlere göre sperm morfolojisinin incelenmesine tam olarak yaklaşım temiz mikroskop camlarının hazırlanması, semen yaymalarının doğru hazırlanması, camların değerlendirilmesinin doğru yöntemlerle yapılmasi ile doğru optik ve büyütmelerin kullanılmasıyla başlar. Bundan başka, doğru sayıda spermatozoa değerlendirilmeli ve hepsinden daha önemlisi biyolojik kanıtlara göre normal spermatozoa morfolojileri kullanılarak değerlendirmeler yapılmalıdır. Ayrıca, bir yada daha fazla ekstra semen hazırlanması orijinal semen analizi uygun olmadığında kullanılabilmesi açısından önemlidir.

Spermatozoanın morfolojik olarak değerlendirilmesi Spermatozoanın morfolojik olarak değerlendirilmesi burada tartışıldığı gibi Menkveld[41] ve Kruger ile arkadaşları[76], Menkveld ve arkadaşları[75] ile Menkveld ve Kruger'in[78] tanımladıkları yöntem temelinde yapılır. Yağlanma ve kirlilik gibi durumlara bağlı olarak gerekli olduğunda camlar kullanılmadan önce tamamen yıkanmalı ve temizlenmelidir. Bunun için önce deterjan ile yıkanmalı, su ile çalkalandıktan sonra alkol ve ha-

vayla temizlenmelidir[78]. Yaymanın morfolojik olarak değerlendirilmesi için küçük semen damlası çok ince bir yayma şeklinde hazırlanmalıdır. Sonuç olarak her yağlı büyütme (1000 ya da 1250x) alanında 5-10 spermatozoa her biri ayrı ayrı görülecek şekilde olmalıdır. Semen damlasının büyüklüğü sperm konsantrasyonuna bağlıdır. Buna göre, yüksek konsantrasyon için küçük semen yayması (-5 µl), normal konsantrasyon için µl ve düşük konsantrasyonlar için de 15 µl'den fazla kullanılmamalıdır. Semen örnekleri uygun semen boyama yöntemleri ile yıkanmalıdır. Ayrıca, yayma ile oynanarak yaymanın kalınlığı mikroskop hızı ve camların açısı değiştirilerek kontrol edilmelidir[11,17].

Cam örnekler hava ile temizlenene kadar bir kaç dakika bırakıldıktan sonra metanol yada eter alkol ile (50:50) fikse edilip boyanana kadar saklanır. Semen yaymalarının değerlendirilmesi için modifiye "Papanicolaou yöntemi" tercih edilmelidir[23,39,75]. Bununla birlikte, hızlı kan boyama yöntemleri[80] ve spermatik boyama yöntemi[81,82] gibi alternatif boyama yöntemleri de bulunmaktadır. Spermatik boyama yöntemi ayrıca hızlı boyama yöntemi olup akrozom kısmı ve sperm kuyruğunun oldukça iyi boyanmasını sağlar[81]. Diff-Quik[80] gibi hızlı boyama yöntemleri, spermatozoanın yavaşça şişmesine neden olur ve böylece spermatozoada yavaş büyüme ile birlikte değişikliklere neden olabileceği gözönünde bulundurulmalıdır. Daha önceki boyamalarda boyanma için çok sayıda spermin cam üzerinde olması sorunlara neden olabilir.

Morfolojik olarak normal olan spermatozoa için kullanılan kriter postkoital test olarak ta bilinen ve ilişki sonrasında kısa sürede alınan servikal mukustaki spermin durumuna bakılarak belirtilir. Bu spermatozoalar çok az biyolojik varyasyonları olan oldukça homojen yapıdadırlar[75,78,84]. Strict Tygerberg kriterlerine göre[41,75] normal spermatozoa düzgün kontürlü oval yapı ve oldukça iyi görülüp tanımlanabilen akrozom ile homojen açık mavi boyanmayı içermektedir. Kuyruk kısmı, boyun/orta boyun kısmında anomalileri olmayan apikal yerleşimli olmalıdır. Kuyruk anomalileri ile kuyruk bölgesi yada boyun kısmında sitoplazmik anomaliler olmamalıdır. Anormal sitoplazmik artığın görülmesi ve normal sperm büyüklüğü Eliasson'un 1971 yılında tanımladığı gibi "Papanicolaou yöntemi" temelinde olur[17]. Normal akrozom, sperm anterior kısmının %40-70'sini kapsamalıdır. Anormal sitoplazmik artık ise sperm başının %50'sinden fazla olmamalıdır. Bu durum ölçümlere 3.0-5.0 µm uzunluğunda ve 2-3 µm genişliğinde olarak yansımaktadır. Orta kısım başın normal uzunluğunun 1.5 katından daha fazla olmamalıdır (1.5 µm kalınlığında olmalı). Kuyruk kısmı 45-50 µm olmalı ve keskin bandlar içermemelidir[17]. Tygerberg kriterlerine[41,75] göre morfolojik olarak normal şekilde sınıflanan spermatozoa için Eliasson'unda[17] kabul ettiği gibi tüm spermatozoanın normal olması gerekmektedir. Bununla birlikte, geçmiş yıllardaki çalışmacıların[14,15,17] aksine günümüzde sınırda yada hafifçe bozuk yapıda olan spermatozoa Tygerberg kriterlerine göre anormal olarak kabul edilmektedir[41,75].

Bununla birlikte, Eliasson ve diğer çalışmalar tarafından önerilen ölçümler[17] özellikle normal baş uzunluğu için 3-5 µm gibi geniş değerler olduğundan yeniden değerlendirilmelidir. Bizim deneyimimize göre mikroskopta, gözle mikrometre aracılığı ile yapılan ölçümde normal spermatozoanın baş uzunluğu 4-5 µm arasında değişmekte olup ortalama 4.07±0.19 µm ile genişliği ortalama 2.98±0.14 µm olarak saptanmıştır (Menkvel'in yayınlanmamış verisi). Bizler birçok çalışmada >5.0 µm ve üzerindeki baş uzunluğu ile geniş spermatozoa veya geniş akrozom ile başvuran erkeklerin invitro fertilizasyon sonuçlarının kötü olduğunu saptadık[76,85]. Ayrıca sperm fonksiyon kapasitelerinin de azaldığını farkettik[85].

Sitoplazmik artıkların varlığı, büyüklükleri ve terminolojileri hala tartışmalıdır. Orijinal olarak, Eliasson[17], WHO kitapçıkları[19,20] ve Menkveld ve arkadaşları[75] tarafından ortaya konulmuş olup buna göre, normal sitoplazmik artık spermatozoada normal sperm başından %50 daha az olmak üzere görülür şeklinde belirtilmiştir. Bu durum, 1999 yılındaki WHO el kitabında <%30 olarak değiştirilmiştir[22]. Son zamanlarda sitoplazmik artık varlığı ve büyüklüğü ile ilgili olarak Cooper ve arkadaşları[86] ile Cooper[87] çalışmalar yaparak doğru terminolojiyi kullanmışlardır. Cooper'un çalışmasında açıkça gösterildiği üzere hava ile temizlenmiş ve boyanmış semen yaymalarında spermatozoada sitoplazmik artık görülmesi bozulmuş sperm fonksiyonu ile ilişkilidir. Ayrıca, hem bu çalışmada hem de çalışmamızda[34] gösterildiği üzere sitoplazmik artığın hiçbir şekilde görülmüyor olması gerekmektedir. Buna göre sitoplazmik artık gözlenirse genişliğine ya da miktarına bakmadan anormal olarak kabul edilmelidir. Cooper'un çalışmasında[87], sitoplazmik materyal görüldüğünde bunun "fazla sitoplazmik rezidü" yada sadece "sitoplazmik artık" olarak kullanılmasının doğru olacağı belirtilmiştir.

En azından her bir karede 200 kadar spermatozoa 1000x büyük büyütmede ve tercihen 1250x büyük büyütmede incelenmelidir. İnceleme sırasında spermatozoanın boyutlarında şüphe olduğunda sperm boyutları mikrometre ile ölçülmelidir. Spermatozoa, tanının doğruluğunu arttırmak için yalnızca bir alanda değil birçok alanda değerlendirilmelidir[78].

En son WHO kitapçıkları[21,22] spermatozoanın yalnızca normal yada anormal olarak sınıflandırılması gerektiğini önermektedirler. Bu arada, spesifik bir anomali, %20 ve üzerinde görülürse not edilmelidir. Bununla birlikte, yukarıda belirtildiği gibi anormal spermatozoa yalnızca spesifik bir anomali yada 4'e kadar çıkan kombine anomaliler şeklinde olabilmektedir. Bunu ifade etmek için herbir spermatozoa anomalilerinin ortalama sayısı için teratozoospermi indeksi (TZI) oluşturulmuştur[21,22]. TZI değerleri 1 ile 4 arasındadır. Bununla birlikte, 1999'daki WHO el kitabında[22] sitoplazmik artıkların anormal olarak kabul edilmesi dışlanarak TZI değerleri 1 ile 3 arası olarak kabul edilmiştir. Bu, ESHRE kitapçığına zıt olup daha sonra bunun böyle olamayacağı ve 1 ile 4 arasında olması gerektiği belirtilmiştir[53.]

Semen sitolojisinin değerlendirilmesi Semen sitolojisinin değerlendirilmesi için mikroorganizmalar ve farklı hücrelerin araştırılması amacıyla kalın bir yayma hazırlanır. Bu arada cam yapının üzerindeki hücrelerin aderensini daha iyi değerlendirmek için küçük bir damla albuminli yumurta eklenebilir. Bununla birlikte aşırı yoğun albümin bazen, mevcut yuvarlak hücrelerin tanınmasını zorlaştırabilir. Yayma hızlı bir şekilde 1:1 oranında eter alkol solüsyonunda 30 dakika boyunca fikse edilir ve morfolojik değerlendirme için boyanır[78]. Daha sonra, kareler düşük büyütme altında (15x) ya da herhangi bir mikroorganizma ve hücre görüldüğünde daha iyi görüntü sağlamak için 40x büyütmede incelenir. Hücreler özellikle polimorfonükleer beyaz hücreler, monositler ve epitelyal hücreler açısından gözlenir. İyi bir boyanma ile birlikte prekürsör hücreler olarak adlandırılan germinal epitelyal hücreler saptanabilir. Özelllikle polimorfonükleer beyaz hücreler olmak üzere (WBC) saptanan diğer hücreler semikantiatif teknikle artı ve eksi değerleri ile birlikte ayrı ayrı kaydedilir. Buna göre hücre olmayışı/HPF-; nadir hücre/HPF ++; >10 üzeri hücre /HPF +++ olarak kaydedilir[78]. Bu şekilde saptanan WBC ile lökosit peroksidaz metodu ile saptanan ve sayılan granülosit beyaz hücreler arasında oldukça anlamlı ilişki saptanmıştır. Buna göre, +WBC/HPF korelasyonunun $\geq 0.25 \times 10^6$ lökosit/ml semen olarak saptanmasının patolojik olarak önemli bir gösterge olduğu saptanmıştır[78,88].

Değişik hücre tipleri ile bu hücrelerin saptanmasının orijin[89] ve semen yaymalarının sitoloji olarak değerlendirilmesinin ayrıntıları pek çok araştırmacı tarafından yayınlanmıştır[55,89-91].

Mikst antiglobulin reaksiyon (MAR) testi MAR testi Jeger ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır[23]. Bu test, yeterli motil spermatozoa olduğunda olası antisperm antikorları varlığının değerlendirilmesinde rutin olarak yapılmalıdır. Jeger tarafından orijinal olarak tarif edildiği şekliyle MAR testi, sensitize R1R2 eritositleri tarafından sensitize edilen süspansiyonun kullanılmasıyla yapılır[23]. Eritrositler, fosfat-buffered izotonik solüsyonu (PBS) ile pH 7.5'te 3 kez yıkanarak sensitize edilir. Bu süspansiyon 5:1 oranında güçlü inkomplet anti-D serumu ile (Behring ORRA 20/21) karıştırılıp 37 derecede 30 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra süspansiyon yeniden PBS'de üç kez yıkanır ve %5-10 hematokrit ile birleştirilir. Bu süspansiyon +4 derecede birkaç gün saklanabilir[23]. Bununla birlikte, günümüzde laboratuvarların çoğu ticari ürünleri kullanmaktadırlar (MarcScreen®, Bioscreen, NewYork , USA: sperm-Mar, FertiPro). Bu ürünlerde eritrositler lateks partiküllerinden oluşturulur. Lateks, MAR testi için semen damlası temiz bir cam kavanoza konulur ve arkasından insan immünoglobulin (IgG) antiserumu ile sensitize lateks partikül süspansiyonu ilave edilir. Bu arada, damlaların birbirlerine değmemelerine dikkat edilmelidir. Bunun nedeni, testin sonucunu etkileme olasılığından dolayıdır. Bu sperm damlaları lamel ile karıştırılarak ardından aynı lamel ile kaplanır. Test oda sıcaklığında 10 dakika sonra okunur. Lateks aglütinasyon görülmezse yorum yapılmaz. Motil spermatozoaya bağlı lateks partikül görülmezse negatif olarak rapor edilir. Şüpheli durum, motil spermatozoaya bağlanan partiküllerin %10'un altında olması olarak kabul edilirken testin pozitif olması bu oranın %10-90 arasında olması şeklindedir. Güçlü pozitivite ise %90'ın üzerindeki bağlanmayı kapsamaktadır. Pozitif MAR testi olan bütün olgularda (>%10) mikroaglütinasyonla antisperm antikorlarını tespit etmek için kan ve seminal plazma örnekleri alınabilir ve immobilizasyon[93] testleri yapılabilir[94].

Bununla birlikte, günümüzde bu testler modern androloji laboratuvarlarında nadiren yapılmaktadırlar. Bunun yerine IgA, IgG ve IgM (Irvine Scien-

tific, Santa Anna, USA: Laboserv GmbH, Am Boden, Staufenberg, Germany) ile immünbead testleri yapılmaktadır[53]. Ayrıca IgA ve IgM için antiseperm antikor testinde direk incelemeler için ticari kitler bulunmaktadır. IgM antikorları spermatozoada nadir olarak bulunduğu için klinik önemi açık değildir. Öte yandan IgA klinik önemi en fazla olan antisperm antikordur. Çünkü IgA ile kaplı olan spermatozoa in vivo olarak servikal mukusu penetre edememekte ve uzun süreli açıklanamayan infertilite için önemli bir neden olarak kalmaktadır. Bu durum erkek partnerin spermatozoasının yıkanmasıyla kolaylıkla intrauterin inseminasyon (IUI) ile tedavi edilebilir. Bazı laboratuvarlar IgG ve IgA MAR testlerini semen örneğinde eş zamanlı olarak yaparlarken diğerleri IgG MAR testi pozitif olduğunda IgA testini yapmaktadırlar. Bunun nedeni, IgA antisperm antikorunun nadiren bulunmasından dolayıdır[95].

Lökositlerin tespiti ve rolü Ejakülatta spermatozoa dışında yuvarlak hücre olarak adlandırılan lökositler ve germinal epitelyum hücreleri bulunur. Germinal epitelyal hücreler, fertil erkekte tüm yuvarlak hücrelerin %90'ını oluşturur ve Ariagno ve arkadaşları ortalama konsantrasyonunu $0.12x10^6$/ml semen olarak bildirmişlerdir[96]. Lökositlerin varlığı DNA hasarına ve ART'de hamilelik oranının düşmesine[33] neden olan ROS[55] oluşumuyla ilişkili olduğundan standart rutin semen analizine granüler lökositleri belirlemeye yarayan bir testin dahil edilmesi gereklidir. Semende lökositleri tespit edebilen birçok prosedür olmasına rağmen literatüre göre bu amaç için endike olan temel test lökosit peroksidaz testidir[24].

Lökositlerin belirlenmesinde peroksidaz testi Lökosit peroksidaz testini (Endtz testi)[97] yapmak için kullanılan solüsyon 125 mg benzidini ve 150 mg siyanosini (phloxine) 50 ml %95'lik alkol ile karıştırıp 50 ml distile su içinde çözdürülerek hazırlanır. Bu solüsyon ışık geçirmeyen bir şişede saklanmalıdır. Test yapılmadan önce 250 µl stok solüsyon 20 µl peroksid solüsyonuyla karıştırılır. Test için bir damla semen bir damla hazırlanan solüsyonla karıştırılarak lama yayılır, üzerine lamel kapatılarak iki dakika sonra mikroskop altında incelenerek büyük büyütmede alan başına düşen kahverengi hücre sayısı belirlenir. Nötrofil granülositler (lökositler) kahverengi boyanır. Bazofil ve eosinofil granülleri kırmızıya çalan kahverengiyle mor arası, lenfositler ve öncüller peroksidaz negatif olduklarından açık pembe boyanırlar[22,24]. Peroksidaz pozitif hücreler hemositometre yardımıyla sayılarak 106/ml semen cinsinden bildirilir. WHO22, >1x106 granülosit/ml semen varlığını muhtemelen Comhaire ve arkadaşlarının[98] çalışmasına göre lökositospermi olarak kabul etmektedir.

Lökositlerin tespitinde diğer yöntemler Lökosit peroksidaz testinin taramada kullanılmasının uygunluğu sorgulanmakta ve daha detaylı yöntemler önerilmektedir[55]. Ancak polimorfonükleer granülositlerin semende en yaygın lökosit olduğu[22,55] ve bunların ROS üretiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir[99,100.] Lökosit peroksidaz testi sadece granüler lökositleri tespit ettiğinden bu amaç için uygun ve güvenilir bir rutin test olarak kabul edilmektedir[97].

Lenfosit ve monositlerin tanımlanmasında granülositleri, lenfositleri ve makrofajları tespit edebilen genel lökosit antijeni CD45'e karşı oluşan monoklonal antikorlar kullanılabilirken, diğer monoklonal antikorlar lökosit subpopülasyonlarının boyanmasını sağlarlar[101-104]. Wolff'a göre immünositokimya yöntemi lökosit tespitinde altın standarttır[99]. Ancak bu yöntemlerin zaman alıcı olduğundan ve yoğun işgücü gerektirdiğinden rutinden ziyade araştırma amaçlı olarak kullanılması daha uygundur.

Monoklonal antikorlar yardımıyla uygulanan flow sitometri de bu amaçla kullanılabilir. Ricci ve arkadaşları[105] bunu basit, tekrarlanabilir, semende lökositleri doğrulukla tespit edebilen ve herhangi bir ön arıtma yapmaksızın değişik lökosit subpopülasyonlarına sınıflandırabilen bir yöntem olarak bildirmişlerdir. Diğer bir indirek yöntem de polimorfonükleer lökosit elastazın tespitidir. Bu enzim aktif granülositlerden salınır ve taze veya donmuş plazmada ölçülebilir. Objektif bir yöntem olmasına rağmen pahalı ve zaman alıcıdır. Semendeki lökosit sayısıyla elastaz seviyesi arasında güçlü bir korelasyon mevcuttur[106]. Esfendiari ve arkadaşları[107] lökositleri belirlemek ve lökositlerle spermatozoaların oluşturduğu ROS'u değerlendirmek için nitroblue tetrazolyum redüksiyon testi kullanmışlardır.

Lökositleri semen örneklerinde tespit etmenin en temel yolu Papanicolaou veya Bryan-Leishman[108] boyama tekniğiyle semen sürüntülerini parlak saha ışık mikroskopunda direk gözlemektir. Ancak lökositlerin ve germinal epitelin sitoloji ile belirlenmesi literatürde sıklıkla yetersiz olarak nitelendirilmiştir[109]. Bunun nedeni çoğu

gözlemcinin çeşitli lökosit subpopülasyonlarını doğru olarak tanıyamaması, hatta değişik lökosit formlarını immatür germinal epitel hücrelerinden ayırt edememesidir. Ancak her iki grubun da tanınması her ne kadar pratik eğitim ve tecrübe gerektirse de Papanicolaou gibi iyi bir boyama metoduyla mümkün olmaktadır[78,89-91,110-112].

Lökositospermi için sınır değerler Hangi değerin lökositospermi olarak değerlendirileceği konusu tartışmalıdır. WHO, lökositospermiyi aşırı sayıda lökosit varlığı olarak tanımlar ve insan ejakülatında baskın olarak granülositlerin, özellikle de nötrofil subtipinin sayısının $<1x10^6$/ml olması gerektiğini belirtmektedir. Politch ve arkadaşları[113] semendeki lökositlerin patolojik düzeyleri için hem mono-antikor temelli immünohistokimyasal hem de peroksidaz yöntemiyle eşik değerler için daha fazla araştırma gerektiğini vurgulamışlardır. Yeni sınır değerler için $0.25x10^6$ ve hatta $0.2x10^6$ lökosit/ml önerilmektedir[18,108].

Lökositospermi hakkında ihtilaf Semende lökositlerin varlığının semen parametreleri ve sperm işlevi üzerine kötü etkisi olabileceği 1980'de Comhaire ve arkadaşları[98] ve 1982'de Berger ve arkadaşları[114] tarafından bildirilmiştir. Ancak 1992 ve 1993'de Tomlinson ve arkadaşları karşı görüşte 3 makale yayımladı[103,104,116]. Birinci makalede, seminal lökositlerin morfolojik olarak anormal spermatozoanın ortadan kaldırılmasıyla erkek fertilitesinde pozitif rolü olduğunu, ikinci makalede, lökositler olmaksızın immatür germ hücrelerinin varlığının düşük in vitro fertilizasyon başarısıyla ilişkili olduğunu ve prospektif bir çalışma olan üçüncü makalede ise semendeki lökositlerin ve lökosit subpopülasyonlarının erkek infertilitesinin bir nedeni olmadığını ileri sürmüştür[103,104,116]. Aitken ve Baker, 1995 yılında seminal lökositlerin 'iyi Samaritanlar' olduğuna inanmamızı sağlayacak ikna edici bir durum olmadığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan, lökosit varlığının sıklıkla belirgin bir etkiye neden olmadığını ancak lökositlerin infiltrasyonlarına neden olan duruma bağlı olarak riskli olabilecekleri ve lökositlerin negatif ajan gibi davranabileceği potansiyeli akıldan çıkarılmamalıdır[117].

Bunlar dışında da birkaç karşıt görüşlü makale yayınlandı. Erkek reprodüktif sisteminin lökositospermiye neden olan inflamasyonunun geçici ve kendini sınırlayıcı olduğu, ayrıca bu fenomenin fertil erkeklerde de sıklıkla olabileceği ileri sürülmüştür[118,119].

Bakteriyospermi, lökositospermi ve erkek genital sistem inflamasyonu arasında çok zayıf bir ilişki olduğu bildirildikten sonra karışıklık daha da artmıştır[120]. Comhaire ve arkadaşları lökositosperminin erkek genital sistemindeki bakteri varlığına bağlı inflamasyonla ilişkili olabileceğini bildirmiş ve ejakülatın $>10^6$ peroksidaz pozitif hücre/ml içermesi durumunda patojenik bakteri izolatları $<10^6$ peroksidaz pozitif hücre/ml içerenlere göre anlamlı düzeyde fazla bulmuştur[98]. Punab ve arkadaşları lökosit sayısı ile değişik mikroorganizma çeşitleriyle ve lökosit sayısı ile total mikroorganizma sayısı arasında pozitif bir korelasyon tespit etmiştir[108].

Buna karşın Rodin ve arkadaşları[121] lökositosperminin bakteriyospermi için zayıf bir belirteç olduğunu bidirirken, Eggert-Kruse[122] ve Cottell[123] lökositospermi ile bakteriyospermi arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göster-mişlerdir.

Bakteriyosperminin kökeni halen çok karmaşıktır. Bakteriyospermi genellikle aşağıdaki 3 nedenden biri veya birkaçına bağlı olarak görülür[123]:

1. Normal kolonizasyon
2. Semen örneğinin kontaminasyonu
3. Ürogenital enfeksiyon

Erkek genital sisteminde genellikle bakteri izlenmemesine rağmen üretrada çeşitli mikroorganizmalar kolonize olabilir. Bu kommensal bakterilerin inflamatuar sürece ne derecede katıldıkları net değildir[124]. Durum, cildin veya glans penisin patojen olmayan doğal mikroorganizmaları ile semen örneğinin kontaminasyonu olasılığı yüzünden daha da karmaşık hale gelir[123]. Bu yüzden bakteriyosperminin erkek genital enfeksiyonunun göstergesi olup olmadığı kesin olmayıp daha önce de bahsedildiği gibi lökositospermi ile bakteriyospermi arasında ilişki hakkında çelişkili yayınlar mevcuttur.

Çeşitli infertil erkek popülasyonlarında lökositosperminin insidansı %6.8 ile %44.3 arasında değişiklik göstermesi tartışmayı daha da arttırmaktadır[125].

Lökositosperminin semen parametreleri ve işlevi üzerine etkileri Bir önceki bölüm olan 'Lökositospermi hakkında ihtilaf' bölümünde bahsedildiği gibi literatürde lökositosperminin ve hatta lökosit varlığının semen parametreleri ve

spermatozoanın fonksiyonları üzerine etkisi üzerine çelişkili makaleler mevcuttur.

Örneğin, Kaleli ve arkadaşları lökosit peroksidaz testini kullanarak lökosit sayısıyla artmış hipo-osmotik şişme testi skorları, yüksek sperm konsantrasyonu ve artmış akrozom reaksiyonu arasında pozitif korelasyon tespit etmişlerdir[126]. Bu etkinin özellikle seminal lökosit konsantrasyonları 1 ile $3x10^6$/ml semen düzeyindeyken izlendiği bildirilmiştir. Kiessling, artmış lökosit konsantrasyonu olan semen örneklerinin belirgin olarak daha sık ideal morfolojiye sahip spermatozoa içerdiğini bildirmiştir[127].

Eggert-Kruse ve arkadaşları lökositospermi varlığı ile eritrosit MAR testisyle tespit edilebilen IgA ve IgG tipinde antisperm antikorlarının üretimi arasında bir ilişki bulamamışlardır[122]. Rodin ve arkadaşları da lökositosperminin semen parametreleri ve sperm fonksiyonu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir[121].

Lökositosperminin sperm fonksiyonları üzerine negatif etkisiyle ilgili birçok makale yayınlanmıştır. Örneğin Chan ve arkadaşları lökositospermi varlığında sperm motilitesinin etkilenmediğini, spermatozoanın hiperaktivitesinin negatif etkilendiğini göstermiştir[128]. Lökosit konsantrasyonu ile ileri hareketli sperm motilitesi, normal sperm morfolojisi ve hipo-osmotik şişme testi arasında negatif korelasyonlar bildirilmiştir[129]. Ayrıca sperm morfolojisi üzerine negatif etkisi artmış stres ilişkili fenomen elonge sperm insidansıyla birliktedir[112].

Yakın zamanlı bir literatüre göre lökositosperminin temel negatif etkisinin DNA fragmantasyonu ve TUNEL (terminal deoksinükleotid transferaz vasıtasıyla dUTP çentik sonu etiketleme) ve sperm kromatin yapı testi ile tespit edilen spermatozoa hasarına bağlı ROS üretimi olduğu kesinlik kazanmıştır[31,33,130,131]. Henkel ve arkadaşları lökositospermiye bağlı DNA fragmantasyonunun in vitro fertilizasyon oranlarıyla korelasyon göstermediğini ancak TUNEL pozitif spermatozoayı yüksek miktarda içeren semen örnekleriyle inseminasyon yapılan IVF ve ICSI hastalarında anlamlı düzeyde düşük gebelik oranı olduğunu bildirmişlerdir. Bu, dolaylı olarak hasarlı DNA'sı olan spermatozoanın oositi dölleyebildiğini ancak parental genom açıldığı anda embriyonun gelişimini durdurduğunu ve düşük gebelik oranına neden olduğunu göstermektedir[31,33]. Bu bilgi, Aitken ve arkadaşlarının[132] yaklaşık yarısının artmış ROS aktivitesi gösterdiği oligozoospermik hastalarda spontan gebelikle ROS üretimi arasında negatif korelasyon olduğunu gösteren çalışmasıyla uyumludur ve Fedder'in[110] çalışmasıyla da doğrulanmıştır. Bu nedenle, lökositosperminin temel negatif etkisi özellikle lökositler ve spermatozoa tarafından üretilen ROS olarak gözükmektedir. ROS, düşük sperm fonksiyonlarına, membranda poliansatüre yağ asitleriyle etkileşmesiyle veya DNA hasarı veya fragmantasyonuyla neden olur.

Lökositosperminin kaynağı Barratt ve arkadaşlarına göre lökositosperminin enfeksiyon, inflamasyon ve otoimmüniteyi içeren heterojen bir etiyolojisi olup bu durum için mevcut nedeni karmaşık ve zor anlaşılır hale getirmektedir[133]. Çoğu olguda semendeki lökositlerin erkek genital sistemindeki bir enfeksiyondan kaynaklandığı varsayılır ancak lökositospermisi olan çoğu erkeğin seminal kültürü negatiftir[134,135]. Purvis ve Christiansen, semendeki lökositlerin kaynağının çoğunlukla testis veya epididimis olduğunu, bunun da spermatozoanın lökositlerin yıkıcı etkilerine en uzun süre epididimde maruz kalacağından ve DNA hasarı oluşturacağından anlamlı olabileceğini bildirmiştir[136]. Bazı erkeklerde lökositosperminin nedeninin genital sistem dışında olabileceği ve lökositospermiye neden olabilecek birçok etken bildirilmiştir[109,118,120,138-141].

Trum ve arkadaşları, lökositosperminin geçirilmiş gonore ile ilişkili olduğunu bildirmiştir[120]. Close ve arkadaşları, 164 infertil erkeğin değerlendirdiği çalışmada esrar, sigara ve alkol kullananlarda seminal sıvıda anlamlı düzeyde fazla lökosit olduğunu bulmuştur[142]. Sigara içenlerin semenlerinde artmış yuvarlak hücre ve lökosit bulunduğu Trummer ve arkadaşları[143] tarafından doğrulanmıştır. Düşük serum testosteronu olan bir grup erkekte klomifen sitrat tedavisinin lökositospermiye neden olduğu bildirilmiştir[144]. Bieniek ve Riedel, lökositospermi varlığıyla korelasyon göstermese de diş, oral kavite ve çenedeki bakterilerin aynısını semen örneklerinde de tespit etmişler; dental tedaviden 6 ay sonra bu erkeklerin üçte ikisinde semen örneklerinin steril kaldığını, sperm konsantrasyonu, hareketi ve morfolojisi gibi semen parametelerinin tedavi edilmeyen kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir[137].

Lökositospermin tedavisi Lökositosperminin tedavisi için rutin olarak antibiyotiklerin kullanıldığı birçok kez bildirilmiş olmasına rağmen bu durum

çeşitli çalışmaların değişen sonuçlarına göre tartışmalıdır[118,134]

Bir meta-analizde, lökositospermisi ve/veya bakteriyospermisi olan erkeklerde geniş spekturumlu antibiyotik tedavisinin etkinliği araştırılmıştır[139]. Toplam 23 çalışmadan 12 tanesi değerlendirmeye dahil edilmiştir. En çok kullanılan antibiyotikler doksisiklin, eritromisin ve trimetoprim/sulfametaksazol olarak belirlenmiş, tedavinin semen kalitesinde anlamlı artışa neden olduğu bildirilmiştir. Çeşitli semen parametresindeki düzelme ağırlıklı etki derecesi açısından değerlendirilidiğinde en az etki 0.16 ile sperm konsantrasyonunda, 0.20 ile sperm motilitesinde, 0.22 ile sperm morfolojisinde ve 0.23 ile lökosit konsantrasyonunda azalma olarak bulunmuştur.

Lökositospermi tedavisiyle ilgili bir literatür araştırmasıyla konuya ilişkin 12 makaleye ulaşıldı[110,118,145-153]. On makalede seminal lökosit konsantrasyonunun azaldığı bildirilmiş[110,118,145-147,149-153]. Bazı makalelerde semen parametrelerinin düzeldiği, dört makalede de[110,118,145,153] antibiyotik tedavisi sonucu gebelik olduğu bildirilmiştir. Bir olgu sunumunda, azoospermili bir erkekte antibiyotik tedavisi lökosit konsantrasyonunun azalmasını ve lökosit morfolojisinin düzelmesini sağlamış, ancak iki siklus ICSI tedavisi başarısız kalmıştır[150]. Branigan ve Muller, sık ejakülasyonun semen örneklerinde lökositlerin azalmasına katkıda bulunduğunu bildirmiştir[145]. Bu durum daha sonra Yamamoto ve arkadaşları[152] tarafından doğrulanmıştır. Yalnızca 2 çalışmada lökosit konsantasyonunda anlamlı azalma olduğu izlenmemiştir[119,148].

Lökositospermi için yapılan antibiyotik tedavisinine yanıt alınamamasının çeşitli sebepleri olabilir. Bunlardan bir tanesi başarılı tedavi tanımı olarak farklı beklentilerin olması olabilir. Negatif sonuç bildiren iki çalışmada seminal lökosit konsatrasyonunda anlamlı azalma olmasına rağmen yazarlarca tanımlanan lökositosperminin total eradikasyonu gerçekleşmemiştir[119,148].

Antibiyotik tedavisiyle pozitif etki gözlenmesini zorlaştıran diğer nedenler için Purvis ve Christiansen iki farklı sebep öne sürmüştür[118]. Bunlardan birincisi, enfeksiyondan sorumlu organizma için tedavi çeşidinin veya dozunun uygun olmamasıdır. Yazarlara göre sadece belirli antibiyotikler (en önemlisi siprofloksasin) yüksek konsantrasyonda aksesuar seks glandlarına penetre olma kabiliyetindedir. Antibiyotik tedavisi sırasında sık ejakülasyon gerçekleşmesiyle sekresyon döngüsünde artış, antibiyotiklerin etkilenen organların glandüler lümenine geçişini kolaylaştıracağı için tedavi etkinliğini arttırır. İkincisi, enfeksiyon varlığı nedeniyle düşük semen kalitesinden sorumlu olan patolojik değişikliklerin kalıcı olması olasılığıdır (örneğin epididimal stenoza bağlı spermatozoanın geçiş süresinin artması veya orşite bağlı seminifer tübül yetmezliği). Bu nedenlerle antibiyotik tedavisi ancak enfeksiyon aktifken, patolojik organizma halen mevcutken ve hasar henüz sınırlıyken semen kalitesi üzerine pozitif etki gösterebilir.

Eggert-Kruse ve arkadaşları, genital sistem enfeksiyonu semptomları (lökositospermi) olan hastaların eşleriyle birlikte tedavi edilmesiyle asendan enfeksiyonlara bağlı sekellerin önlenebileceğini öne sürmüşlerdir[102]. Ancak antibiyotik tedavisi dikkatle ve sadece endikasyon dahilinde kullanılması gerektiğine dair uyarılar gereksiz kullanımla dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olacağından ve bazı antibiyotiklerin spermatogenez üzerine toksik etkisi olabileceğinden bir çok yazar tarafından vurgulanmıştır[102,154,155].

Antibiyotik tedavisinin semen parametrelerini nasıl düzelttiği netlik kazanmamıştır. Skau ve Folstad, antibiyotik tedavisinin testiste immün aktivitenin azalmasına yol açan sitotoksik hücre düzeyini azaltacağını ve buna bağlı daha çok normal morfolojide hücre ve daha az DNA hasarı olacağını öne sürmüşlerdir[139]. Tedavi sebebiyle semen parametrelerinde değişiklik olmadan ejakülatta lökositler azaldığı ve buna bağlı ROS üretimi ve DNA hasarı azaldığı için gebelik oranları artıyor olabilir.

Sperm vital boyanma testi Önceden $1.0x10^6$/ml üzerinde sperm konsantrasyonu olan tüm semen örneklerinde yapılmaktayken günümüzde ileri hareketli sperm oranı %30'un altında olanlarda yapılmaktadır. Yöntem olarak Blom'un[156] tariflediğine dayanan Eliasson'un[54] yöntemi kullanılmaktadır. Bir damla semen bir plak üzerine damlatılır ve üzerine %1 eozin Y damlatılarak karıştırlır. Onbeş saniye sonra 2 damla %10'luk aköz nigrozin çözeltisi eklenerek karıştırılır. Bu karışımdan bir damla lama damlatılarak havada kuruması sağlanır. İnceleme yağlı olarak 1000x büyütmede yapılır. Kırmızı hücreler veya tamamen beyaz olmayan sperm hücreleri ölü kabul edilir ve

sonuç canlı (beyaz) sperm yüzdesi olarak ifade edilir. Her ne kadar boyama çözeltileri aköz eozin Y ve nigrozin olarak anılsa da her ikisi de fosfatla tamponlanmış çözeltilerde eritilmelidir. Böylelikle sperm kuyruklarının hipo-osmotik şişmesi ve suyla hazırlanan çözeltilerden dolayı hipo-osmotik strese bağlı sperm ölümününe bağlı yanlış negatif (düşük canlılık) sonuçlar engellenmiş olur[157].

Vital boyanma tekniğinin başarısı canlı ama hareketsiz spermle ölü spermi ayırt etme açısından önemlidir. Kartegener sendromu veya soğuk şoku nedeniyle canlı ama hareketsiz spermler tespit edilebilir. Bu yöntemle tüm spermlerin ölü olduğunun tespit edilmesi haline nekrozoospermi denir.

Ek yöntemler

Azoospermi

Semen örneğinin incelemesinde spermatozaya rastlanmazsa, yani azoospermi mevcutsa şu adımlar uygulanır. Örnek tek kullanımlık plastik tüpte 10 dakika 3000 g ile sentrifüje edilir. Çökeltinin üstünde kalan kısım uzaklaştırılarak pellete çok az miktarda medyum eklenerek tekrar mikroskopik inceleme yapılır. Sonuç şu şekilde değerlendirilir:

- Hiç spermatozoa yok = azoospermi
- Spermatozoa mevcut = kriptozoospermi veya ağır oligozoospermi ($<1x10^6$ spermatozoa/ml)[39].

Orta seviyede oligozoospermi

Spermatozoa konsantrasyonunun $<5.0x10^6$/ml olduğu durumlarda tüm işlemlerden sonra kalan semen 200 g ile 10 dakika santrifüje edilir. Pellete biraz medya eklenerek standart sürüntü hazırlanır. Bu hazırlanan sürüntü havada kurutularak orjinal morfoloji sürüntüsünde çok az spermatozoa olduğu zamanlarda kullanılmak üzere boyanır.

Semen biyokimyası

Semen biyokimyası sıklıkla standart temel semen analizinin bir parçası olarak uygulanmaz. Ancak azoospemi olgularında veya ıslak preparatta yuvarlak hücrelerin olduğu durumlarda azoospermi tanısına yardımcı veya granüler lökositlerin tanımlanabilmesi için bazı testler yapılabilir. Bu biyokimyasal testler koni şekilli bir tüpte 3000 g ile 30 dakika santrifüje edilmesi ile elde edilen seminal plazmada yapılır.

Epididim kaynaklı bir obtrüksiyon için alfa glukozidaz testi yapılabilir. Bunun nedeni bu enzimin sadece epididim tarafından üretilmesidir[158]. Azalmış alfa glukozidaz seviyesi epididimde bir obstrüksiyon olduğunu düşündürür. Azoospermide seminal plazmanın fruktoz seviyesi ya biyokimyasal olarak yada direk semen örneğiyle belirlenebilir. Fruktoz, seminal vezikülün sekretuvar işlevinin göstergesidir. Düşük fruktoz seviyeleri seminal vezikülün ve vaz deferensin konjenital disgenezisinin işareti olabilir. Semende veya seminal plazmada fruktozu spektrofotometrik olarak belirleyebilen ticari bir kit (Fruktoz Test, FerritPro) mevcuttur[22].

Islak preparatta yuvarlak hücreler gözlendiğinde PMN-elastaz testi yapılır[169]. Bu enzim, aktif granülositlerden salınır ve taze veya donmuş seminal plazmada saptanabilir. Objektif ve uygun bir yöntemdir. Ancak pahalı ve zaman alıcı olup 20 örnek aynı anda çalışılmalıdır. Bununla birlikte elastaz seviyeleri ile semendeki lökosit sayısı arasında güçlü korelasyon vardır. Artmış bir değer olarak >290 ng/ml semende lökosit varlığının veya sessiz bir genital sistem enfeksiyonun güçlü göstergesidir[106,160].

Fruktoz tespitinde kolorimetrik test yöntemi

Fruktozun hızlıca tespit edilebilmesi için Selivanoff metodu üzerine kurulu bir test Amelar tarafından tanımlanmıştır[161]. Bu testte, 5 mg rezorsinol 33 ml hidroklorik aside karıştırılarak 100 ml distile suda dilüe edilir. Semenden 0.5 ml alınarak 5 ml reagent ile sıcağa dayanıklı cam bir tüpte karıştırılır ve kaynama düzeyine kadar ısıtılır. Fruktoz varlığında 60 saniye içerisinde turuncu-kırmızı renklenme oluşur. Bu test uygulanırken koruyucu giysiler, özellikle de koruyucu gözlük kullanılmalıdır[161].

Semen kültürü

Semen analizi ilk kez yapılan tüm olgularda aerobik bakteriler, üroplazma ve mikoplazma için kültür yapılmalıdır. Hastadan idrarını yapması, ellerini sabunla yıkması sonra glans penisi sadece suyla yıkaması istenir. Semen tek tek paketlenmiş steril kutulara konur. Ne yazık ki bakteriyospermi ile lökositospermi arasında zayıf bir ilişki vardır ve semen örneklerinin kültürünün yapılması sorgulanmaktadır[55]. Ayrıca semen kültürlerinin yapılması çok zordur ve bazı laboratuarlar en iyi

sonuçları alabilmek için özelleşmiş prosedürler uygulamaktadır[22].

Bilgisayar yardımlı semen analizi

Geçen 10 yılda, semen örneklerini daha doğru, objektif ve etkin şekilde analiz eden birçok bilgisayar temelli sistem geliştirilmiştir. Sperm konsantasyonunu[22,39,162,163] ve normal morfolojiyi[164] saptayan sistemler olmasına rağmen en çok ilgiyi motilite parametresi çekmektedir[22,163]. Bu sistemler primer olarak sperm baş hareketlerinin kritik analizini olağan kılarken flagellar hareketler gelecek için çözülmeyi beklemektedir. Şu ana kadar çok sayıda sperm baş hareketi tanımlanmış olup bunlardan 11 tanesi resmi olarak kabul edilerek standardize edilmiştir. Bilgisayar yardımlı semen analizi (CASA) hiperaktif hareketliliğin tanınmasında çok büyük öneme sahiptir[22].

En çok kullanılan CASA parametresi şunlardır: (1) eğrisel hız (VLC), belirli bir sürede sperm başının merkezinin katettiği mesafe (spermin yolu boyunca sperm başının bulunduğu yerler arasında çizilen doğruların toplanmasıyla hesaplanır); (2) düz çizgi hızı (VSL) (belirli bir zaman içinde bulunduğu ilk noktadan ikinci noktaya çizilen düz çizgi ile ölçülür); (3) ileri hareketin doğrusallığı (LIN) (bu VSL/VCL oranının yüzde şeklinde ifade edilmesidir, 100 hücrenin tamamen düz bir çizgide yüzmesini temsil eder)[22,39,163].

CASA sonuçlarını standardize etmek için ESHRE Androloji Özel İlgi Grubu tarafından strict kılavuzlar önerilmiştir[165,166]. Kılavuz çeşitli önerilerde bulunmaktadır. Bunlar iç ve dış kalite kontrolü ihtiyacı, çeşitli üreticilerin sundukları da dahil olmak üzere yeterli eğitim ve doğru işletim uygulamaları olarak sayılabilir. Ayrıca bildirilecek raporlarda ve makalelerde uygulanmak üzere teknik detaylar da bu grup tarafından belirlenmiştir. Bunlar kazanım oranının 50 Hz, örnekleme zamanının 0.5 saniye olması, yumuşatma algoritmalarının uygulanması için endikasyonlar, örneklenen hücre sayısının en az altı alanda 200'den fazla olması, kullanılması gereken haznenin derinliğinin 10-20 μm olması ve kullanılan cihaz üzerinde yazılım sürümü, mikroskop optiği ve büyütme oranının yazılmasıdır[22,39,156,166].

Androloji laboratuarında kalite kontrolü

Modern androloji labarotuvarında kalite güvencesinin sağlamasının önemi geçen 10 yılda anlaşılmış ve her laboratuvarın kendi kalite kontrol programı olması gerekmektedir. Kalite güvencesi, kalite kontrolünü de içeren büyük resimdir ve genel laboratuvar kalitesini personel uygulamalarına, iletişim yeteneklerine, gerektiğinde düzeltici hamlelerin yapılmasına ve prosedür ve programların dokümentasyonuna göre tetkik eder. Kalite güvencesi ve kalite kontrolünün detaylı tanımları WHO 1999 kitapçığında[22], ESHRE kitapçığında[53] ve çeşitli makaler de[165,166] kitaplarda[39] yer alır.

1999'da yayımlanan WHO kitapçığında[22] ve ESHRE kitapçığında[53] dahili ve harici yönleri olan kalite kontrolü üzerinde durulur. Dahili kalite kontrolü, cihazların kontrolüyle teknisyenler arasında temel semen parametrelerini replike etmeyi içerir. Ayrıca aylık ortalama örneklemesini ve teknisyenler arası farklılıkları sistematik olarak değerlendiren karmaşık diğer eylemleri içerebilir.

Değişik ülke ve kıtalarda hükümetlerce yönetilen çeşitli harici kalite kontrol programları mevcuttur. Örneğin, UK NEQAS (İngiltere Ulusal Harici Kalite Değerlendirme Servisi) veya Avrupa Androloji Akademisi (EAA) ve ESHRE gibi ulusal ve uluslar arası birliklerin programları mevcuttur. Bu programları aynı örneğin çok sayıda dağıtılmasının getirdiği lojistik zorluklar ve maliyet sınırlandırır.

Değişik programlarla yaşanan problem standartların bu programlar arasında aynı olmaması ve standardizasyon için aynı prosedürü takip etmemeleridir. Bazı ulusal programların birbirinden farklı sonuçlar verebilecek Diff-Quik™ ile veya Papanicolaou ile boyanmış sürüntüler kullandığı bilinmektedir. Diğer bir problem de Cooper ve arkadaşlarının[167] göstermiş olduğu gibi ESHRE harici kalite kontrol programını kullanan laboratuarların sperm morfolojisi skorlamasında EAA veya UK NEQAS kullanan laboratuvarlardan daha sıkı davranmalarıdır. Bu üç program arasında motilite için a ve b derecelerinde de farklılıklar vardır. Daha iyi standardizasyon ESHRE Androloji Özel İlgi Grubunun yaptığı gibi temel semen analizi eğitim programı ile sağlanabilir[168]. Ayrıca laboratuvarlar ve eğitim kurumlarının sürekli iletişimde olması da devam eden standardizasyonun sağlanması için önemlidir[169].

SEMEN ANALİZİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Daha önce de bahsedildiği gibi sonuçları etkileyebilecek tüm faktörler bilinmeden semen analizi sonuçları değerlendirilemez. Tekrar semen analizlerinin ne zaman yapıldığının bilinmesi ve önceki sonuçlarla karşılaştırma da önemlidir[170]. Bazıları aşağıda tartışılmıştır.

Semen parametrelerini etkileyen değişikliklerin kaynakları

Semen parametrelerini etkileyebilecek bir çok parametre bilinmektedir. Bunlardan cinsel perhiz ve mevsimsel etkiler veya hastalıklar parametrelerde büyük değişikliklere yol açabilir.

Cinsel perhizin semen parametreleri üzerine etkisi bilinmekte ancak değişik etkiler de bildirilmektedir. Bu etkiler sperm morfolojisi üzerine hafif etkilerden sperm motilitesinde, sperm konsantrasyonunda ve semen volümünde istatistiksel anlamlı farklara kadar değişebilir. Bu spermatozoa ve aksesuar bezlerden sekresyon üretiminin günlük gerçekleşen bir süreç olmasıyla ilişkilidir[37,40,41,45].

Genel olarak insanlarda üreme mevsimsel değildir ve spermatogenez yıl boyunca sürekli aktif bir işlemdir. Ancak, bazı çalışmalarda muhtemel mevsimsel etkiler araştırılmıştır[171-175]. Literatüre göre artmış yaz sıcaklığına bağlı sperm konsantrasyonunda ve/veya sperm morfolojisinde değişiklikler izlenebilir. Diğer taraftan sıcaklık yerine günlerin uzun olmasının mevsimsel dalgalanmanın sebebi olabileceği iddia edimiştir[175]. Henkel ve arkadaşları kromatin kondensasyonunda ve sperm sayısında anlamlı mevsimsel değişiklikler bulmuştur[175]. Almanya'da bir grup hasta üzerinde yapılan çalışmada en yüksek kromatin intakt değer %86.2 anilin mavisi negatif spermatozoalar ile Ocak ayında bulunmuş, en yüksek sperm konsantrasyonu ise 68.75 x 10^6/ml semen ile Nisan ayında tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak güney yarım küreden hastalarda mevsimsel değişikliğin maksimum kromatin değişikliği için 4-5 ay ötelendiği ancak sperm konsantrasyonunda bu trendin gözlenmediği bildirilmiştir.

Erkek infertilitesi üzerine yazılmış makalelerde veya kitaplarda nezle, grip ve diğer ateşli hastalıkların spermatogenez üzerine kötü etkileri olduğundan bahsedilir. Bu nedenle, bunun her semen analizi ile birlikte sorgulanması gerekir[1,37]. MacLeod yüksek ateşle seyreden viral enfeksiyonla su çiçeğinin semen kalitesi üzerine etkilerini yayınlamıştır[176,177]. Sperm konsantrasyonunun, motilitenin, ileri progresyonun ve morfolojinin bozulduğunu bildirmiştir.

Benzer bir etki Menkveld ve Kruger[40,41] tarafından gözlemlenmiştir. Bu etki çok kuvvetli olabilir ve semen analizi sonuçlarını değerlendirirken önemli bir faktördür. Menkveld ve Kruger[40,41] tarafından bildirilen iki vakada motilitenin, ileri progresyon hızının ve normal morfolojiye sahip spermatozoa yüzdesinin hastalıkta ilk bozulan parametreler olduğunu saptamışlardır. Sperm konsantrasyonu muhtemelen spermatozoanın genital kanaldaki depoları nedeniyle hemen etkilenmemiştir. Bu bilgi sperm morfoloji ve motilitesinin genital kanalda özellikle de epididimdeyken değişebileceğini düşündürmektedir[65,178]. Hastalığın negatif etkisi en geç sperm morfolojisini etkilemiş, bunun da spermatogenez ve spermiyogenezin hassasiyetininden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Bahsi geçen olumsuz çevresel etkiler en çok sperm morfolojisini etkilemektedir[40,41,179]. Menveld ve arkadaşları[40,41,179] ve MacLeod[14,176,177] sperm morfolojisinin çok hassas bir parametre olduğu ve vücuda/testise karşı kötü etkileri en kısa sürede göstereceği sonucuna varmıştır. Menkveld ve Kruger, herhangi bir hastalık veya enfeksiyonun morfolojik olarak normal olan formların yüzdesini geçici olarak düşüreceğini daha sonra normal değere döneceğini iddia etmiştir[40,43]. Ancak testisler sürekli bu etkilere maruz kalırsa lamina propria ve bazal membranda histolojik değişikliklerin olmasına ve Sertoli hücre foksiyonlarının bozularak spermatogenezi kötü etkilemesine neden olabilir. Bu negatif etkiler ilk olarak normal spermazoa morfolojisinde dereceli olarak azalmayla[179,180] uzamış sperm ve immatür sperm sayısında artışa neden olur. Daha sonra bunları sperm konsantrasyonunda azalma takip eder[40,41,180].

Uygulanması gereken semen analizi sayısı

Zaneveld and Polakoski[45], ilk semen analizinde normal değerler izleniyorsa başka semen analizine ihtiyaç olmadığını öne sürmüşlerdir. Ancak sonuçlar sınırda veya o laboratuarın değerlerine göre anormal

ise tanıyı koymadan evvel birkaç semen analizi yapmak gerekecektir. Bu olgularda 3-5 hafta içinde 3 semen analizi yapılmalıdır. Bazı yazarlar her testte hafif farklılıklar olacağını, bu nedenle tanı konmadan evvel en az 2 semen analizi yapılması gerektiğini düşünmektedirler[181-183]. Ayrıca 3 aylık süreçte spermatogenezin tam siklüsünü temsil eden 3-4 semen analizi yapılarak bir hastanın fertilite potansiyelini kestirmenin doğru olduğunu ileri süren yazarlar da olmuştur[18,37,73].

Ciddiyetle gözden geçirilmesi gereken diğer bir konu da maliyettir. Artan maliyetler nedeniyle hasta başına düşen semen analizi sayılarını aşağıya çekme eğilimi mevcuttur. Bu nedenle eğer ilk semen analizi o laboratuvar standartlarına göre normalse ve üzerinden uzun zaman geçmediyse yada başka bir tıbbi durum gelişmediyse başka semen analizi yapılmasına gerek yoktur. Semen analizi anormal ise 3 aylık süre içinde 2 veya 3 test istenerek hastanın semen profili oluşturulabilir.

Sonuçların değerlendirilmesi

Semen örneğinin değerlendirmesi seminal volüm, spermatozoa konsantrasyonu, motilite ve sperm morfolojisini ve MAR testi[23], lökosit peroksidaz testi ve biyokimya gibi diğer test sonuçlarını da temel alarak yapılmalıdır. Sonuçlar laboratuvar değerlerinin çok altında bile olsa hamileliğin herşeye rağmen oluşabileceği akıldan çıkarılmamalıdır, ancak bu olgularda bu amaca ulaşılana kadar geçen süre normal semen değerleri olan olgulardan çok daha uzundur[39,184].

Semen analizinin hangi nedenle yapıldığına bağlı olarak bir ayrım yapılmalıdır. In vivo fertilizasyon için kötü sayılabilecek sonuçlar in vitro fertilizasyon için uygun olabilir. Her ne kadar in vitro fertilizasyon için morfolojik olarak normal motil spermatozoa konsantrasyon indeksi önemli olsa da in vivo fertilizasyon için volüm daha önemli bir parametredir. Oligospermi sıklıkla anormal bir bulgu olan artmış semen volümüyle ilişkili olup bu anormal faktör böyle bir indeksin hesaplanmasında ve düşük serum konsantarsyonunu kompanse etmek için kullanılmamalıdır. Yüksek semen volümü ilişkiden sonra vajinadan semenin kaybıyla ilişkili olduğundan yüksek miktarda spermatozoa da kaybedilmiş olur.

Bir semen parametresinin diğer bir semen parametresiyle kompanse edici etkileşimi hakkında çok fazla şey yazılmıştır[37,185]. Yüksek sperm konsantrasyonları yüksek oranda motilite ve normal morfoloji ile beraber olma eğiliminde olsa da Menkveld ve arkadaşları[41,75,180] özellikle sperm morfolojisi konusunda böyle bir istisnanın olmadığını göstermişlerdir. Semen parametrelerinin kompanse edici etkileşimi hakkında yukarıda bahsedilen bilgi doğruluğunu korur. Normal değerlerde volüme sahip bir olguda belirli düzeyde kompanse edici etkileşim olur, ancak bu etki sınırlıdır. İnfertil popülasyonda oluşan gebeliklere dayanarak gebelik için normal ve minimal değerler hesaplanırken[43,73] tek ve sürekli anormal bir semen parametresinin normal bir kadında çok nadiren gebelikle sonuçlanır[43,187].

Normal semen parametreleri ve fertilite için standartlar

Semen parametreleri için normal standartlar volüm, motilite, sperm konsantrasyonu ve morfoloji değişik zamanlarda yayınlanmıştır[43] WHO kitapçıklarında derlenmiştir[19-22]. WHO'nun 1999 kitapçığında[22], normal değerler terimi referans değerler terimiyle değiştirilmiştir. WHO'nun yayınladığı değerler normal veya fertil popülasyonda yapılan çalışmalardan elde edilen verilerdir ve spontan gebelik oluşması için gerekli minimum veriler değildir. Bunun anlamı normal ilişkilerde bu kitapçıklarda bildirilen değerlerin altında değerlerle de hamilelik oluşabileceğidir. Androloji dışında çalışan çoğu yazar bu gerçeği gözardı ederek normal ile fertiliteyi karıştırmaktadır. Buna bağlı olarak WHO'ya göre normal sınırlarda olmayan semen parametrelerine sahip erkekler infertil olarak sınıfladırılıp gebelik oluşturamayacakları sanılır. Durumu bu şekilde anlatılan çiflerde gelişen gebeliklerde sosyal problemler ve stres gelişir.

Normal ve fertilite arasındaki farklar Van Zyl[188], Van Zyl ve arkadaşları[73,74] ve Menkveld ve Kruger[41,43] tarafından bildirilmiştir. Eşleri hamile kalan erkeklerin semen analizi sonuçları o zamanki normal uluslar arası standartlara[17] göre Van Zyl ve arkadaşları[73] tarafından ve 1987 WHO kitapçığına[20] göre Menkveld ve Kruger[41,43] tarafından karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Tygerberg Hastanesi[189] fertilite değerleriyle karşılaştırılmıştır. Van Zyl ve arkadaşları[73] uluslararası normal değerlere göre erkeklerin sadece %18.8'inin normal veya fertil sayılacağını, Tygerberg değerlerine göre bunun %68.4 olacağını bildirmişlerdir. Menkveld ve

Kruger[41,43] aynı değerleri sırasıyla %20.5 ve %64.5 olarak bildirmişlerdir. Tygerberg değerleri hastanenin infertilite kliniğine başvuran normal kadınların spontan gebelikleriyle sonuçlanan semen parametrelerinin karşılaştırılmasından elde edilmiştir[73,74,187]. Her semen parametresinin üzerinde hamilelik oranında anlamlı artış göstermeyen en düşük değeri fertilite için normal değer olarak kabul edilmiştir. Bu değerlere göre bakıldığında erkekleri fertil veya normal, subfertil ve infertil olarak sınıflamak mümkündür. Fertil, in vivo spontan konsepsiyon için en uygun olan, subfertil bu şansı azalmış olan ve infertil çok az şansı olan olarak sınıflanabilir. Bu değerler in vitro fertilizasyon için de uygundur[189].

Yakınlarda fertil ve subfertil olarak tanımlanan popülasyonların semen parametreleri karşılaştırılarak erkek fertlite potansiyeli açısından sınır değerleri belirleyen birkaç çalışma yayınlanmıştır[190,194].

Guzick ve arkadaşları[192], Van Zyl ve arkadaşlarıyla[73,74] Menkveld[41] ve Menkveld ve Kruger'in[189] çalışmalarına benzer şekilde erkeklerin fertilite potansiyelini fertil veya normal, subfertil ve infertil olarak 3 gruba ayrılabileceğini bildirmiştir. Değişik çalışmalarda[190,192,194] önerilen değerler Tablo 9.1'de sunulmuştur. Tygerberg sınıflandırmasında en düşük semen parametrelerine sahip erkeğe göre kategorize edilmiştir[189]. Subfertil grupta değişik semen parametreleri arasında kompanse edici etkileşimler olabileceğine inanılmaktadır. Ancak, spesifik bir semen parametresi infertil kategorisine düşerse, bir veya birden fazla iyi semen parametresi bile zayıf parametreyi kompanse edemez[189]. Yine de bu olgularda in vivo spontan gebelik mümkündür.

Table 9.1: *Erkek fertilite potansiyeli sınıflaması için sınır semen parametresi değerleri. Literatüre göre fertil ve subfertil kıyaslaması. Tygerberg Hastanesi değerleri gözlenen gebeliklere dayanarak verilmiştir.*

Yazar/semen parametresi	İnfertil	Subfertil	Fertil
Ombelet ve ark. (190)			
Konsantrasyon (10^6/ml)			34.0
Progresif motilite (%)			45.0
Morfoloji (% normal)			10.0 (SC)
Guzick ve ark. (192)			
Konsantrasyon (10^6/ml)	<13.5	13.5 – 48.0	>48.0
Progresif motilite (%)	<32.0	32.0 – 63.0	>63.0
Morfoloji (% normal)	<9.0	9.0 – 12.0	>12.0 (SC)
Günalp ve ark (193)			
Konsantrasyon (10^6/ml)		9.0	
Progresif motilite (%)		14.0	42.0
Morfoloji (% normal)		5.0	12.0 (SC)
Menkveld ve ark. (194)			
Motilite (% motil)		20.0	45.0
Morfoloji (% normal)		21.0	31.0 (WHO)
Morfoloji (% normal)		3.0	4.0 (SC)
Akrozom indeksi (%)		3.0	3.0
Teratozoospermi indeksi (%)		2.09	1.64
Tygerberg Hastanesi değerleri*			
Konsantrasyon (10^6/ml)	<2.0	2.0 – 9.9	>10.0
Motilite (%)	<10.0	10.0 – 29.0	>30.0
Morfoloji (% normal)	<5.0	5.0 – 14.0	>15.0
Volüm (ml)		<1 ve >6	1.0 – 6.0

* Van Zyl (89, 188), Van Zyl ve ark. (73, 74, 187), Menkveld (41), Menkvel ve Kruger (42, 43, 189) ve Kruger ve ark. (76, 77); SC: strict Tygerberg kriteri (41, 75); WHO: 1992 Dünya Sağlık Örgütü kriteri (22)

KAYNAKLAR

1. Schirren C. Practical Andrology. Berlin: Verlag Briider Hartman, 1972: 10
2. Lode A. Untersuchungen iiber die Zahlen und Regene Rationsverhaltnisse der Spermatozoiden bei Hund und Mensch. Arch Gesamte Physiol 1891; 50: 278
3. Hotchkiss RS. Factors in stability and variability of semen specimens - observations on 640 successive samples from 23 men. J Urol 1941; 45: 875
4. MacLeod J, Heim LM. Characteristics and variations in semen specimens of 100 normal young men.J Urol 1945:54:474
5. Belding DL. Fertility in the male: I. Technical problems in establishing standards of fertility. Am J Obstet Gynecol 1933; 26: 868
6. Williams WW, McGugan A, Carpenter HD. The staining and morphology of the human spermatozoon. J Urol 1934; 32: 201
7. Gary WH, Hotchkiss RS. Semen appraisal. A differential stain that advances the study of cell morphology. JAMA 1934; 102: 587
8. Pollak OJ, Joel CA. Sperm examination according to the present state of research. JAMA 1939; 113: 395
9. Davis CD, et al. Therapy of seminal inadequacy. I. Use of pituitary chorionic and equine gonado-tropins. J Clin Endocrinol 1943; 3: 268
10. Harvey C, Jackson MH. Assessment of male fertility by semen analysis. An attempt to standardise methods. Lancet 1945; 2: 99,134
11. Hotchkiss RS. Fertility in Man. London: William Heineman Medical Books, 1945
12. Williams WW. Routine semen examinations and their interpretation. Trans Am Soc Stud Steril 1946; 139
13. Abarbanel AR, et al. Evaluation of the barren marriage. Minimal procedures. Fertil Steril 1951; 2: 1
14. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. Fertil Steril 1952; 2: 394
15. Freund M. Standards for the rating of human sperm morphology. Int J Fertil 1966; 11: 97
16. Freund M. Semen analysis. In Behrman SJ, Kistner SW, eds., Progress in Infertility, 2nd edn. Boston: Little, Brown & Co, 1968: 593
17. Eliasson R. Standards for investigation of human semen. Andrologie 1971; 3: 49
18. Eliasson R. Analysis of semen. In Behrman SJ, Kistner SW, eds. Progress in Infertility, 2nd edn. Boston: Little, Brown & Co, 1968: 691
19. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 1st edn. Singapore: Press Concern, 1980
20. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1987
21. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1992
22. World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999
23. Jager S, Kremer J, Van Slochteren-Draaisma T. A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male - detection of spermatozoal surface IgG with the direct Mixed Antiglobulin Reaction carried out on untreated fresh human semen. Im J Fertil 1978; 23: 12
24. Nahoum CR, Cardozo D. Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostate-vesicular fluid. Fertil Steril 1980; 34: 68
25. Kremer J. A simple sperm penetration test. Int J Fertil 1965; 10:209
26. Zavos PM, Cohen MR. Bovine mucus penetration test: an assay for fresh and cryopreserved human spermatozoa. Ferril Steril 1980; 34: 175
27. Mortimer D, et al. A simplified approach to sperm-cervical mucus interaction testing using a hyaluronate migration test. Hum Reprod 1990; 5: 835
28. Kremer J, Jager S. The sperm—cervical mucus contact test: a preliminary report. Fertil Steril 1976; 27: 335
29. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free hamster ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol Reprod 1976; 15: 471
30. Franken DR, et al. Hemizona assay and teratozoospermia: increasing sperm insemination concentrations to enhance zona pellucida binding. Fertil Steril 1990; 54: 497
31. Hcnkel R, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and ART. Reprod Biomed Online 2003; 7: 477
32. Krugcr TF, Menkveld R. Acrosome reaction, acrosin levels, and sperm morphology in assisted reproduction. Assist Reprod Rev 1996; 6: 27
33. Henkel R, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertil Steril 2005; 83: 635
34. Rhemrev JPT, et al. The acrosome index and the fast TRAP as protection of IVF outcome. Hum Reprod 2001; 16: 1885
35. McDonough P Editorial comment: has traditional sperm analysis lost its clinical relevance? Fertil Steril 1997; 67: 585
36. Schrader SM. Safety guidelines for the andrology laboratory. Fertil Steril 1989: 51; 387
37. Mordmer D. The male factor in infertility. Part I: Semen analysis. Curr Probl Obstet Gynecol Fertil 1985; 8: 4
38. Alexander NJ. Male evaluation and semen analysis. Clin Obstet Gynecol 1982; 25: 463

39. Mortimer D. Practical Laboratory Andrology. Oxford: Oxford University Press 1994
40. Menkveld R, Kruger TF. Basic semen analysis. In Acosta AA, Kruger TF, eds. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction, 2nd edn. Carnforth: Parthenon Publishing, 1996: 53
41. Menkveld R. An investigation of environmental influences on spermatogenesis and semen parameters. PhD dissertation (in Afrikaans), Faculty of Medicine, University of Stellenbosch, South Africa, 1987
42. Elzanaty S, Malm J, Giwercman A. Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. Hum Reprod 2005; 20: 221
43. Menkveld R, Kruger TF. Basic semen analysis. In Acosta AA, et al. eds. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Baitimore: Williams and Wilkins, 1990:68
44. Freund M. Performance and interpretation of the semen analysis. In Rolands M, ed. Management ot the Infertile Couple. Springfield: Charles C Thomas, 1968: 48
45. Zaneveld LJD, Polakoski KL. Collection and the physical examination of the ejaculate. In Hafez ESE, ed. Techniques of Human Andrology. Amsterdam: Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1977: 147
46. Mandal A, Bhattacharyya AK. Studies on the coagulational characteristics of human ejaculates. Andrologia 1985; 17:80-6
47. Amelar RD. Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. J Urol 1962; 87: 187
48. Mann T. Biochemical appraisal of human semen. In Joel CA, ed. Fertility Disturbances in Men and Women. Basel: Karger, 1971: 146
49. Portnoy L. The diagnosis and prognosis of male infertility: a study of 44 cases with special reference to sperm morphology. J Urol 1946; 48: 735
50. Vermeiden JPW, et al. Pregnancy rate is significantly higher in in vitro fertilization procedure with spermatozoa isolated from nonliquefying semen in which liquefaction is induced by a-amylase. Fertil Steril 1989; 51: 149
51. Tucker M, et al. Use of chymotrypsin for semen preparation in ART. Mol Androl 1990; 2: 179
52. Hancock P, McLaughlin E. British Andrology Society guidelines for the assessment of post vasectomy semen samples. J Clin Pathol 2002; 55: 812
53. Kvist U, Bjorndahl L. Manual on Basic Semen Analysis. ESHRE Monographs. Oxford: Oxford University Press, 2002
54. Eliasson R. Supravital staining of human spermatozoa. Fertil Steril 1977; 28: 1257
55. Menkveld R. Leukocytespermia. In Daya S, Harri-son RF, Kempers RD, eds. Advances in Fertility and Reproductive Medicine. International Congress Series. Amsterdam: Elsevier, 2004; 1266: 218
56. Goldenberg RL, White R. The effect of vaginal lubricants on sperm motility in vitro. Fertil Steril 1975; 26: 872
57. Carruthers GB. Assessment of the semen. In Philipp EE, Carruthers, GB, eds. Infertility. London: William Heinemann Medical Books, 1981: 195
58. Appell RA, Evans PR. The effect of temperature on sperm motility and viability. Fertil Steril 1977; 28: 1329
59. Makler A. The thickness of microscopically examined seminal samples and its relationship to sperm motility estimation. Int J Androl 1978; 1: 213
60. Foigeri T, et al. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. Hum Reprod 1993; 8: 1863
61. Barthelemy C, et al. Tail stump spermatozoa: morphogenesis of defect. An ultrastructural study of sperm and testicular biopsy. Andrologia 1989; 22: 417
62. Eliasson R, et al. The immotile-cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infection and male sterility. N Engl-JMed 1977; 297: 1
63. Atherton RW. Evaluation of sperm motility. In Hafez ESE, ed. Techniques of Human Andrology. Amsterdam: Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1977: 173
64. MacLeod J, Pazianos A, Ray BS. Restoration of human spermatogenisis by menopausal gonado-trophins. Lancet 1964; 1: 196
65. Purvis K, Brekke I, Tollefsrud A. Epididymal secretory function in men with asthenoterato zoos permia. Hum Reprod 1991; 6: 850
66. Bar-Sagie D, Mayevsky A, Bartoov B. A fluorometric technique for simultaneous measurement of pH and motility in ram semen. Arch Androl 1981; 7: 27
67. Kesseru E, Leon F. Effect of different solid metals and metallic pairs on human sperm motility. Int J Fertil 1974; 19: 81
98. Comhaire F, Verschraegen G, Vermeulen L. Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. Int J Androl 1980; 3: 32
99. WolffH. Methods for the detection of male genital tract inflammation. Andrologia 1998; 30 (Suppl 1): 35
100. Shekarriz M. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. J Assist Reprod Genet 1995; 12:70
101. WolffH, Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. Fertil Steril 1988; 49: 497
102. Eggert-Kruse W, et al. Differentiation of round cells by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. Fertil Steril 1992; 58: 1046
103. Tomlinson MJ, et al. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? Hum Reprod 1992; 10: 517

104. Tomlinson MJ, et al. Round cells and sperm fertilizing capacity: the presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization. Fertil Steril 1992; 58: 1257
105. Ricci G, et al. Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. Hum Reprod 2000; 15: 1329
106. Ludwig M, et al. Evaluation of seminal plasma parameters in patients with chronic prostatitis or Icukocytospermia. Andrologia 1998; 30 (Suppl 1): 41
107. Esfandiari N, et al. Utility of nitroblue tetrazolium test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. J Androl 2003; 24: 862
108. Punab M, et al. The limit of leukocytospermia from the microbiological viewpoint. Androtogia 2003; 35:271
109. WolffH. The biological significance of white blood cells in semen. Fertil Steril 1995; 63: 1143
110. Fedder J. Nonsperm cells in human semen: with special reference to seminal leukocytes and theit possible influence on fertility. Arch Androl 1996; 36:41
111. Leib Z, et al. Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: an enigma or reality? Fertil Steril 1994; 61: 1109
112. Menkveld R, et al. Morphological sperm alternations in different types of prostatitis. Andrologia 2003; 35: 288
113. Politch JA, et al. Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. Fertil Steril 1993; 60: 372
114. Berger RE, et al. The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. Fertil Steril 1982; 37: 557
115. WolfFH, et al. Leukocytospermia is associated with poot semen quality. Fertil Steril 1990; 53: 528
116. Tomlinson MJ, Barratt CLR, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocytes sub-populations in semen suggest they are not a cause of male infertility. Fertil Steril 1993; 60: 1069
117. Aitken RJ, Baker HWG. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans? Hum Reprod 1995; 10: 1736
118. Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male fertility. Int J Andtol 1993; 16: 1
119. Yanushpolsky EH, et al. Antibiotic therapy and leukocytospetmia: a prospective, randomised, controlled study. Fertil Steril 1995; 63: 142
120. Trum JW, et al. Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. Fertil Steril 1998; 70: 315
121. Rodin DM, Larone D, Goldstein M. Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. Fertil Steril 2003; 79 (Suppl 3): 1555
122. Eggert-Kruse W, et al. Induction of immunoresponse by subclinical male genital tract infection? Fertil Steril 1996; 65: 1202
123. Cottell E, et al. Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants? Fertil Steril 2000; 74: 465
124. Willen M, et al. The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men. Scand J Urol Nephrol 1996; 30: 387
125. Omu AE, et al. Seminal immune response in infertile men with leukocytospermia: effect on antioxidant activity. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 86: 195
126. Kaleli S, et al. Does leukocytospetmia associate with poor semen parameters and sperm function in male fertility? The role of different seminal leukocytes concentrations. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 89: 185
127. Kiessling AA, et al. Seminal leukocytes: friends or foes? Fertil Steril 1995; 64: 196
128. Chan PJ, et al. White blood cells in semen affect hyperactivation but not sperm membrane integrity in the head and tail regions. Fertil Stcril 1994; 61: 986
129. Arata de Bellabarba G, et al. Nonspcrm cells in human semen and their relationship with semen parameters. Arch Androt 2000; 45: 131
130. Aitken RJ, et al. Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to generation of oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. J Reprod Fertil 1992; 94: 451
131. Alvarez JG, et al. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril 2002; 78: 319
132. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 542
133. Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. Hum Reprod 1990; 5: 639
134. Anderson DJ. Should male infertility patients be tested for leukocytospermia? Fertil Steril 1995; 63: 246
135. Hillier SL, et al. Relationship of bacteriologic characteristics to semen indices in men attending an infertility clinic. Obstet Gynecol 1990; 75: 800
136. Purvis K, Christiansen E. The impact of infection on sperm quality. J Br Fertil Soc 1995; 1: 31
137. Bieniek KW, Riedel H-H. Bacterial foci in teeth, oral cavity, and jaw - secondary effects (remote action) of bacterial colonies with respect to bacteriospermia and subfertility in males. Andrologia 1993; 25: 159
138. Busolo F, Zanchetta R, Cusinato R. Microbial flora in semen of asymptomatic infertile men. Andrologia 1984; 16:269

139. Skau PA, Folstad I. Do bacterial infections cause reduced ejaculate quality? A meta-analysis of antibiotic treatment of male infertility. Behavioral Ecol 2003; 14: 40
140. Eggert-Kruse W, et al. Antispcrm antibodies and microorganisms in genital secretions - a clinical significant relationship? Andrologia 1998; 30 (Suppl 1):61
141. Micic S, Petrovic S, Dotlic R. Seminal antisperm antibodies and genitourinary infections. Urology 1990; 35: 54
142. Close CE, Roberts PA, Bcrger RE. Cigarettes, alcohol and marijuana arc related to pyospermia in infertile men. J Urol 1990; 144: 900
143. Trummer H, et al. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. Hum Reprod 2002; 17: 1554
144. Matthews GJ, Goldstein M, Schlegel HJM. Non-bacterial pyospermia: a consequence of clomiphene citrate therapy. Int J Fertil Menopaus Stud 1995; 40: 187
145. Branigan EF, Muller CH. Efficacy of treatment and recurrence rate of leukocytospermia in infertile men with prostatitis. Fertil Steril 1994; 62: 580
146. Branigan EF, Spadoni LR, Muller CH. Identification and treatment of leukocytospermia in couples with unexplained infertility. J Reprod Med 1995; 40: 625
147. Erel TE, et al. Antibiotic therapy in men with leukocytospermia. Int J Fertil 1997; 42: 206
148. Krisp A, et al. Treatment with levofloxacin docs not resolve asymptomatic leukocytospermia - a randomised controlled study. Andrologia 2003; 35: 244
149. Mamyama DK, et al. Effects of white blood cells on the in vitro penetration of zona-free hamster eggs by human spermatozoa. J Androl 1985; 6: 127
150. Montag M, Van der Ven H, Haidl G. Recovery of ejaculated spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection after anti-inflammatory treatment of an azoospermic patient with genital tract infection: a case report. Andrologia 1999; 31: 179
151. Malallah YA, Zissis NP. Effect of minocycline on the sperm count and activity in infertile men with high pus cell counts in their seminal fluid. J Chemother 1992; 4: 286
152. Yamamoto M, et al. Antibiotic and ejaculation treatments improve resolution rate of leukocytospermia in infertile men with prostatitis. Nagoya JMedSci 1995; 58:41
153- Ekwere PD, Etuk EH. Semen quality among subfertile males following treatment with ofloxacin. CurrTherRes 1991; 50: 425
154. Bar-Chama N, Golubofif E, Fisch H. Infection and pyospermia in male infertility. Is it really a problem? Urol Clin North Am 1994; 21: 469
1 55. Schlegel PN, Chang TSK, Marshall FF. Antibiotics: potential hazard to male fertility. Fertii Steril 1991; 55: 235
156. Blom E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin—nigrosin. Fertil Steril 1950; 1: 176
157. Bjorndahl L, et al. Andrology Lab Corner. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. J Androl 2004; 25: 671
158. Comhaire F, er al. Why do we continue to determine (X-glucosidase in human semen? Andrologia 2002; 34: 8
159. Maegawa M, et al. Concentration of granulocyte elastase in seminal plasma is not associated with sperm motility. Arch Androl 2001; 47: 31
160. Blenk H, Hofstetter A. Complement C3, coeruloplasmin and PMN-elastase in the ejaculate in chronic prostato-adnexitis and their diagnostic value. Infections 1991; 19 (Suppl 3): 138
161. Amelar RD. Infertility in Men. Philadelphia: FA Davies, 1966: 13
162. Knuth UA, Yeung C-H, Nieschlag E. Computer-ized semen analysis: objective measurement of semen characteristics is biased by subjective parameter setting. Fertil Steril 1987; 48: 118
163. Mortimer D, Goel N, Shu MA. Evaluation of the CellSoft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. Fertil Steril 1988; 50: 960
164. Kruger TF, et al. A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. Fertil Steril 1993; 59: 202
165. ESHRE Androiogy Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 142
166. ESHRE Androiogy Special Interest Group. Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. Hum Reprod 1996; 11: 1463
167. CooperTG, et al. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. Int J Androl 2002; 25: 306
168. Bjorndahl L, et al. ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training. Hum Reprod 2002; 17: 1299
169. Franken DR, et al. Monitoring technologist reading skills in a sperm morphology quality control program. Fertil Steril 2003; 79 (Suppl 3): 1637
170. Alvarez C, et al. Biological variation of seminal parameters in health subjects. Hum Reprod 2003; 18: 2082
171. Mortimer D, et al. Annual patterns of human sperm production and semen quality. Arch Androl 1983; 10: 1
172. Tjoa WS, et al. Circannual rhythm in human sperm count revealed by serially independent sampling. Fertil Steril 1982; 38: 454
173. Saint Pol P, et al. Circan'nual rhythms of sperm parameters of fertile men. Fertil Steril 1989; 51: 1030

174. Rojansky N, Brzezinski A, Schenker JG. Seasonality in human reproduction: an update. Hum Reprod 1992; 7: 735
175. Henkel R, et al. Seasonal changes in human sperm chromarin condensation. J Assist Reprod Genet 2001; 18:371
176. MacLeod J. The clinical implications of deviations in human spermatogenesis as evidenced in seminal cytology and experimental production of these deviations. In Proceedings of the Fifth Congress on Fertility and Sterility, Stockholm, June 16-22. Excerpta Medica International Congress Series. 1966; 133: 563
177. MacLeod J. Effect of chickenpox and of pneumonia on semen quality. Fertil Steril 1951; 2: 523
178. Fredricsson B. On the development of different morphologic abnormalities of human spermatozoa. Andrologia 1978; 10:43
179. Menkveld R, et al. Possible changes in male fertility overa 15-year period. Arch Androl 1986. 17: 143
180. Menkveld R, Kotze TJvW, Kruger TF. Relationship of human sperrn morphology with other semen parameters as seen in different reference populations. Hum Reprod 1992; 6 (Suppl 1): 96
181. Mehan DJ, Chehval MJ. A clinical evaluation of a new silastic seminal fluid collection device. Fertil Steril 1977; 28: 689
182. Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C. Semen analysis: an office technique. Urology 1973; 2: 605
183. Taylor PJ, Martin RH. Semen analysis in the investigation of infertility. Can Fam Phys 1981; 27: 113
184. Jouannet P, et al. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. 1. Study of sperm characteristics. Int J Androl 1988; 11: 379
185. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. VIII. A study of variation in semen quality. Fertil Steril 1952; 7: 387
186. MacLeod J. A possible factor in etiology of human male infertility. Fertil Steril 1962; 13: 29
187. Van Zyl JA, Korze TJvW, Menkveld R. Predictive value of spermatozoa morphology in natural fertilization. In Acosta AA, et al., eds. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990: 319
188. Van Zyl JA. The infertile couple. Part II. Examination and evaluation of semen. S Afr Med J 1980; 57: 485
189. Menkveld R, Kruger TF. Basic semen analysis: the Tygerberg experience. In Acosta AA, et al., eds. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990: 164
190. Ombelet W, ec al. Semen parameters in a fertile versus infertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. Hum Reprod 1997; 12:987
191. Zinaman MJ, et al. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J Androl2000;21: 145
192. Guzick DS, et al. Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men. N Bngl J Med 2001; 345: 1388
193. Gunalp S, et al. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population; an attempt to develop clinical thresholds. Hum Reprod 2001; 16: 110
194. Menkveld R, et al. Semen parameters including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardisation of in vivo thresholds. Hum Reprod 2001; 16: 1165

10

Erkek İnfertilitesi Otomatik Sperm Morfolojisi Değerlendirmesinde İlerlemeler

Kevin Coetzee, Thinus F. Kruger

Çeviri: *İbrahim Dönmez*[*], *Bülent Akduman*[*]

GİRİŞ

Normal sperm morfolojisinin, diğer semen parametrelerinden bağımsız olarak erkek fertilitesinin öngöreni olduğu gösterilmiştir. Bu çıkarımı değerlendirmek için, diğer herhangi bir manuel değerlendirilmiş semen parametreleri ile kıyaslandığında normal sperm morfoloji yüzdesi değerinin üstünlüğünü onaylayan iki literatür araştırması yapılmıştır.

İnsanlarda, spermatozoa içeren normal fertil ejakülat sadece akrozom ve başın şekil ve ebatında değil aynı zamanda nükleer vakuolizasyon derecesinde, persistan sitoplazmik damlacık boyutunda , orta parça bozukluğunda ve kuyruk anormalliklerinde önemli derecede morfolojik varyasyonlar gösterir[1]. 1950'den beri bir çok araştırmacı, insan sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde standardize bir kriter dizini oluşturmaya çalıştılar[3-9]. Bu kriterlerin/kılavuzların evrensel olarak kabul edilmesindeki en büyük noksan, gözlemciler arası, gözlemci içi ve laboratuarlar arasında gözlenen geniş katsayı varyasyonlarıdır. Manuel değerlendirilen sperm morfoloji neticelerinin önemi, kesinlik ve güvenirlilik eksikliğine bağlı olarak bir çok kişi tarafından sorgulanmıştır. Manuel değerlendirmede ortaya çıkan varyasyonların çoğunluğu, değerlendirmenin subjektif doğasına ve metodolojik tutarsızlıklara atfedilebilir.

Manuel olarak değerlendirilmiş sperm morfoloji neticelerine güvende eksikliğe rağmen, bir çok klinik standart, manuel değerlendirilmiş semen analizinin kullanımında ısrarcıdır[1,10].

Otomatik sistemlerin objektivitenin arttırılması, kesinlik ve sperm morfoloji değerlendirilmesinin tekrar edilebilmesi sağlama gücü vardır ve doğru sperm kinematik ölçümlerini sağlayarak bunu daha da değerli kılarlar. Bu seçenek çok cezbedici görülmekle beraber, rutin androloji laboratuarlarında çok sayıda otomatik sistem yer almamaktadır. Günümüzde kullanılan sistemlerin çoğu, sistemlerin objektif biyolojik rezolüsyonlarından dolayı daha deneysel durumlarda kullanılmaktadırlar. Sistemlerin rutin kullanılmasına karşı direncin muhtemel nedenleri şunlardır: (1) sistemlerin maliyeti, (2) bazı sistemlerin teknik kısıtlılığı (yazılım ve donanım) ve (3) her bir sistemin değerini kanıtlayacak yayınlanmış teknik ve klinik sınırlı sayıda yayın olmasıdır[11]. Sadece, fertilite ile ilişkili objektif otomatik semen analiz sonuçlarının değerinin geniş ölçekli prospektif randomize çalışmalarla devamlı gösterilmesi otomatik sistemlerin rutin androloji laboratuarına girmesinde teşvik edici artışa neden olacaktır[12].

[*] Karaelmas Üniversitesi, Üroloji Anabilim Dalı, Zonguldak.

OTOMATİK SİSTEMLER

Bu bölümün odağı otomatik sistemler olmasına rağmen, geliştirilen yarı otomatik sistemler ile manuel teknikler de objektif sistemler olarak sınıflandırılabilir. Bu teknikler ve sistemler genellikle basit ve ekonomik olmaları nedeniyle önemlidir. Calamera ve ark.[13] sadece bir video kamera, monitör ve mikroskop kullanan yeni bir metot tanımladılar ve modifiye ettiler. Üç bağımsız gözlemci, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1992[14] kılavuz ve katı kriterlerini kullanarak normal sperm morfolojisinin asetat kaplı maskesini yarattılar. Benzer şekilde, karşılaştırmalı bir çalışmada (manuel, yarı otomatik ve otomatik arasında) Goulart ve ark.[15] operatörün bilgisayar faresini kullanarak her şeyi (katı kriterler) ve değerlendirme prosedürünü kontrol ettiği manuel bir sistem geliştirdiler. Baş şekillerinin ve boyutlarının objektif ölçümüne dayalı insan spermini sınıflandırmadaki yarı otomatik metotlar da geliştirildi[15,16], burada operatör değerlendirme prosedürünü interaktif olarak kontrol etmektedir. Goulart ve ark.[15] çalışmasında sperm analizini gerçekleştirmede yarı otomatik sistemin en güvenilir ve güvenli metot olduğu saptanmıştır çünkü böyle bir sistem operatörün doğrulamasına ya da olası bilgisayar hatalarını düzeltmesine olanak tanımaktadır. Bu sistemler sperm morfolojisini değerlendirmede belli oranda doğruluk ve güvenirlilik göstermiş olmasına rağmen işlem için gereken zaman sınırlama nedenidir.

Gerçek otomatik sistemler bir mikroskop, bir video kamera, bir kare yakalayıcı ve morfoloji yazılımını içerir. Sistem şu şekilde çalışır: Video kamera görüntüyü (dijitalizasyon) analiz için depolayan kare yakalayıcıya gönderir ve görüntü morfoloji yazılımı tarafından değerlendirilir ve istatistiksel analizleri yapılır. Spermatozoanın fark edilmesi ve diğer hücrelerin çıkarılması yazılımın sperm şekli, boyutu ve renk (boya) yoğunluğu spesifikasyonlarına (geçit) bağlıdır. Spermatozoa tanındığı ve atıklardan ve diğer hücrelerden ayrıldığı zaman sperm başı, orta bölüm, akrozom ve diğer sitolojik özellikler üzerinde metrik ölçümler uygulanır. Yazılım spermatozoayı normalde yazar tarafından istenen boyutlara ve kriterlere göre tanımlamaya programlanmıştır[17]. Bu kullanılan boyama prosedürüne (Papanicolaou karşı Diff-Quik®) ve kullanılan sınıflandırma sisteminin değer aralığına (ör., katı kriterler, WHO prensipleri, biyolojik seçim kriterleri, vb.) bağlı olabilir.

Yukarıdaki konfigürasyonların pek çok varyasyonları (donanım ve/veya yazılım) bir zayıflığı yok etmek ve/veya güçlü olduğu bir noktayı kullanmak amacıyla geliştirilebilir (Tablo 10.1). Sofitikis ve ark.[18] sperm morfolojisini nicel olarak değerlendirmede normal ışıklı bir mikroskop yerine aynı odaklı taramalı bir lazer mikroskobu kullandılar. Bu nedenle boyama prosedürünün etkilerini engellemek için sperm morfometrik parametrelerin normal aralıklarını belirlemede boyasız semen örnekleri kullanabildiler.

Başlangıçtaki ilk sistemler spermatozoayı gruplara ayırmada sadece morfometrik ölçümlere dayandı. En önemli klinik belirti olarak gösterilen sperm başı şeklinin değerlendirmesini içeren işaret metodunu tanıtan Hamilton Thorne Araştırma entegre görsel optik sistemi (IVOS) değerlendirme doğruluğu arttırıldı[19,32]. Sistemin şekli değerlendirme yeteneği önemlidir, çünkü doğru hücre başı görünüm oranı her zaman normalliği garantilemez. Diğer sistemler de değerlendirme prosedüründe şekil analiz metotlarında birleşmişlerdir, örneğin Hobson Sperm Tracker[20].

Garrett ve ark.[33] tarafından kullanılan sperm başı otomatik morfometrik analiz sistemi (SHAMAS) bir diğer sınıflandırma parametresini içerir, %Z: insan oositinin zona pellucidasına bağlanan spermlere uyan karakteristik spermlerin yüzdesi. Bu "zona pellucida tercihli" değerler aksiyel simetri, sperm-zona bağlanması için önemli olan dar ense ve büyük akrozom bölgesini ve bu nedenle normal dölleme potansiyelini gösterir.

KESİT HAZIRLIĞI VE BOYAMA

Ombelet ve ark.[34] tarafından dünya genelinde yürütülen bir araştırma sonucunda sperm morfolojisinin değerlendirilmesi amacıyla çok çeşitli metodolojilerin kullanıldığı ortaya çıkmıştır. Kabul edilen ve uyarlanan metotlar semen örneklerinin hazırlığı ve sperm hücrelerinin boyanması prosedürlerinin yanı sıra normal ve anormal hücreleri belirlemede kullanılan sınıflandırma sistemlerini içerir. Ombelet ve ark.[34], sperm morfolojisi değerlendirme metodolojisinin standart hale getirmenin gerektiği sonucuna vardılar. Tıpkı sperm morfolojisinin görsel değerlendirilmesinde olduğu gibi bilgisayar destekli sperm morfoloji analizörlerinin kullanıcılarının kaliteli kontrolün ve standartlaştırmanın prensiplerinin doğru değerlendirmede önemli olduğunun farkına varmaları gerekmektedir[35].

OTOMATİK SPERM MORFOLOJİ DEĞERLENDİRMESİNDEKİ GELİŞMELER

Tablo 10.1: *Otomatik sperm morfoloji analizörleri, Referans 31'den değiştirilmiştir*

Yazılım	Yazar	Şirket	Araç	Kriterler ve ölçümler
FERTECH SMA	Coetzee ve ark.[17] Kruger ve ark.[19,21,22] Laquet ve ark.[23] Menkvelt ve ark.[24]	FERTECH, Norfolk, VA	IVOS, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA	Katı kriterler: baş boyutu ve şekli (işaret metodu) ve akrozom boyutu
CellForm-Human	Davis ve ark.[12], Davis Gravance[25]	Microsoft Corp., Bellview, WA	Combination System	WHO 1987: boy, en, yer, çevre ve en/boy oranı
HDATA	MacLeod ve Irvine[26]	Pyramid Technical Consultants, Waltham, MA	HTM-S 2030, Hamilton, Thorne Research, Beverly, MA	WHO 1987: boy, en ve yer
Morphologizer II	Wang ve ark.[27,28]	Cyro Resources Ltd	Combination System	WHO 1987: yer, çevre, en/boy oranı, yuvarlaklık, en ve boy
MOP-Videoplan	Mundy ve ark.[29]	Kontron	Combination System (SEM)	NG: yer, çevre, başın maksimum çapı, başın eni, orta bölümün eni, orta bölümün boyu ve kuyruk boyu
Microsoft Professional Basic 7.0	Garret ve Baker[30]	Microsoft Corp., Redmond, WA	Combination System	WHO 1992: 32 morfometrik parametre seti (boyut, şekil ve boyama heterojenliği)
NG	Sofikitis ve ark.[18]	NG	Confocal scanning laser microscope, Lasertec, Yokohoma, Japan	Üreken erkeklerin ±2SD: boy, en, orta bölümün boyu, sperm kuyruğunun ana parçasının boyu
Hobson Sperm Tracker	El-Ghobashy ve West[20]	Hobson Tracker United, Sheffield, UK	Combination System	WHO 1999: baş boyu 4-5 µm, en 2.5-3.5 µm, boy/en oranı 1.5-1.75 ve akrozom boyutu totalin %40-70'i, kuyruk ve akrozomal kofullar dahil
Zeiss image-Processing system KS400 (Zeiss-Vision)	Goulart ve ark.[15]	Zeiss, Germany	Combination System	Katı kriterler, baş boyutu ve şekli

NG, verilmemiş; SEM, taramalı elektron mikroskopu; WHO, Dünya Sağlık Örgütü

Örnek hazırlanması ve boyama sperm morfoloji değerlendirmelerinin kesinliğini ve güvenirliliğini belirgin şekilde etkileyebilir. Bu prosedürlerden kaynaklanabilecek varyasyonlar görsel değerlendirme kullanan deneyimli bir teknisyen tarafından büyük ölçüde üstesinden gelinebilir, fakat otomatik bir sistem kullanıldığında bu mümkün olmayabilir[24]. Otomatik sistemlerin değerlendirme prosedürünün doğası nedeniyle hazırlık eksiklikleri ve artefaktlar için dengeleme araçları yoktur. Örneğin, hücre boyama yoğunluğuyla ilgili arka planda gölgelenmedeki küçük farklılıklar yanlış sınıflandırma ya da hücreyi sperm olarak tanımlayamamaya yönlendirebilen dijitalleştirme hatalarıyla sonuçlanabilir.

Davis ve Gravance[25] yıkanmış örneklerin CellForm-Human metoduyla belirlenen normal sperm yüzdesinin yıkanmamış kontrollerden farklı olmadığını buldular. Ancak, semen hazırlığı ve kesit boyama metotları nedeniyle ortaya çıkan teknik varyasyonlar örnekler yıkandığında ve simirden önce tekrar standart bir konsantrasyona ($150\text{-}200x10^6$) alındığında azaltılabilir. Lacquet ve ark.[23] da tekrar $100x10^6$ hücre/ml.de konsantrasyona alınmış yıkanmış semen örnekleri kullanmayı tercih etmişlerdir. Her bir karede yaklaşık beş hücrenin analiz edilebilmesini garantilemek için bu solüsyondan ince, eşit olarak yayılmış simirler yapılmıştır. Şimdi semen örneğini önceden yıkamak ve ortaya çıkan sperm örneğinin konsantrasyonunu ayarlamak tercih edilen uygulamadır. Tek yıkamalı ya da çift yıkamalı bir prosedür uygulanabilir. Tek yıkama uygulanırsa santrifüjden önce örnek yeterli miktarda seyreltilmelidir ($\geq$ 1 : 5, semen/medya). Semen örneğini yıkamak iki nedenle önemli olabilir: (1) olabildiğince çok hücresiz bileşenleri gidermek ve (2) sperm örneğini yoğunlaştırmak[11]. Yüksek seminal bir plazma konsantrasyonunun varlığı boyama prosedürü sırasında yoğun arka plan boyanmasına ve pullanmaya neden olur. Boyutu ortaya çıkan sperm örneğinin konsantrasyonuna bağlı bir damla temiz bir kesit üzerine ince bir şekilde sürülmeli ve havada kurutulmalıdır (oda ısısında). Örnek konsantrasyonunu uyarlayabilme kapasitesi özellikle oligozoospermik örnekler için önemlidir. Okuma zamanını en uygun hale getirmek için örnek işleme prosedürü her bir yüksek-alan büyütmesinde 10 ila 20 arasında (her bir bilgisayar karesinde 5-10 sperm) bir sonuç vermelidir. Bu nedenle otomatik değerlendirme için gerekli sperm yoğunluğu manuel değerlendirme için gerekenin iki katıdır.

Sperm morfolojisini değerlendirmede en sık kullanılan boya ya da boyama metotları hematoksilin boya, Papanicolaou metodu, Shorr metodu, Spermac metodu ya da Diff-Quik metodudur. Spermlerin boyanmasında Papanicolaou ya da hematoksilin yerine GZIN kullanıldığında morfometrik ölçümlerin daha doğru ve kesin olduğu bulunmuştur[25]. Lacquet ve ark.[23] beş farklı Diff-Quik (Hemacolor Kit, Merck) boyama prosedürlerinin sonuçları arasında hiçbir istatistiksel fark bulmamışlardır. Menkveld ve ark.[24], otomatik değerlendirmede yıkama ve boyama metotlarının (Papanicolaou, Shorr, Diff-Quik ve Spermac) etkilerini karşılaştıran bir çalışmada semen örneklerinin bir kez yıkandığı ve Diff-Quik boya ile boyandığı manuel değerlendirmeyle karşılaştırılabilecek sonuçlar elde ettiler. Wang ve ark.[27], basitleştirilmiş Shorr boyama prosedürünü kullanarak, Papanicolaou boyama prosedürüne kıyasla spermatozoada daha uzun boy, en ve boy/en oran ortalamasıyla sonuçlanan daha az çekme meydana geldiğini buldular. Değişik boyama prosedürleri sonucunda sperm hücrelerinde değişik kromatik ve fiziksel görünümler ortaya çıkar. Bu Papanicolaou ve Diff-Quik boyama metotları için kesinlikle doğrudur[36].

Bu nedenle boyut-spesifik yazılım (Papanicolaou ve Diff-Quick) Hamilton Thorne Araştırma (IVOS) sistemine yüklenmiştir. Bunun sonucunda Papanicolaou ve Diff-Quik metotlarına göre boyanmış bilgisayar-analizli normal sperm morfolojisi değerleri (n = 97) arasındaki uyuşmayı belirlemek için bir çalışma yapılmıştır[17]. Diff-Quik metodu kullanıldığında daha yüksek normal sperm morfoloji yüzdesi lehinde belirgin bir %1.6 eğilim elde edilmiştir. Gelecekteki otomatik değerlendirme çalışmalarında metodolojiyi standartlaştırmak için bu iki metottan biri seçilmelidir. Basitliği, kısa boyama süresi ve iyi kontrast nedenleriyle Diff-Quik boyama prosedürü tercih edilen boyama metodu olarak seçilmiştir. Değişik boyalar kullanıldığında görülen bu farklılıklar yazılım programının kesinlikle kullanılan hücre boyama metotlarına göre geliştirilmiş olduğundan emin olunması gerektiğini göstermektedir.

Bu sonuçlar prosedürlerin standartlaştırılmasının ve hücre tanımlanmasını ve değerlendirmesini en iyi şekilde sonuçlandıracak prosedürlerin seçilmesinin önemini göstermektedir. Gerekenler: tüm spermlerin aynı odak yüzeyinde olmasını sağlayacak ince, eşit şekilde yayılmış simirler (her bir karede beş sperm hücresi) ve minimum arka

plan boyanması, iyi kontrast ve iyi renk farklılığı sağlayacak bir boyama prosedürüdür. Yüksek kalitede kesitlerin yeniden yapılabilirliği, normal sperm morfolojisi değerlendirmelerini yapmak için gereken zamanı minimumda tutmayı sağlayacaktır.

DEĞERLENDİRME DOĞRULUĞU

Daha iyi bir alternatifi olmasına rağmen kesin olmayan ve değersiz ölçümlerle sonuçlanan sperm morfolojisinin manuel değerlendirmesi devam etmektedir. Normal spermlerin manuel değerlendirmelerinde varyasyon aralığı laboratuarlar içinde ve arasında %100'e kadar yüksektir. Çoğu laboratuar için ortalama varyasyon aralığı muhtemelen %30-60 aralığındadır[37]. Laboratuarların kesin kalite kontrol programlarını uygulamaları ve akreditasyon kuruluşlarının prensipleri ve şartlarına göre yetkilendirilmeleri için artan baskılar nedeniyle varyasyonun bu yüksek olası seviyesi artık kabul edilmeyebilir. Eğer otomatik sistemler tek alternatifi temsil ederse, soru mevcut versiyonların rutin uygulamalar için kabul edilebilir kesinlik seviyesine ulaşıp ulaşmadığı olmalıdır.

Doğru ve kesin olmamakla beraber sperm morfolojisinin görsel değerlendirmesi otomatik morfolojik değerlendirmenin sonuçları ile karşılaştırıldığında daha üstün pratik bir standart sağlar. Bu sistemlerin kabul edilebilmesi için varyasyon katsayılarının görsel analizlerde elde edilen varyasyon katsayısı büyüklüğünden daha küçük olması gerekmektedir. Katı kriterler sınıflandırma sistemlerinin belirgin felsefesinin sperm morfolojisi değerlendirmesindeki varyasyonları kısıtlaması yönünden benzersizdir. Bu, Menkveld ve ark.[32] tarafından yapılan, deneyimli teknisyenler tarafından tekrarlı manuel değerlendirmeler için yapılan ve %5.21 ila 27.76 arasında değişen bağıntılı olarak düşük varyasyon katsayılarının elde edildiği çalışmada açıkça gösterilmiştir. Bu nedenle amaç varyasyon katsayılarını <%10 olarak üretecek sistemler geliştirmek olmalıdır.

Davis ve ark.[12], aynı spermi bilgisayarda tekrarlı olarak ölçerek, tekrarlı ölçümde genelde <%1 varyasyon katsayısı elde etmişlerdir. Çalışmalarında Kruger ve ark.[19] 255 hücreyi üç kez başarılı olarak analiz etmiş ve 0.85, 0.80 ve 0.85 (K istatistik > 0.75, ör., mükemmel uyum) şeklinde ikili uyumlar elde etmişlerdir. Davis ve ark.[12] diğer faktörler arasındaki varyasyonları da ayırmış ve şu varyasyon katsayılarını elde etmişlerdir: erkekler arasında %1.84-4.17, kesitler arasında %0.6-1.38, tekrarlar arasında %0.16-1.10. Yıkanmış örneklerden boyalı simirler kullanılarak otomatik bir sistem tarafından belirlenmiş sperm morfoloji sonuçlarının Garrett ve Baker[30] tarafından yapılan bir çalışmada aynı semen örneğinde >%4'e ve değişik boya gruplarında <%7'ye eşit bir varyasyon katsayısına sahip olduğu gösterilmiştir. Yazarlar, bu sonuçların manuel değerlendirme kullanan deneyimli teknisyenlerinkinden daha iyi olduğu sonucuna varmışlardır. IVOS kullanıldığında 100 hücre ve 200 hücre otomatik değerlendirmesinde ortalama kesit-içi (üç tekrarlı ölçüm) varyasyon katsayısının sırasıyla %9.73 ve %8.30 olduğu bulunmuştur. Ancak, IVOS kullanıldığında elde edilen ortalama kesit-arası varyasyon katsayısı %15.39'dur[38]. Kesit-içi değerlendirmelere kıyasla kesit-arası değerlendirmelerde elde edilen yaklaşık %6-7 daha yüksek varyasyonlar bir kez daha örnek ve kesit hazırlığının önemini işaret etmektedir.

Önvarsayımlara göre tekrarlı değerlendirmeler için ortalama varyasyon katsayısının hem değerlendirilen sperm sayısının hem de normal formların yüzdesinin bir fonksiyonu olduğu bilinmektedir[25,39]. Düşük normal sperm yüzdesi (<%10) olan semen örnekleri tekrar analizlerinde doğal olarak daha yüksek değişkenlik gösterecektir. Davis ve Gravance[25] istikrarlı bir normal spermin yüzdesi tahmini elde etmek için en az 200 hücrenin değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır. Üç değerlendirme üzerinden ortalama normal sperm morfolojisi ≤%10 olan bir hasta grubunun analizi sonucunda 100 ve 200 hücre için varyasyon katsayısı sırasıyla %13.9 ve %10.63[38] olarak elde edilmiştir. Bu nedenle, düşük normal sperm sonucu olan hastalarda 200 ya da daha fazla hücre değerlendirilirse sperm morfoloji sonuçlarında daha fazla güvenirlilik elde edilecektir. Otomatik sistemlerde kullanılan işlemci hızı arttıkça her bir örnekte (her bir kesit) 200 ya da daha fazla hücrenin değerlendirilmesi daha uygulanabilir olacaktır.

Geleneksel manuel metot ve morfolizör donanımlı bir bilgisayar tarafından analiz edilen sperm morfolojisini karşılaştıran bir çalışmada Wang ve ark.[27] normal formların yüzdesinde iki metot arasında belirgin bir korelasyon (r = 0.52; p<0.0001) buldular. Metotlar tarafından sınıflandırılan normal formların ortalama yüzdeleri belirgin olarak farklı olmamasına (%72.4'e karşı %72.3) rağmen uyumun limitleri nispeten büyüktü

(%-20.5'ten %+20.7'ye). Davis ve ark.[12], manuel ile otomatik sınıflandırmaları karşılaştırarak, %60 kesin bir uyum elde ettiler. Aynı zamanda otomatik sınıflandırma metodunun her zaman manuel metottan daha düşük bir normal sperm yüzdesiyle sonuçlandığını buldular: %50.9'a kıyasla %61.9. Kruger ve ark.[22], körlemesine 43 kesit hazırlığını değerlendirerek, FERTECK değerlendirmelerinin %84'ünün manuel metot ile iyi kıyaslandığını buldu. Müteakip bir çalışmada Kruger ve ark.[19], manuel ve otomatik değerlendirmeleri arasındaki yüzde normal morfoloji (katı kriterler) sonuçlarını ilişkilendirdiler ve uyum sınırlarının %12.1 ila -15.5 arasında olduğunu buldular. Ancak, %0-20 aralığında yüzde normal sperm morfolojisinde uyum sınırları daha dardı (%8.4'ten -6.6'ya). Bu çalışma için Spearman korelasyon katsayısı, manuel değerlendirme uygulayan iki gözlemci arasında elde edilen korelasyona (r = 0.83) benzeyen, 0.85'ti. Katı kriterler için %14 üretkenlik kesme noktasını kullanarak Kruger ve ark.[21] manuel metoda benzer şekilde otomatik sistemin vakaların %81.3'ünü (65/80) sınıflandırabildiğini buldular. Video teyp materyalini analiz etmek için (arşiv) ikiye iki mevzili birbirinin aynı dört otomatik araç (Cell-Trak-S) kullanıldı[40]. Tekrarlı ölçümlerde elde edilen varyasyon katsayıları tüm araçlarda ölçülen her bir değişken %1 ila 8 arasındaydı. Kruger ve ark.[41] iki IVOS kurulumu (Tygerberg'e karşı Norfolk) için makineler arası varyasyonu inceleyerek aynı kesitleri değerlendirdiler. Karşılaştırma iki sistem tarafından üretilen ortalama normal form yüzdesi arasında (%15.6'ya karşı %15.8) hiçbir fark göstermedi. 0.92'lik bir korelasyon katsayısı elde edilmiş olmasına rağmen varyasyon katsayısı %20.65'ti. IVOS kullanılarak beş serbest merkezde 30 sperm morfoloji kesitinin değerlendirildiği çok merkezli bir çalışmada elde edilen varyasyon büyüklüğü (varyasyon katsayısı) %11.36 ila 23.09 aralığındaydı[42]. Sperm morfolojisini değerlendirmeyi etkileyen majör değişkenlerin çoğu (örnek hazırlığı, hücre boyama ve sınıflandırma sistemi) giderilmiş olmasına rağmen farklı merkezlerde üretilen sonuçlar arasında yine de >%15'lik bir varyasyon elde edildi.

Gözlemlenen sonuçlar deneyimli bir manuel gözlemcinin değerlendirmeleri ile otomatik değerlendirmeler arasında iyi uyuşma olduğunu gösterdi. Sonuçlar aynı zamanda otomatik bir sistem kullanımının tüm varyasyonları gidereceği anlamına gelmediğini de gösterdi. Bu nedenle hala bilgisayar destekli değerlendirmeye yardımcı olan teknoloji uzmanının varyasyonu sınırlamada önemli bir rolü vardır. Teknoloji uzmanının kontrol edebileceği örnek ve kesit işlemenin dışındaki ve sonucu belirgin şekilde etkileyebilecek faktörler odak ve aydınlanmadır.

FERTİLİTE ÖNGÖRÜ DEĞERİ

İn vitro ve *in vivo* insan üretkenlik tanısı için herhangi bir teşhis aracı geliştirmedeki birincil hedef kısır çifte potansiyel gebelikle ilgili gerçekçi bilgi sağlayabilmek için üretkenlik potansiyelini kesin şekilde belirleyebilme yetisidir. Bu nedenle manuel sperm morfoloji değerlendirmelerinin otomatik değerlendirilmelerle değiştirilmesi de sonuçların tespit edilebilir değerlerde olduğunun açık kanıtını gerektirmektedir.

Wang ve ark.[28] insan sperminin fertilizasyon kapasitesinin sonuçlarını tespit etmek için otomatik sperm morfoloji değerlendirmesinin kullanışlılığını belirleyen ilkler arasındadırlar. Zona bağımsız hamster- oosit tahlilinin sonuçlarını tespit etme yetisini analiz etmek için çok değişkenli diskriminant analizler kullanıldı. Seçilen sekiz değişkenlik fertilite kapasitesini, manuel metot kullanıldığında elde edilen %84'e kıyasla %74 doğrulukla tespit etti. Kruger ve ark.[22], Tygerberg Hastanesinden 21 kesiti ve Norfolk'un *in vitro* fertilizasyon (IVF) programından 21 kesiti değerlendirerek IVOS'nin tanısal değerini belirlediler. Her iki üretkenlik grubunun fertilizasyon oranları, <%14 ve >%14 normal formlar, manuel değerlendirmeler için sırasıyla %33.3 (15/45) ve %76.6 (46/60) ve otomatik değerlendirmeler için (Tygerberg kesitleri) sırasıyla %46.8 (30/64) ve %75.6 (31/41) idi. Norfolk kesitlerinde yapılan değerlendirmeler benzer bir sonuç verdi: manuel ve bilgisayar analizleri için sırasıyla %27.4 (14/51) ve %90.0 (127/141) ve %33.9 (18/53) ve %88.4 (123/139).

Sofikitis ve ark.[18], taze sperm ve aynı odaklı taramalı lazer mikroskobu kullanarak, normal form yüzdesi ≥%22 olduğunda 26'da 25 vakada fertilizasyon ortaya çıktığını, ancak bu yüzdenin altında olduğunda oositin sadece 15 vakanın ikisinde döllendiğini buldular. Macleod ve Irvine[26] donuk-saklı donör semeninin *in vivo* üretkenlik ('normal' kadınlar) tespitinde Hamilton Thorne HTM-S 2030 kullanarak hem manuel hem de bilgisayar destekli semen analizlerinin (WHO

1987[43]) değerlerini incelediler. Erime sonrası semen profilleri karşılaştırıldığında, hamileye karşı hamile olmayan, HTM-S tarafından belirlenen hem morfometri hem de hareket karakteristikleri ile ilişkili farklılıklar vardı. Hamileliğin olup olmadığını tespit etmek için çoklu lojistik regresyon kullanıldığında semen kalitesinin geleneksel kriterleri değersizdi (χ^2 = 6.67; p = 0.353). Ancak, morfometrik ve hareket karakteristiklerinin otomatik değerlendirilmesi vakaların %86.9'unun sonuçlarını başarılı bir şekilde tespit etti (χ^2 = 44.3; p = 0.0021). Regresyondaki en önemli değişkenler morfometrik nitelikler (ortalama minör eksen, ortalama majör eksen ve ortalama yer), lateral baş yer değiştirmesinin genişliği ve ortalama yol hızıdır.

Kruger ve ark.[21], otomatik bir sistem kullanarak, ≤10x10^6 hareketli spermatozoası olan hastalarda normal sperm morfolojisi ve oosit sayısının fertilizasyonun tespitinde önemli faktörler olduğunu göstermişlerdir. Otomatik değerlendirmeler tarafından üretilen normal sperm morfolojisi sonuçlarının lojistik regresyon tarafından fertilizasyonla belirgin şekilde korelasyonu (p = 0.0001) olduğu bulundu. Bir vaka dışında diğer tüm sıfır fertilizasyon vakalarının <10^6/ml sperm ve <%10 normal sperm morfolojisi olan grup içinde oldukları bulundu. Üretkenlik alt gruplarının genel fertilizasyon oranları şöyledir: normal formları ≤%4 olan grup için %45.6 (37/81), %5-9 olan grup için %72.5 (87/120), %10-14 olan grup için %82.1 (46/56) ve >%14 olan grup için %85.2 (69/81). Kruger grubu[44] tarafından yürütülen bir başka çalışmada, lojistik regresyon kullanılarak otomatik normal sperm morfolojisi sonuçlarının hem *in vitro* fertilizasyon (p = 0.0419) hem de hamileliğin (p = 0.0210) belirgin bir prediktörü olduğunu bulmuşlardır. %5 üzerinden normal sperm morfolojisi üretkenlik eşik fertilizasyon oranları %39.4 (≤%5) ve %62.9 (>%5) idi, buna karşın hamilelik oranları %37.36 (>%5)'ya kıyasla %15.2 (≤%5) idi. Bu nedenle, katı kriterler kullanılarak sperm morfolojisinin manuel değerlendirmesi tarafından saptanan %5 normal sperm morfolojisi fertilizasyon eşik noktasının önemi bilgisayar destekli değerlendirmeler tarafından onaylanmıştır.

Hobson Sperm Tracker kullanılan bir çalışmada folliküler sıvı eklendikten sonra normal (oval) baş şekli olan bir spermin oranı, akrozomal vaküol gösteren sperm, normal akrozomal büyüklüğü olan sperm (total baş bölgesi %40-70) ve akrozom tepkimesine giren sperm ile fertilizasyon oranı (%FR) arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur[20]. Çoklu regresyon analizleri yukarıdaki dört parametrenin birleşimiyle *in vitro* fertilizasyon oranı değerlerinin tespit hassasiyetinin %79 ve spesifitesinin %93 olduğunu, pozitif prediktivitenin %96 olduğunu ortaya koymuştur. 1997-99 boyunca, bilinen hiçbir sebeple hamile kalamayan 1191 infertil çift hareketlilik, yoğunluk ve morfoloji değerlendirmeleri dahil otomatik ölçümler ve geleneksel semen analizleriyle değerlendirilmiştir[33]. Yıkanmış semenlerin Shorr-boyalı simirleri üzerinde bir SHAMAS (sperm başı otomatik morfometrik analizleri sistemi) analizi uygulanmıştır. Analiz, geleneksel manuel normal morfoloji yüzdesine benzeyeni %C olarak ve insan oositinin zona pellucidasına bağlanan sperminin karakteristiklerini içeren sperm yüzdesini %Z olarak ölçmektedir. Zona pellucidaya bağlanmak fertilizasyon açısından çok önemlidir ve işlem aksiyel simetrisi, dar bir boynu ve büyük akrozomal bölgesi olan spermler için oldukça selektifdir. Üç faktörün-ki %Z'nin en önemli olduğu ve ardından VSL (düz-çizgi hızı) ve kadının yaşının geldiği- çok değişkenli bir Cox regresyon analizinde bağımsız ve belirgin olarak doğal gebelikle ilişkili olduğu bulunmuştur[33].

Bu sistemlerin "gerçek" klinik değerinin belirlenebilmesi için otomatik değerlendirmelerin kullanıldığı daha fazla sayıda büyük prospektif randomize çalışmalar gerekmektedir. Bunlar standart ve kontrollü kesit hazırlığı ve sperm hücresi boyama metotları kullanılarak uygulanmalıdır. Manuel olarak belirlenen normal sperm morfolojisi eşiğinin uygunluğu tekrar değerlendirilmeli ya da yeni eşikler regresyon analizleriyle belirlenmelidir.

SONUÇLAR

Otomatik sistemlerin, sperm morfolojisinin manuel olarak değerlendirmesi sonucu ortaya çıkan öznelliği ve önyargıyı yok etme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Objektif olmalarına rağmen bu sistemlerden ede edilen sonuçların doğruluğu da metodolojik hatalar nedeniyle tehlikeye düşebilir. Sperm hazırlama metotları, sperm hücresi boyama metotları, odak, parametre ayarları ve kullanılan yazılım ve donanım ögeleri gibi değişkenler değerlendirmelerin kesinliğini belirgin şekilde etkileyebilir. Karşılaştırmalı ve güve-

nilir sonuçlar almak için prosedürler ve araçlar standart hale getirilmeli ve kalite kontrol sağlanmalıdır.

En azından IVOS kullanılarak uygulanan çalışma sonuçlarında tespit edilen değerlerin ve kesinliğin en az manuel değerlendirmeler uygulayan deneyimli bir gözlemci tarafından elde edilen sonuçlar ile eşit olduğunu göstermiştir. Sperm morfolojisinin manuel değerlendirmesinde olduğu gibi, <%5 normal sperm morfolojisi olan hasta grubunun belirgin şekilde bastırılmış bir fertilizasyon ve gebelik olasılığının olduğunu göstermiştir. Otomatik sistemlerin gerçek değerini belirlemek için daha fazla klinik çalışmalar gerekmektedir ki üretkenlik sonuçlarıyla ilişkili olarak ölçülen çoklu parametreler, morfometrik ve kinematik vasıtasıyla tespit edici modeller yapılabilsin.

KAYNAKLAR

1. Ombeiet *W,* et al. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. Hum Reprod Update 1995; 1: 543
2. Coetzee K, Kmger TF, Lombard Cj. Predicrive value of normal sperm morphology: a structured literature review. Hum Reprod Update 1998; 4: 73
3. Eliasson R. Standards for investigation of human semen? Andrologia 1971; 3: 49
4. Williams WW, ed. Sterility; the Diagnostic Survey of the Infertile Couple. Springfield, MA: WW Williams, 1964
5. Freund M. Standards for [he rating of human sperm morphology. A co-operative study. Int J Fertil 1996; 11:97
6. David G, et al. Anomalies morphologiques du sper-matozoi'de humain. 1) Propositions pour un systeme de classification, j Gynecol Obstet Biol Reprod 1975; 4(Suppl 1): 17
7. Fredericsson B. Morphologic evaluation of spermatozoa in different laboratories. Andrologia 1979; 11: 57
8. Hofmann N, Freundl G, Florack M. Die Formstorungen der Spermatozoen im Sperma und Zervikalschleim als Spiegel testikularer Erkrankun-gen, Gynakoioge 1985; 18: 189
9. Kruger TF, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986;46:1118
10. Davis RO, Katz D, Computer-aided analysis; technology at a crossroads, Fertil Sreril 1993; 59: 953
11. Coetzee K, Kruger TF, Accuracy and prognostic value of computer-assisted (IVOS) sperm morphology evaluations. Middle East Fertil Soc j 1999; 4: 222
12. Davis RO, et al. Accuracy and precision of the Cell-Form-Human* automated sperm morphometry instrument. Fertil Steril 1992; 58: 763
13. Calamera JC, et al. Development of an objective and manual technique to study the human sperm morphology. Andrologia 1994; 26: 331
14. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 3td edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1992
15. Goulart AR, de Alencar Hausen M, Monreiro-Leal LH. Comparison of three computer methods of sperm head analysis. Fertil Steril 2003; 80: 625
16. Moruzzi JF, et al. Quantification and classification of human spetm morphology by computer-assisted image analysis. Fertil Steril 1988; 50: 142
17. Coetzee K, et al. Comparison of two staining and evaluation methods used lor computerized human sperm morphology evaluations. Andrologia 1997; 29: 133
18. Sofikiris NV, et al. Confocal scanning laser

microscopy of morphometric human sperm parameters: correlation with actosin profiles and fertilizing capacity'. Fertil Steril 1994; 62: 376
19. Kruger TF, et al. Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the spetm morphology analyzer IVOS, Fertil Steril 1995; 63: 134
20. El-Ghobashy AA, West CR. The human sperm head: a key for successful fertilization. J Androl 2003; 24: 232
21. Kruger TF, et al. A prospective study on the predictive value of normal sperm morphology as evaluated by computet (IVOS*). Fertil Stetil 1996; 66: 285
22. Kruger TF, et al. A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. Fertil Steril 1993; 59: 202
23. Lacquet FA, et al. Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology (IVOS*). Arch Androl 1996; 36: 133
24. Menkveld R, et al. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised medtods. Andrologia 1997; 29: 1
25. Davis RO, Gravance CG. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. Fertil Sreril 1993; 59: 412
26. MacLeod IC, Irvine DS. The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. Hum Reprod 1995; 10: 580
27. Wang C, et al. Computer-assisted assessment of human sperm morphology; comparison with visual assessment. Fertil Steril 1991; 55: 983
28. Wang C, et al. Computer-assisted assessment of human sperm motphology: usefulness in predicting fertilizing capacity of human spermatozoa. Fertil Steril 1991; 55: 989
29. Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK Morphometric characteristics of motile spermatozoa in subfertile men with an excess of non-spetm cells in the ejaculate. Hum Reprod 1994; 9: 1701
30. Garret C, Baker HWG. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. Fertil Steril 1995; 63: 1306
31. Coetzee K, Kruger TF. Automated sperm morphology analysis: Quo Vadis. Assist Reprod Rev 1997; 7: 109
32. Menkveld R, et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 5: 586
33. Garrett C, et al. Automated semen analysis: 'zona pel-lucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. Hum Reprod 2003; 18: 1643
34. Ombelet W, et al. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. Hum Reprod 1997; 12:1015
35. ESHRE Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 142
36. Menkveld R, et ah, eds. Atlas of Human Sperm Morphology. Baltimore: Williams ScWilkins, 1991
37. Davis RO, et ah Accuracy and precision of the Cell-Form-Human automated sperm morphometry instrument. Fertil Steril 1992; 58: 763
38. Coetzee *K,* Kruger TF, Lombard CJ, Repeatability and variance analysis on multiple readings performed by a computer semen analyser (1VOS). Andrologla 1999; 3: 165
39. Cooper TG, et al. Internal quality control of semen analysis. Fertil Steril 1992; 58: 172
40. Davis RO, Rothmann SA, Overstreet JW. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. Fertil Steril 1992; 57: 648
41. Kruger TF, et al. Computet assisted sperm analysing system: an analysis of intermachine morphology evaluations and intraslide evaluations using IVOS (Dimension system version *o)*-. Presented at the American Society for Reproductive Medicine Congress, Boston, November, 1996, S223
42. Coetzee K, et al. Assessment of inter- and intralabo-ratory sperm morphology readings using a Hamilton Thome Research IVOS semen analyzer. Fertil Steril 1999:71:80
43. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1987
44. Coetzee K, et al. Clinical value in using an automated
semen morphology analyser (IVOS). Ferril Steril 1999; 71: 222

11

Klinikle Uyumlu Sonuçlar için Sperm Morfoloji Eğitimi ve Kalite Kontrol Programları Temeldir

Daniel R. Franken, Thinus F. Kruger

Çeviri: *İbrahim Dönmez*[*]*, Bülent Akduman**

GİRİŞ

Normal bir insan sperm hücresinin aydınlık-alan mikroskobik konfigürasyonunun ve morfolojik görünüşünün primer bilinme ve anlaşılması, oldukça katı kriterlerin uygulandığı sperm morfolojisi değerlendirme metotlarının temelini oluşturur. Analiz sırasında kullanılan spesifik tekniklerdeki uyuşmazlık gibi çeşitli faktörler sonuçlarda anlaşmazlığa neden olabilir.

Daha fazla hekim eğitimin ve müteakip kalite kontrol ölçümlerinin önemini fark etmeye başladığından beri semen analiz metodolojilerinin standartlaştırılması zorunlu hale gelmiştir. Bu yazar ile hemfikir olan Kvist ve Bjorndahl dünya çapında kabul edilecek ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tanınacak bir semen analiz sonucu elde etmek için gereken tekniklerin standartlaştırılması yönünde önemli bir katkıda bulundular[1]. Teknikler başlıca sperm konsantrasyonunu, sperm hareketliliğini, sperm morfolojisini ve sperm dayanıklılığını değerlendirme üzerine odaklanmıştır.

Birkaç yazar hem *in vitro*[2-5] hem de *in vivo*[6] çalışmalar sırasında insan sperm morfolojisinin değerlendirilmesinin değerini vurgulamıştır. İnsan sperm morfolojisi ve konsantrasyonunun değerlendirilmesi, spesifik endokrin bozuklukların varlığında endokrinolojik ve çevreye ait toksik faktörleri içeren reprodiktif çalışmalar olarak da sunulabilir[7-11]. Bu raporlar bir meta-analizdeki tüm önemli makaleleri özetlemiş olan Coetzee ve ark.[12] tarafından onaylanmıştır.

Androloji teknoloji uzmanlarının eğitimi değişik eğitimsel yaklaşımlar kullanılarak başarılabilir ki bunlardan biri olan bire bir workshop en başarılı eğitim metodudur. Deneyimli bir çalışanla bire bir temelinde direkt iletişim ve girdi eğitilen kişinin sperm morfolojisinin temel kavramlarını anlamasını sağlar. Ancak, bu metodun dezavantajı her oturumda az sayıda kişinin eğitilebilmesidir. Deneyimlerimiz her oturumda bir öğretmenin en fazla on öğrenciyi eğitebildiğini göstermiştir.

İkinci ve aynı zamanda değerli bir eğitim metodu da grup konsensus tekniği olarak adlandırılan tekniktir[15]. Bu metotta, eğitmen (genellikle sperm morfoloji değerlendirmesinde oldukça deneyimli bir birey) eğitim oturumu süresince bir ekrana yansıtılan video görüntüleri ya da bilgisayar kullanır. Bu metodun avantajı tek bir oturumda çok sayıda kişinin eğitilebilmesi gerçeğinde yatar. Bu metodun dezavantajı kitle iletişim stilinde yatar ve grup tartışmaları sırasında birey genellikle kaybolur.

Üçüncü eğitim metodu interaktif bir CD-ROM kullanılmasıdır. Böyle bir interaktif bilgisayar programı yüksek-kalitede numaralı spermatozoa görün-

* Karaelmas Üniversitesi, Üroloji Anabilim Dalı, Zonguldak

tülerinin çeşitlerini içerir. Bu metodun avantajları bireyin kendi istediği zamanda ve yerde eğitimini sağlar, ayrıca birey belli kavramları anlamadığı yerde programın spesifik bir oturumunu tekrar edebilir.

Daha önceki çalışmalarda biz Afrika, Orta Doğu ve Avrupa'da çok sayıda sperm morfolojisi workshopları sunduk. Bu workshopların formatı genellikle uygulayarak (hands-on), bire bir öğretim, beraberinde çeşitli konsensus eğitim oturumları, ayrıca bir CD-ROM programı kullanımını içermektedir (strict 1-2-3®). Grup konsensus eğitim oturumu sırasında katılımcılardan büyük bir ekrana yansıtılan sperm hücrelerinin mikroskobik fotoğraflarını değerlendirmeleri istendi. Eğitilen kişiler yukarıda anlatılan tüm metotlara maruz kaldıkları takdirde eğitimin eğitimsel değerinin artırılacağını hatırlamak önemlidir.

SPERM MORFOLOJİSİ KALİTE KONTROLÜ

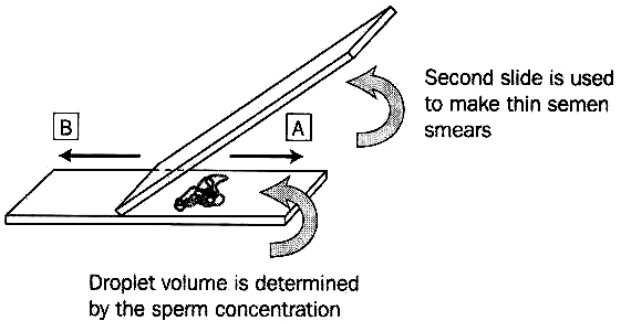
Sperm morfoloji değerlendirmelerinin sadece normal/anormal hücrelerin değerlendirmesinin doğru yapıldığı vakalarda klinik değeri vardır. Vakaların çoğunda yüksek-güçlü büyütme (1000x) altında ışık mikroskobuyla manuel okumalar değerlendirme metodu olmuştur. Sperm morfolojisi okumalarının sonuçlarını etkileyebilecek pek çok faktör tanımlanmıştır. Bu faktörler kesitin kalitesini ve boyama prosedürlerini içerir. Tipik olarak, kötü bir kesit pek çok sperm hücresinin birbiri üzerinde olduğu kalın bir semen tabakasını içerir, bu yüzden hücre başlarının, kuyruklarının ve döküntülerin üst üste gelmesine neden olur.

Bu nedenle her laboratuarda dahili ve harici bir kalite kontrol programı olmalıdır. Örneğin, kalite kontrol örneğinde her bir teknisyenden elde edilen sonuçlar örnek numarasının karşısında bir grafiğe tablo haline getirilip çizilsin. Her bir örnek için sonuçların ortalaması ve standart sapması hesaplansın ve örnek numarasının karşısına çizilsin. Dahili kalite kontrol sisteminin bir parçası olarak her bir androloji teknisyeni, ilgili hekimler için tekrarlanabilir ve güvenilir morfoloji okuması sağlamak için yüksek-kalite sperm kesitleri hazırlayabilmelidir.

Tygerberg'de sperm kesitlerinin hazırlanması için sadece yüksek kalitede değil aynı zamanda sperm morfolojisi için manüel okuma tekniklerinin gerekliliklerini de yerine getiren bir protokol geliştirilmiştir[16]. Bu kesitler WHO tarafından oluşturulan semen simirlerinin hazırlığı tanımlamalarıyla tutarlıdır[17-20].

Kesit hazırlığı

Her bir örnek için, kötü boyanma ihtimaline karşı çift değerlendirme için taze bir örnekten en az iki simir hazırlanmalıdır. Kesite semen uygulanmadan önce kesit önce temizlenmeli, %70 alkolde yıkanmalı ve kurulanmalıdır (Şekil 11.1)[20].



Şekil 11.1: *Seyreltilmemiş sperm morfolojisi simiri hazırlamak için tüyleme metodu*

Optimal kesit kalitesini sağlamak için, kesit hazırlığı sırasında şu standart protokoller uygulanmalıdır: (1) her zaman dondurulmuş, önceden temizlenmiş ve kenarları yuvarlanmış cam kesitler kullanılır; (2) sperm sayıları, simiri hazırlamak için kullanılan sperm damlası büyüklüğünü belirlemede rehber olarak kullanılır (sperm sayısı $>60x10^6$ hücre/ml ise <10-µl bir sperm damlası kullanılır, ancak sperm sayısı $<60x10^6$ hücre/ml ise 10-30-µl bir damla kullanılır; her iki vakada son sperm hücresi sayısı her bir yüksek-güçlü büyütmede 8-12 spermatozoa üretmelidir); (3) semen damlası tipik olarak kesitin ortasına, buzlu uçtan yaklaşık %20 uzaklıkta bir noktaya, tek kullanımlık uçlu bir mikro pipet kullanılarak yerleştirilir (Gilson P100; Lasec Laboratuarları, Cape Town, Güney Afrika). İkinci kesitin eniyle semene 45^o açıyla yavaşça dokunulur, bu semenin birinci kesitin eni boyunca eşit olarak yayılmasını sağlar, ardından ikinci kesit bir yandan bastırılırken diğer yandan önce geriye sonra ileriye doğru birinci kesit boyunca hareket ettirilir.

TEKNİSYENİN SPERM MORFOLOJİSİNİ OKUMA YETENEĞİNİ GÖZLEME

Tygerberg yaklaşımı

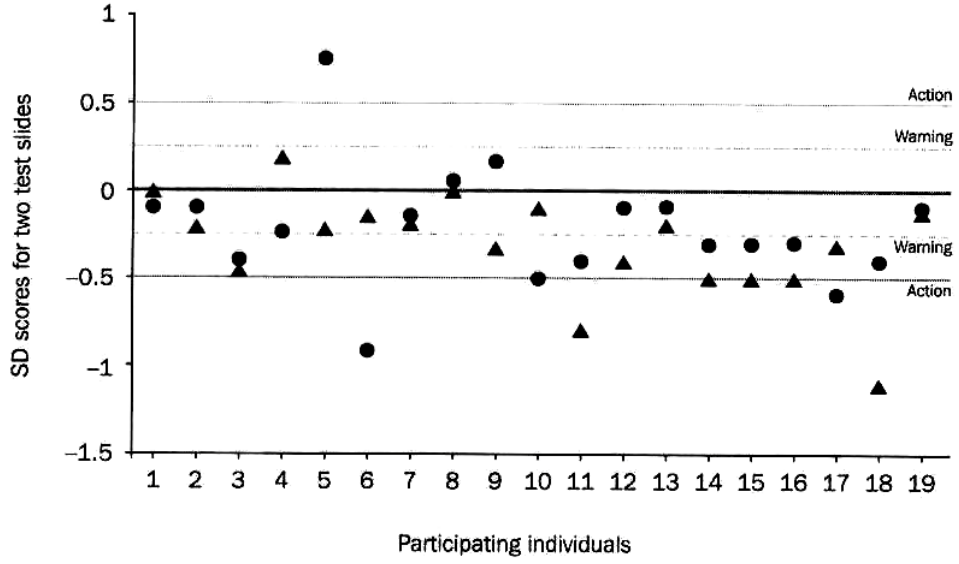
Tipik bir Tygerberg sperm morfolojisi eğitim oturumu, uygulama, bire bir birey eğitimini (deneyimli çalışana karşı deneyimsiz çalışan) ilkelerine dayanan çoklu bir yaklaşım metodunu içermektedir. Bu eğitim metodunun eğitimin başlangıç aşamaları sırasında zorunlu olduğuna inanmaktayız. Ayrıca, konsensus eğitimi ve CD-ROM interaktif programları da kullanmaktayız. Deneyimlerimizde, eğitim oturumundan sonra, katılımcılar sürekli kalite kontrol (CQC) programına kaydedildiler. Üç ayda bir katılımcılara normo-, terato- ya da şiddetli teratozoospermik örneklerden önceden boyanmış sperm kesitleri gönderildi. Katılımcılar bu kesitlerde mevcut olan normal hücre yüzdesini kaydederek sonuçları Tygerberg Hastanesindeki referans laboratuara gönderdiler. Referans laboratuara göre "doğru" sonuçlar, ör., her bir kesitte mevcut olan normal form yüzdesi, katılan laboratuarlara sonradan bildirildi[13,14].

Eğitilen kişilerin standart değerlendirmesi için kullanılan morfolojik kesitlerin farklı sperm donörlerinden alınan rastgele örnekler olması nedeniyle morfolojik seviyeye bağlı olmayan bir indeks için standartlaştırma gerekmektedir. Referans laboratuarın morfoloji okumasını altın standart sayarsak indeks aşağıdaki standart istatistiksel skora göre hesaplanır:

Standart sapma (SD) skoru: eğitilen kişinin skoru – eğitilen kişilere gönderilen SD test kesitleriyle bölünen referans laboratuar skoru[14]

Beklendiği gibi, standart sapma daha düşük morfoloji seviyelerinde azalır, örneğin, <%4 normal formlar. SD skoru, eğitilen kişinin ölçümlerinin spesifik bir kesit için altın standarttan kaç SD ünitesi sayısı farklı olduğunu yansıtır. Her bir eğitilen kişi kendi SD skorunun altın skorla uyum seviyesine göre değerlendirilebilir. Kötü okumaları değerlendirmek için iki SD skor seviyesi seçilmiştir, bu amaçla biz ±0.5 SD ve ±0.2 SD değerlerini seçtik. Eğitimden ve müteakip ilişkilerden elde edilen bireysel SD skorları sınırları da gösteren bir grafikte zamanın karşısına çizilebilir.

Tygerberg Hastanesinde devam eden bir çalışma 40 aylık bir periyotta teknisyenlerin morfoloji okuma yetileri üzerinde üç ayda bir yapılan gözlem ve hatırlatıcı kursların değerlerini kaydetmeyi amaçlamaktadır. İlk eğitim oturumundan sonra İsviçre, Malezya ve Singapur'dan 13 farklı androloji laboratuarından 19 birey bir sperm morfolojisi kalite kontrol programına kaydedildi. Her bir birey tarafından rapor edilen test kesitlerinin (iki kesit seti) ortalama değerleri Şekil 11.2'de gösterilmiştir. ±0.2 SD skoru dışında kalan kayırları uyarı (Şekil 11.2) ve ±0.5 SD skoru dışında kalan sonuçları bireyin kendi sperm morfolojisi okuma yeteneği konusunda kaygılanması için bir gösterge olarak kabul etti.



Şekil 11.2: *1 ve 2. Test kesitleri için 13 androloji laboratuarından 19 birey tarafından rapor edilen Ortalama standart sapma (SD) skorları*

19 katılımcının beşi (Şekil 11.2 1, 7, 8, 9 ve 19 numaralar) periyot boyunca yıllık hatırlatıcı kurslara katıldılar. 13 ve 19 numaralı katılımcılar hiçbir hatırlatıcı eğitime katılmadılar ancak bire bir eğitimden sonra gereken okuma yeteneklerini korudular. Herhangi bir laboratuarda tutarlı sonuçlar elde etmek için yeterli teknisyen eğitimi çok önemlidir. Katı kriterler kullanıldığında bile[13,14], laboratuar içi varyasyonlar muhtemelen (1) farklı semen ve simir hazırlama tekniklerini, (2) yorumlama farklılıklarını ve (3) teknisyenin deneyimini içeren çeşitli faktörlerin sonucudur[15].

Spesifik kriterleri kullanarak eğitilen kişileri rapor ettikleri sonuçlara göre sınıflandırabildik.

Okuma yeteneklerinin sınıflandırılması

Kötü okuma yeteneği

Eğer 40 aylık periyot içinde kaydedilen okumaların %50'si hata sınırlarındaysa, örneğin, ±0.5 SD skoru, kötü okuma standardı kabul edilmiştir. Her bir bireyin genel doğruluğunun kullanıldığı Şekil 11.2'de yansıtılan sonuçlar beş (%26) katılımcının (5, 6, 11, 17, 18) değerlendirme periyodunda kötü okuma yeteneği olduğunu göstermektedir.

Sınırda okuma yeteneği

Eğer 40 aylık periyot içinde kaydedilen okumaların %51-59'u ±0.5 SD skoru içindeyse sınırda okuma yeteneği kabul edilmiştir.

İyi okuma yeteneği

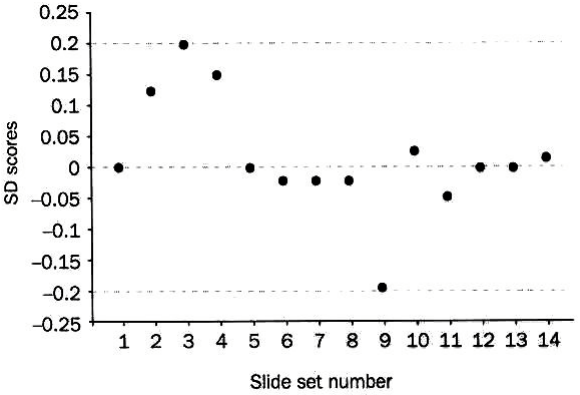
Eğer 40 aylık periyot içinde kaydedilen okumaların %60-69'u hata sınırları içine düşerse, ör., ±0.5 SD skoru, iyi okuma standardı kabul edilmiştir. Beş (%26) bireyin (9, 12, 14, 15, 16) iyi okuma yeteneği vardı.

Mükemmel okuma yeteneği

Eğer 40 aylık periyot içinde kaydedilen okumaların ≥%70'i ±0.5 SD skoru içindeyse mükemmel okuma yeteneği kabul edilmiştir. Şekil 11.2'deki sonuçlar, katılan bireylerin (1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 13, 19) dokuzunun (%47) mükemmel okuma yeteneğini devam ettirdiklerini göstermektedir.

Sonuçlarımız devamlı gözlemin programın bir parçası olması şartıyla harici bir kalite kontrol programının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini açıkça göstermektedir. Genel olarak, %73'ün iyi ya da mükemmel olarak sınıflandırılan sperm morfolojisi okuma yeteneğini korumaları nedeniyle çalışma grubunun genel okuma yeteneği bizi tatmin etti. İlk eğitim oturumu haricinde, morfoloji okumasının teknik olarak devamının kesinlikle yıllık hatırlatıcı kurslara bağlı olduğuna inanmaktayız. Hatırlatıcı kurslara rastgele katılan 1, 7, 8, 9 ve 19 numaralı beş katılımcı gerekli okuma yeteneklerini koruyabildiler. Bireyler sürekli olarak ±0.2 SD skoru hata sınırları içinde okuma yetenekleri gösterdiler (Şekil 11.3). Bu çalışma aynı zamanda dünya çapında bir sperm morfolojisi kalite kontrol programı başlatma fizibilitesini de vurgulamaktadır.

Son olarak, çalışma sırasında elde edilen önemli bir bulgu da morfoloji okuma yeteneğinin korunmasında yıllık hatırlatıcı kursların oynadığı belirgin roldür. Burada, ilk kez, hatırlatıcı kurslara katılan teknisyenlerin morfoloji okuma yeteneğini uzun süre boyunca koruyabildiklerini gösterdik. Genel olarak, tüm katılımcılar (hatırlatıcı kurslara katılanlar hariç) ilk eğitimden yaklaşık 6-9 ay sonra okumada düşüş gösterdiler. Bunun herhangi bir androloji ünitesinde oluşabilecek bir eğilim olduğunu ve laboratuar yöneticilerinin bu fenomenden haberdar olmaları gerektiğini düşünüyoruz. Önceki çalışmalar[21-23] karşılaştırılabilir laboratuar içi sonuçlarını sağlamanın tek yolunun çok merkezli ustalık test programından geçtiği sonucuna varmıştır[24]. Şu anki çalışmaya benzer şekilde, Keel ve ark.[21] böyle bir ustalık test sisteminin harici bir laboratuar içi kalite programını kapsaması gerektiğini önermişlerdir. Bu program sırasında, katılan bireyler/laboratuarlar tarafından taklit edilmiş özdeş hasta numuneleri test edilmektedir.



Şekil 11.3: *Mükemmel sperm morfolojisi okuma yeteneği olan bir bireyin standart sapma (SD) skorlar*

KAYNAKLAR

1. Kvist U, Bjorndahl L. Editorial In Kvist U, Bjorndahl L, eds. Manual on Basic Semen Analysis. Oxford-. Oxford University Press, 2002: v
2. Kruger TR et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986;46:1118
3. Kruger TF, et al. Predictive value of abnormal spetm morphology in in vitro fertilization. Fertil Stetii 1988;49:111
4. Enginsu ME, et al. Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. Hum-Reprodl991;6:854
5. Ombelet W, et al. Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study. Hum Reprod 1994;9:1479
6. Eggert-Kruse W, et al. Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm-mucus interaction in vivo and in vitro. Fertil Sreril 1995; 63: 612
7. Carlsen E, et al. Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. Br J Med 1992; 303: 609
8. Auger J, et al. Decline in semen quality in fertile men in Paris during the past 20 years. N Engl J Med 1995; 332:281
9. Irvine SE, et al. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. Br J Med 1996; 312: 467
10. Auger J, Jouannet P. Evidence for regional differences of semen quality among French fertile men. Hum Reprod 1997; 12: 740
11. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. Environ Health Perspect 1997; 108: 961
12. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. Hum Reptod Update 1998; 4: 73
13. Franken DR, Barendson R, Kruger TF. A continuous quality control (CQC) program for srrict sperm morphology. Fertil Steril 2000; 74: 721
14. Franken DR, et al. The development of a continuous quality control (CQS) programme for strict sperm morphology among sub-Saharan African laboratories. Hum Reprod 2000; 15:667
15. 15- Eustache F, Auger J. Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods. Hum Reprod 2003; 18; 1018
16. Menkveld R> et al. Effect of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerized method. Andrologia 1997; 29: 1
17. 17- Menkveld R, et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 5: 586
18. Menkveld R, et al., eds. Atlas of Human Sperm Morphology. Baltimore; Williams & Wilkins, 1991
19. Menkveld R, Kruger TF. Evaluation of sperm morphology by light microscopy. In Acosta AA, Kruger TF, eds. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. London: Patthenon Publishing, 1996: 189
20. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999: 1
21. Keel BA, et al. Results of the American Association of Bio-analysts national proficiency testing programme in andrology. Hum Reprod 2000; 15: 680
22. Cooper TG, Atkinson AD, Nieschlag E. Experience with external quality control in spermatology. Hum Reprod 1999; 14: 765
23. Dunphy BC, et al. Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. J Androl 1989; 10: 378
24. Neuwinger J, Behre, HM, Nieschlag E. External quality conttol: the andrology laboratory: an experimental mulricenter trial. Fertil Steril 1990; 54: 308

12

Fertilizasyonu Öngörmede Akrozom İndeksinin Prediktif Önemi

Roelof Mekveld

Çeviri: *Ahmet Bostancı*[*]

GİRİŞ

Kruger[2, 3] ve Van Zyl[4] in vitro fertilizasyon ve in vivo gebeliklerde Tygerberg kriterlerine göre sperm morfolojisi değerlendirmesinin klinik faydalarını göstermişlerdir;ve bu bir çok yayındada konfirme edilmiştir[5]. Ancak, hatta P paterni olan veya kötü prognozlu denen(normal morfoloji %4 den az olan)erkeklerde invitro fertilizasyon veya ara sıra in vivo gebelikler oluşabilmektedir[3, 5]. O yüzden daha sensitif prediktörler özelliklede in vitro fertilizasyon oranlarını öngörmede, üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bunlardan bazıları sperm biyokimyasal testleri sperm kromatin dispersiyon testi[6], sperm kromatin yapısal değerlendirme[7] ve de ubiquitinli sperm analizleri ya da semen değişkenlerinin kombine edildiği testlerdir. Bunlarda yıkama sonrası ileri hareketli sperm sayıları[9] veya daha spesifik morfoloji parametreleri kullanan sperm deformite indeksi[10] veya Spermak boyamada gözlenen spontan akrosom reaksiyonu yer alır[11].

Bu bağlamda, Menkveld ve ark. in vitro fertilizasyonu öngörmede ek bir yöntem olarak Akrozom İndex (Aİ) önermişlerdir[12]. Aİ'nin strict kriterlerdeki sperm morfolojisi gibi İVF gebeliklerinde %50'nin üzerinde prediktif bir önemi vardır ve Aİ, P paternli grupta özellkle faydalıdır. Aİ normal sperm morfolojisi ile karşılaştırıldığında extra bir katkısı vardır o yüzden İVF sonuçlarını öngörmede bağımsız bir parametre olarak kullanılabilir[13]. Aİ'nin bu prognostik etkisi sadece birkaç yayında[14-18] tartışılmıştır ve de kısaca burada acrosomun fertilitede özellikle de spermin zona pellusidaya bağlanmadaki fonksiyonel rolü vurgulanmış ve bunun İCSİ (İntrasitoplazmik sperm inejeksiyonu) işlemindeki faydası anlatılmaya çalışılmıştır.

FERTİLİTE YOLUNDA AKROSOMUN ÖNEMİ

Akrosom spermatogenez sırasında Golgi aparatı tarafından oluşturulan spermin baş kısmında yerleşik salgı yapan granül diye tarif edilebilen spermin nükleusu ile ilişkili akrosom iç akrosom ve devamında dış akrosom membranından oluşan bir yapıdır. İki mebranı arsında akrosomal matrix vardır. Akrozomun tamamı ve spermatozonun geri kalan kısmı plasma membranı ile örtülüdür. Akrozomda çeşitli enzimler vardır. Örneğin (pro)acrosin bu da zona pellucidanın penetrasyonunda ve spermin bağlanmasında hayati rol oynar.

[*] T. C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Doğum Kliniği, Ankara.

Spermatozonun zona pellucida ile temasından sonra akrosomda akrozom reaksiyonu gelişir bu dış akrozom ile plasma membranlarının birleşmesi ile oluşan exositotik bir olaydır. Bu esnada hyaluronidaz ve proakrosin gibi enzimler salınır ve bu spermin bağlanıp zona pellucidayı penetre etmesindeki en önemli basmaktır[20,21]. Bu durum şimdi daha iyi anlaşılıyorki bu reaksiyonun oluşabilmesi için normal sperm morfolojisi daha ziyadede normal akrozom morfolojisi çok gerekli bir durumdur[22, 23]. Zona pellucidada normal ölçüde akrozomun yer alabilmesi için çok güçlü bir seleksiyon yapılmaktadır bu durum Garrett ve Baker tarafından çok iyi bir şekilde gösterilmiştir[24].

Akrozom reaksiyonu olabilmesi için akrozomun büyüklüğü de önemlidir. Büyük akrozomlu spermler de canlı akrozom reaksiyonlu spermler fazla olur iken küçük akrozomlularda ölü sperm sayısı daha fazla olmaktadır[25]. İntact akrozomları olan ve spermatozoa konsantrasyonları az olan semen örneklerinde zona pellucidaya tutunma olmayacağından ve akrozom reaksiyonu gelişmeyeceğinden bunlarda total fertilizasyon yetmezliği gelişir[11]. Fertilizasyon oluşmamasında zona pellucidaya bağlı spermatozoaların akrozom reaksiyonuna gidememeleri önemli rol oynar[26,27]. Benoff[28]a göre ivitro koşullarda sperm akrozom reaksiyonu oluşması için morfolojik olarak normal spermatozoa olması şarttır ve İVF başarısızlıklarının %50'sinin sebebi akrozom yapısının ve fonksiyonunun bozukluğuna bağlıdır.

AKROZOM MORFOLOJİSİNİN MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Öncelikle bilinmeli ki, insan sperm akrozomu direk mikroskopla görünmeyecek kadar küçüktür, elektron mikroskopla görülebilir[29]. Ancak ışık mikroskopu ile nasıl görüleceği ile ilgili bilgiler gelmeye başlamıştır[1, 12].

1000 ve 1250 büyütmelerle Papanikola boyası ile elde edilen smearlerde akrozomun büyüklüğü şekli boyanma karekteristiği ve aynı zamanda birlikte rütin sperm morfolojik değerlendirmesi yapılabilir[1,12]. Sınıflamada sperm morfolojik sınıflaması gibi aynı prensipler kullanılabilir, ancak bazen sperm başının post akrozomal kısımları anormal olabilir fakat boyun/ midpiece ve kuyruk veya da sitoplazma'sı bulunabilir[1]. Spermatozon normal diye sınıflanmışsa akrozomunda daima normal olması gerekir. Bu demektir ki, akrozom indeksinin sperm indeksinden fazla olması gerekir. Akrozom değerlendirmesi ile birlikte rutin morfolojik değerlendirme yapılıyorsa iki tane laboratuar sayıcısı gerekir. Birinde morfoloji diğerinde akrozom skorları yazılır veya tamamen akrozomal skor defektleri birlikte değerlendirilir[1,12,30].

Işık mikroskopunda görülen akrozomal defektler spesifik veya non spesifik değişiklikler olarak değerlendirilir. Spesifik anomaliler bunlar genelde büyüklükle ilgilidir ve sebebi genetiktir[31, 32]. Bunlar globozospermi[19] ve mini akrozom defektidir[33]. Genetik sperm defektleri akrozomla sınırlı değildir spermin her tarafını etkileyebilir künt ve kısa kuyruk gibi ışık mikroskopunda görülen anomalilerdir[34].

Bazen de akrozomlar çok büyük olabilir, bu da fazla sayıda spontan akrozomal reaksiyonlara sebep olur[25] ve de İVF başarılarını düşürürler[2,12]. Boyanma defektleri akrozom membranındaki anomalilere bağlıdır, bu da daha sonra proacrosinin sızmasına yol açar[35]. Jeulin ve ark[29] akrozom boyanma defekti olan spermlerdeki İVF başarısızlığı sadece anormal akrozom olmasından değil, akrozom anomalisinin spermin nükleer immaturitesi ile ilşkili olmasından kaynaklanmaktadır. Sperm DNA anomalileri spermin kendilerinin reaktif oksijen örnekleri üretmesine bağlı olabilir fakat çoğunlukla sperm örneklerinde lökosit bulunmasına bağlıdır[36].

YARDIMLA ÜREMEDE AKROZOM İNDEKSİNİN ÖNEMİ

Kruger 1986 da[2] strict kriterlere bağlı morfolojinin İVF sonuçlarında güçlü bir prognostik faktör olduğunu eğer sperm sayısı ve motilitesi iyi ise, göstermiştir. Motilitesi %14'ün altındaki grupta %15 morfolojik olarak normal olanlarda fertilizasyon oranı %37, fakat hiç gebelik oluşmamış, motilitesi %14'den büyük olan grupta fertilizasyon %82 olmuştur. 1988'de de Kruger[3] eğer normal sperm morfolojisi %4'den az ise fertilizasyon oranında dramatik düşme (%7.6) olduğunu ve normal morfoloji %4-14 arasında olan grupta bu oranın %63.9 olduğunu bildirmiştir.

Akrozomların fertilizasyondaki rolleri ile ilgili yapılan çalışmalarda[30] %4 den küçük olan grupta iki ayrı akrozom morfolojisi görülmüştür. İyi fertilizasyonu olan birkaç erkekte hafif ve orta

derecede uzamış spermler gözlenmiş ancak bunların akrozomları normal bulunmuştur. Vakalardan birisinde dört yumurtanın dördü de döllenmiştir. Bu vakada normal morfolojili sperm %2 iken, spermlerin %17'si akrozomal olarak normal idi. Fertilizasyon olmayan 6 yumurtalık bir vakada, bütün spermlerde küçük ve veya anormal akrozomlar gözlenmiştir. Bu vakada normal morfoloji %1 iken normal akrozom oranı %4'müş.

Menkveld'in halen devam eden 23 erkekli bir çalışmasında[35] akrozom morfolojisi örneğin normal küçük boyama defektli amorf diye sınıflandırılır ve bunun normal sperme oranı ile akrozom indeksi oluşturulursa İndexi %15'den küçük olanlarda hiç gebelik elde edilmemiştir. Normal morfoloji %5'den küçük akrozom indeksi %15'den büyük olduğu durumlarda fertilizasyon oranları %50'den fazla olmuştur. Aİ ile fertilizasyon arasındaki ilşkiyi gösteren çalışmalarda Aİ prediktif değeri anlamlı olmuştur[35] .

ROC(receiver operating characteristic) eğrisi ile 23 erkeğin İVF sonuçları analiz edildiğinde[37] %50'den fazla fertilizasyon oranlarını öngörmede, %10'dan büyük bir cut off değeri elde edilmiştir. Bu sonuçlar 33 erkeğin takip edildiği başka bir çalışmadada konfirme edilmiştir[12]. Morfoloji ve fertilizasyon arasındaki korelasyon(r:0. 7953;p<0. 0001)la kıyaslandığında Aİ ve fertilizasyon arasında daha yüksek bir korelasyon (r:0. 8631;p<0. 0001) bulunmuştur. Bu demektir ki Aİ sperm morfolojisine göre özellikle morfolojisi %5'den az olan sperm gruplarında fertilizasyon potansiyelini değerlendirmede daha sensitiftir. Bu normal akrozomlu fakat Tygerberg kriterlerine göre anormal yada elonge spermleri olanlar zona pellucidaya[22, 23] bağlanma ve acrozom reaksiyonu (38)oluşturma konusunda, Aİ düşük olanlara göre (<%10 normal akrozom) daha iyidirler.

1998 de Menkveld[39] normal morfolojili ve Aİ prediktif rolünü 1992'de WHO'nun tanımladığı teratozoospermik index (TZI) ile karşılaştırdığı 110 hastalık bir çalışmada[40]. %9'dan daha büyük olan Aİ'lilerde İVF'in %50'den fazla başarısını öngörmede, sperm morfolojisi %5'den büyük olanlara göre daha iyi morfolojininde TZI sı <1. 46 olanlardan daha iyi prediktif değeri olduğu ROC analizlerinde gösterilmiştir ve çizginin altındaki alanlar sırasıyla 0. 920, 0. 739, 0. 634 şeklindedir. Menkveld[41] cut off belirlemeye çalıştığı fertil ve subfertil gruplardaki çalışmada Aİ cut off değeri normal acrozomun %8'i olarak belirlemiştir.

Bu sonuçlar akrozom morfolojisi ile ilgili daha önceki çalışmalarla uyumludur[11,23,28,29]. Liu ve Baker(23)WHO morfoloji kriterine göre %30'dan küçük olan gruplarda akrozom statüsü önemli bir prognostik faktördür. Chan ve ark[11] akrozomları intact %40 ın altında spermatozoa oranı olanlarda %31 oranında Total Fertilization Failure (TFF) bildirmişlerdir. Benoff ve ark[28] akrozom morfolojisi kötü olanlarda inseminasyon sırasındaki sperm konsantrasyonlarını en az akrozomu normal 25000/ml'ye çıkardıklarında başarı oranlarının akrozom morfolojisi iyi olanlarla aynı olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmalar gösteriyor ki, in vitro fertilizasyonun olması için minumum oranlarda veya minumum sayıda normal akrozomlu sperm gereklidir ve altını çizmektedirler ki, fertilizasyon yolunda akrozomların önemini vurgulamaktadır[21].

Tek başına Aİ'nin rolü hakkında çok az yayın yapılmıştır. Söderlund ve Lundin[14] yıkama sonrası sperm morfolojileri <%5, motil spermatozonları >1x10^6 /ml olanlarda bölünmüş kardeş oositleri ile yapılan İVF ve İCSİ de fertilizasyonları incelemişler. ROC eğrisi analizi ile >%50'den İVF oranlarında, Aİ için %7'lik bir cut off değeri bulmuşlardır[81]. Hasta iki gruba bölünmüş:A grubunda Aİ <%7 olan 42 hasta ve Grup B de Aİ >%7 olan 39 hasta alınmış. A grubunda İVF oranı %43.5 B grubunda ise anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur %71. 9(p:0. 0001). Bir çalışmada morfolojisi %5'den küçük Aİ %7'den büyük olanlarda ortalama fertilizasyon oranları %70, Aİ %7'den küçük olanlarda ise ortalama fertilizasyon oranları ise %40 bulunmuştur. Rhemrev ve ark[15] Aİ'i %5'den küçük olan ve TRAP'ı 1. 14 mmol/L olan 87 kişilik bir grupta hiç gebelik elde edememiştir.

İNTRASİTOPLAZMİK SPERM İNJEKSİYONU İÇİN AKROZOM İNDEKSİ VE HASTA SEÇİMİ

İCSİ'nin gündeme gelmesi ile[42] ciddi erkek infertilitesinde yeni ufuklar açılmıştır ve morfoloji bozukluklarında, motilite bozukluklarında sperm direkt olarak oosite yerleştirildiği için bu fonksiyon bozukluğu halledilmiş olur.

İCSİ birçok merkezde standart İVF'le kıyaslanırsa invaziv kabul edilir ve daha pahalı bir yöntemdir ve bu yöntemde genetik olrak defektli spermin enjekte edilmesinin olumsuz etkileri ile ilgili kaygılar devam etmektedir[43]. Bu gebelikler konjenital anomalili veya erken doğum yada düşükle sonuçlanabilir[44,45]. O yüzden İCSİ fertilizasyon oranları düşük olan veya TFF olan hastalarda tercih edilmelidir. Ancak Greconun son bir çalışmasında[46] DNA'sı parçalanmış fragmente spermleri olan hastalarda bile İCSİnin pozitif etkisini görmüş bunlarda implantasyon ve gebelik düşük bile olsa fertilizasyon oranları normaldir[47] ve bu hastalar testiküler spermatozo ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir[47]. Testiküler sperma-tozoolarda DNA fragmantasyonlarının daha az olduğu görülmüştür ve bu spermlerle %44.4 gebelik ve %20.7 implantasyon oranları elde edilir. Düşük DNA hasarlı sperm elde etmek için cervikal mukus kullanılabilir(Bianchi 48). Servikal mukus bariyerini geçen spermlerde DNA protaminasyonu yüksektir ve bunlarda endojen zedelenme translasyon belirtisi görülmez.

Ciddi oligozoospermi[49], cryptozoospermi, globozoospermi[50] veya obstrüktif azoospermi vakalarında İCSİ yöntemini seçmek mantıklıdır ancak sperm hazırladıktan sonra yeterli sayıda motil sperm varsa İCSİ mi yada İVF mi yapılacağı problem olabilir[15]. Bir önceki İVF le ilgili bölümde Aİ cut off değerini belirlemek için %50'nin üstünde oosit fertilizasyon cut off değeri kullanılmıştır[12,14]. Bununla beraber İVF fertilizasyon oranında %50'lik cut off değeri İCSİ ya da İVF'e karar vermek için çok yüksek bulunmuştur. İCSİ için daha uygun olan fertilizasyon cutoff değeri <%37'dir.

Bu konu ile ilgili tek data Menkveldin 1999'daki yayınıdır[51]. İCSİ de hasta seçiminde morfolojinin yanında Aİ'in kullanıldığı prospektif bir çalışma başlatmışlardır. Bu çalışmada 134 semen örneği İVF için oosit toplandığı gün körlemesine incelenmiştir. Sperm morfolojisi ve sperm akrozomal morfolojisi ışık mikroskop kullanılarak gözlenmiş ve akrozom indeksi ölçülmüştür. ROC eğri analizinde İVF oranı <%37 (2SD normalin altında), normal sperm morfoloji oranı <%3 ve de akrozom indeksi <%7 olarak ayarlanmıştır. Fertilizasyon başarı oranları cutoff değeri <%30-<%25'e düşürülürse ROZ eğrisinde Aİ <%6'nın altına çekilir. Ancak fertilizasyon başarı oranı <%20'nin altında olursa Aİ cut off değeri yeniden %7'ye yükselir. Bütün durumlarda morfoloji cut off değeri <%3 alınmıştır. Aİ cut off değeri <%6 olanlarda fertilizasyon oranı %22. 4 Aİ cut off değeri >%7 olanlarda ise %74 bulunmuştur. Yukarıdaki sonuçlara bakarak Aİ cut off değeri <%6 olarak kabul edilebilir ve bu İCSİ için hasta seçiminde yardımcı olur Özellikle de morfolojide P patern göstern gruplar için(<%4).

Söderlandın çalışmasında[14] İCSİ yapılan ve Aİ'si <%7 olan ile Aİ'si >%7 olanlar arasında fertilizasyon başarılarında fark bulunmamıştır. (oranlar %635.8 ve %63.5). Bu çalışmada morfolojisi %5'in altında ve Aİ'i >%7 olanlarda ortalama fertilizasyon oranı %70, Aİ'sı <%7 olanlarda ise fertilizasyon oranı %40 bulunmuştur. Söderlund ve Lundin İVF ve İCSİ için Aİ, morfoloji ve sperm sayısı birlikte tek başına temel sperm parametreleri ile kıyaslandığında çok iyi prediktif değere sahiptir[14]. Rhemrev Aİ'i <%5 olanlar TFF'i engellemek için İCSİ'den fayda görebileceklerini ve/veya morfolojisi %2'nin altında olanlar İCSİ ye yönlendirilebilir.

SONUÇLAR

Aİ yardımla üreme tekniklerinde karar verirken önemli bir rol oynar. %50'den fazla İVF başarısı elde edebilmek için Aİ cutoff değeri normal akrozomlularda >%16'dan >%9'a düşürülmüştür ve fertil ve subfertil arasındaki ayırım için kriter >%8 olarak kabul edilmiştir. Önemli olan çiftlere İCSİ ye gidip gitmeyeceklerinin kararını vermektir. O yüzden Menkveld[51], Söderlund ve Lundin[14], Rhemrev[15] gibi ötörler <%6'yı kriter olarak belirlemişlerdir. Söderlund ve Rhemrev herikisi de Aİ'le beraber total progresiv motil sperm sayısının birlikte İCSİ ye karar vermek için çok güçlü parametreler olduğunu vurgulamışlardır[14, 15].

KAYNAKLAR

1. Menkveld R, et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 5: 586
2. Kruger TF, et al. Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Ferril Steril 1986; 46: 1118
3. Kruger TF, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 122
4. Van Zyl JA, Kotze TJvW, Menkveld R. Predictive value of spermatozoa morphology in natural fertilization, In Acosta AA, et al., eds. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Baltimore: Williams &: Wilkins, 1990:319
5. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. Hum Reprod Update 1998; 4: 73
6. Ferna"ndez JL, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J Androl 2003; 24: 59
7. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques, j Androl 2002; 23: 25
8. Sutovsky P, Terada Y, Schatten G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. Hum Reprod 2001; 16: 250
9. Rhemrev JPT, et al. The postwash total progressive motile sperm cell count is a reliable predictor of total fertilization failure during in vitro fertilization treatment. Fertil Steril 2001; 76: 884
10. Aziz N, et al. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. Fertil Steril 1996; 66: 1000
11. Chan PJ, et al. Spermac stain analysis of human sperm acrosomes. Fertil Steril 1999; 72: 124
12. Menkveld R, et al. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology {strict criteria), and fertilization in vitro. Fertil Steril 1996; 65: 637
13. Jeyendran RS, Zaneveld LJD. Controversies in the development and validation of new sperm assays. Fertil Steril 1993; 59: 726
14. Sb'derlund B, Lundin K. Acrosome index is not an absolute predictor of the outcome following conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. J. Assist Reprod Genet 2001; 18: 483
15. Rhemrev JPT, et al. The acrosome index, radical buffer capacity and number of isolated progressively motile spermatozoa predict IVF results. Hum Reprod 2001; 16: 1885
16. Kruger TF, Menkveld R. Acrosome reaction, acrosin levels, and sperm morphology in assisted reproduction. Assist Reprod Rev 1996; 6: 27
17. Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment - historical perspectives and current opinions. J Andro!2001;22: 192
18. Menkveld R. The use of the acrosome index in assisted reproduction. In Kruger TF, Franken DR, eds. Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation. London: Taylor & Francis, 2004: 35
19. Schill W-B. Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. Hum Reprod 1991; 6: 969
20. Mortimer D. Practical Laboratory Andrology. Oxford: Oxford University Press, 1994.
21. Wassarman PM. Fertilization in mammals. Sci Am 1988; 256: 52
22. Menkveld R, et al. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. Mol Reprod Develop 1991; 30: 346
23. Liu DY, Baker HWG. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. J Reprod Fertil 1992; 94: 71
24. Garrett G, Baker WHG. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. Fertil Steril 1995; 63:1306
25. Menkveld R, et al. Relationship between human sperm acrosomal morphology and acrosomal function. J Assist Reprod Genet 2003; 20: 432
26. Bastiaan HS, et al. Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm—zona pellucida binding, and in vitro fertilization. Fertil Stetil 2003; 79: 49
27. Liu DY, Baker HWG. Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. Fertil Steril 2003; 79: 74
28. Benoff S, et al. Numerical dose-compensated in vitro fertilization inseminations yield high fertilization and pregnancy rates. Fertil Steril 1999; 71: 1019
29. Jeulin C, et al. Sperm factors related to failure of human in-vitro fertilization. J Reprod Fertil 1986; 76: 735
30. Menkveld R, Kruger TF. Evaluation of sperm morphology by light microscopy. In Acosta AA, Kruger TF, eds. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Carnforth: Parthenon Publishing, 1996: 89
31. Hofmann N, Haider SG. Neue Ergebnisse morphologisher diagnostik der Spermatogenesestorungen. Gynakologe 1985; 18: 70
32. Baccetti B, et al. Genetic sperm defects and consanguinity. Hum Reprod 2001; 16: 1365
33. Baccetti B, et al. A 'miniacrosome' sperm defect causing infertility in two brothers. JAndrol 1991; 12: 104
34. Favero R, et al. Embryo development, pregancy and twin delivery after microinjection of 'stump' spermatozoa. Andrologia 1999; 31: 335
35. Menkveld R, et al. Relationships between sperm aerosomal status, acrosin activity, morphology (strict

Tygerberg criteria) and fertilization in vitro. Hum Reprod 1994; 9 (Suppl 4): 99

36. Henkel R, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm function in non-leukocytospermic patients. Fertil Steril 2005; 83:635
37. Menkveld R, et al. Acrosoma! morphology as an additional new criterion for male fertility diagnosis: relationship with sperm functional aspects. Hum Reprod 1995; 10 (Suppl 2): 100
38. Heywinkel E, Freudl G, Hofmann N. Acrosome reaction of spermatozoa with different motphology. Andrologia 1993; 25: 137
39. Menkveld R, Stander FSH, Kruger TF. Comparison between acrosome index and teratozoospermia index as additional criteria to sperm morphology in the prediction of expected in-vitro fertilisation outcome. Hum Reprod 1998; 13 (Abstr book 1): 52
40. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1992

4 J. Menkveld R, ct al. Semen parameters including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfer-tile population: an effort towards standardisation of in vivo thresholds. Hum Reprod 2001; 16: 1165

42. Palermo G, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17
43. In't Veld PA, et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. Hum Reprod 1997; 12: 752
44. Bonduelle M, et al. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13:781
45. Aytoz A, et al. Outcome of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection and the effect of sperm origin and quality on this outcome. Fertil Stcril 1998; 70: 500
46. Greco E, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2005; 20: 266
47. Henkel R, ct al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. Fertil Steril 2004; 81: 965
48. Bianchi PG, et al. Human cervical mucus can act in vitro as a selective barrier against spermatozoa carrying fragmented DNA and chromatin structural abnormalities. J Assist Reprod Genet 2004; 21: 97
49. Strassburger D, et al. Very low counts affects the results of intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet 2000; 17: 431
50. Coetzee K, et al. Short communication: an intracytoplasmic sperm injection pregnancy with a globozoospermia male. 1 Assist Reprod Genet 2001; 18: 311
51. Menkveld R, et al. The use of the acrosome index as an additional morphology parameter in the clinical selection of patients for ICSI. Hum Reprod 1999; 14 (Abstrbookl): 156

13

Akrozom Reaksiyonu: Fizyolojisi ve Bunun Klinik Pratikteki Önemi

Daniel R. Franken, Hadley S. Bastiaan, Sergio Oehninger

Çeviri: *Ahmet Bostancı*[*]

GİRİŞ

Oositin sperm tarafından başarılı bir şekilde fertilize olabilmesi için oosit ve spermin maturitesini gösteren parametrelere ihtiyaç vardır. Fonksiyonel kapabilite için spermlerde motilite ve zona bağlanmasının dışında akrozom reaksiyonunun oluşması çok önemlidir. Spermlerin akrozom reaksiyonuna geçmeden önce kapasitasyon denen hücre fizyolojisinde birtakım değişikliklerin olması gerekir. Spermin fertilizasyon kapasitesindeki biyokimyasal ve biyofiziksel değişiklikleri ortaya koymak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fertilizasyon yeteneği ile ilgili, spermin kümülüs ooforusu, korona radiatayı, zona pellucidayı (ZP), vitellin membranı delme yeteneği ile ilgili oluşan değişikliklerde önemli biyomarkırlar ortaya çıkar.

İnsandaki akrozom reaksiyonunu ortaya koymak o kadar kolay değildir. İnsanın yaşayan spermindeki Akrozomun olup olmadığı faz kontrast veya interferans kontrast mikroskopla gözlenemez çünkü insanınki diğer memelilerden çok küçüktür. Önceleri bu en iyi elektron mikroskopla anlaşılabilmiştir fakat bu pahalı ve pratik bir yöntem değildir. Bu yüzden ışık mikroskopu ile insan akrozom reaksiyonunu değerlendirilebilecek basit bir test ihtiyacı doğmuştur. İnsan sperm akrozomunun değişken tabiatı bu işi biraz zorlaştırmıştır. O yüzden seçilen yöntem normal ve dejeneratif reaksiyonu ayırt ediyor olmalıdır.

Yukarıdaki sakıncaların dışında laboratuarların uyguladıkları indükleme ve düzenleme sistemlerindeki belirsizlik ve farklılıklarda işi zorlaştırmaktadır.

AKROZOM REAKSİYONU VE KAPASİTASYONUN BİYOKİMYASI

İnsan sperminin akrozomu spermatogenesis sırasında Golgi kompleksinin bir parçası olarak oluşan membranla çevrili bir organeldir. Sperm çekirdeğinin ön kısmını çevreler ve aşağıdaki kısımlara ayrılır:

- Plasma membranı
- Dış Akrozomal membran
- Akrozomal Matrix
- İç Akrozomal Membran
- Ekvatoral Segment

Kapasitasyonu inhibe eden faktörler epididimdeki maturasyon sırasında sperm membranına eklemlenir[1,2]. Bu faktörler dış akrozom membranında negatif yükü indükleyen sialo-

[*] T. C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Doğum Kliniği, Ankara.

glykoprotein, sulfoglycerolipid ve steroid sülfatlardır[3]. Bu dekapasitasyon (stabilite) durumu ejekülasyon sonrası seminal plasmada ve kadının alt genital bölgesinde bulunan[4] inhibitör makromoleküller tarafından sağlanır[1]. Primer dekapasitör olarak bir glikoprotein tanımlanmıştır[1]; bu dış akrozom membranına tutunur hücre dışı sinyalleri bloke eder ve ayrıca iyon ve/veya enzim kanallarını inhibe eder[5]. Bu stabilite, kolesterolün akrozom membranına eklemlenmesi ile özellikle de plasma membranına, daha da artar.

Sperm invivo fertilizasyon kapasitesini kadının genital yollarında ilerlerken kazanır. İn vitro olarak da kapasitasyon kimyasal olarak tanımlanmış medilar sayesinde artırılır[6]. Yine de mekanizma tamamen anlaşılmış değildir fakat membran kompleksi, enerji metabolizması ve iyon geçirgenliğindeki major biyokimyasal ve biyofiziksel değişiklikler bu işte rol alır. En önemli değişiklikler:

- Servikal ve seminal plasmadaki dekapasitasyon faktörlerinin içsel yada dışsal proteazlarla (plasmin, kallikrein ve akrosin) modifikasyonu, yeniden dağılımı ve/veya kaybolması[1];
- Net negatif elektrik yükü içsel hidrolazlar (sterol sülfataz)[3] la azaltılır;
- Membran ıslaklığı , kolesterolün dışarı çıkması , doymamış yağ asitlerinin içeri girmesi ve böylece kolesterol/fosfolipid oranı değişerek artırılır; bu değişikliklerin serum albumin sayesinde olduğu düşünülür[3, 7].
- Geçirgenlikteki değişiklik kalsiyum glukoz ve oksijen alımında artmaya yol açarak enerji durumunu yükseltir buda akrozom reaksiyonuna gitme kabiliyetini ve hareketliliğini indükler[8,9].

Bu değişikliklerle uyumsuz gibi görünse de kapasitasyon reversibl bir olaydır. İrreversibl olma eşiğinin ne olduğu tanımlanamamıştır yani kapasitasyon ile akrozom reaksiyonu arasındaki sınırın ne olduğu belli değildir. Kapasitasyonla ilgili birçok yapısal değişiklikler bunun sonunda akrozom reaksiyonuna yol açan irreversibl bir olay olduğunu düşündürmektedir. O yüzden akrozom reaksiyonu kapasitasyonun son aşaması kabul edilir.

Akrozom reaksiyonunu başlatan işaretler plasma membranının yüzeyindeki bu mesajı ileten reseptörler tarafından algılanır. Zaneveld[5] iyon transportunu sağlayan mebmranda bulunan Guanisin trifosfat binding proteinler(GTP)in reseptörlerinin aktive olması ile ikincil mesenger sistemler çalışır. Uzun yıllar akrozom reaksiyonunun primer indükleyicisi endojen kalsiyum iyonunun eşik değere gelmesi olduğu düşünülmüştür[8,10]. Yanagimachi ve Usui[11] kalsiyum eklenmesinin dışında, magnezyum değil, domuz spermlerinde kalsiyumsuz ortamda inkübe edildiklerinde 10 dak içinde akrozom reaksiyonu olduğunu göstermişlerdir. O yüzden akrozomun total kaybolması gibi birçok reaksiyonda kalsiyum önemlidir ve de sonuçta fertilizasyonu sağlar[10]:

- Birçok enzimin aktivasyonu (akrosin, hyaluronidaz, Fosfolipaz A2);
- Enzim mesenger sisteminin aktivasyonu (adenilat siklaz);
- Net negatif yüklerin nötralize edilmesi,
- Hiperaktive edilmiş motilitenin indüklenmesi[3].

Stock ve fraser[12] insan sperminde kapsitasyonun desteklenmesi ve spontan akrozom reaksiyonu için hücre dışı kalsiyumun etkisini incelemişler ve akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon için kalsiyum kanallarından kalsiyumun geçebilmesi için hücre dışında 1. 80mmol/L miktarında kalsiyum olmalıdır. Tam tersine White ve ark[13] Ca'lu veya Ca'suz mediumlarda akrozom reaksiyonunun 4 ila 290 saat arasında gerçekleştiğini ve aralarında önemli bir fark olmadığını ve de Ca eksikliğinin motilite üzerinde önemli bir etkisinin olduğunu bulmuşlardır.

İnsan sperm akrozomal reaksiyonu önemli yapısal değişikliklerle karakterize ekzositotik bir olaydır akrozom kapsülünün tamamen kaybolması ile karakterizedir ve devamında

- Akrazom matriksinin dağılması
- Plasma ve dış akrozom membranının delinmesi ve keseciklenmesi;
- Keseciklerin bozulması
- Akrozom içeriğinin serbestleşmesi.

Nagea ve ark[14] bu akrozom reaksiyonu için tipik bir morfolojik sıralama önermişlerdir. Ara basamakta oluşan kesecikler dış akrozom mebranının ve plasma membranının içeri doğru invajinasyonu sonucu oluşur. Stock ve ark[15] benzer bir durum tariflemişlerdir. Tersine Yudin ve ark[16] insan spermleri diğer memelilerdeki gibi dış akrozom membranı ve plasma membranı önce fenestre olarak

birleşir sonra kesecik haline gelir diye bulmuşlardır. Bu keseciklerin bozulması tek ve bütün olarak sarılmış spermatozonların serbestleşmesini sağlar. Bu değişikliklere ek olarak plasma membranındaki proteinler yapısal değişikliğe uğrar ve sonuçta aktivasyon olur.

İNSAN SPERMİNDE AKROZOM REAKSİYONUNUN ÖLÇÜMÜ

Akrozomal ekzositozu ortaya koymak için, Kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu kimyasal olarak indüklenebilir. Tablo 13.1'de akrozom reaksiyonunu ölçen ve tetikleyen maddeler ve metodlar gösterilmiştir. Akrozom reaksiyonu, basal şartlarda (kapasitasyon şartlarında inkübe ederek) ve/veya farmakolojik veya fizyolojik agonistlerle indüklenerek, incelenebilir. Klinikte indükleyici olarak kullanılan maddeler; Kalsiyum ionofor (A23187)[18-21], pentoksifilin[22,23], steroidler[24-27], Folüküler sıvı (FF)[28], çözünebilir ZP[29-31] ve düşük ısıdır[20]. Akrozomal ekzositozu inceleyecek metodlar; üçlü boyama(optik mikroskop için)[32], transmisyon elektron mikroskop[33] klortetrasiklin florosan inceleme[34], floresan lektinler[35,36], antikorla işaretleme[37] ve flow sitometridir[38].

Tablo 13.1: *Spontan ve indüklenmiş Akrozom reaksiyonunu ölçmede kullanılan maddeler ve metodlar*

Akrozom reaksiyonunun indükleyenler
Kalsiyum ionofor
Pentoksifilin
Folüküler sıvı
Progesteron
Çözünebilir Zona pellucida
Akrozom Reaksiyonunu Değerlendirme metodları
Optik Mikroskop:3 lü boyama
Transmisyon elektron Mikroskop
Klortetrasiklin Floresan Ölçümü
Floresan Lectinler
Antikorla işaretleme
Akım sitometri

Bununla birlikte, dikkate alınması gereken negatif yan etkilerde vardır yani motilite üzerindeki muhtemel negatif etki gibi bu da gerçekte indiksiyonun akrozom reaksiyonundaki normal prosesin üstüne çıkması durumudur. Örneğin toksik kimyasal bir madde olan Ca ionofor indükleyici olarak kullanılırsa kapasitasyon için gerekli zaman minimize edilir. Anne cord serumu, FF, granuloza hücreleri, kümülüs ooforus ve ZP gibi kompleks biyolojik sıvıların eklenmesi doğada kontrol edilemese bile fizyolojik olarak daha doğrudur. Bu özellikle yardımla üreme tekniklerinde erkek infertilitesinin tedavisinde ve invivo düzenleyici mekanizmaları anlamada gelecekteki gelişmelerle özellikle yakından ilgili bir durumdur.

Yukarıda belirtildiği gibi her biri kendi çapında özelliği olan akrozom reaksiyonunu tespit edecek çeşitli teknikler tanımlanmıştır. Aitken ve Brindle[39] akrozom reaksiyonunda kullanılan problar değişik oranlarda akrozom kayıpları olduğunu göstermiştir. Akrozom vesikülünün değişken yapısı sperm viabilitesinin test edilmesini gerektirir. Talbot ve Chacon[35] trypan mavisi kullanarak üçlü boyama yapmışlardır. Cross[36] Hoecht33258 adlı supravital boya, Aitken A231887 boyası kullanmıştır. Değişik tekniklerin kullanılması sonuçların değerlendirilmesinde önemli etkileri vardır.

AKROZOM REAKSİYONUNUN FİZYOLOJİK DÜZENLEYİCİ VE İNDÜKLEYİCİLERİ

Stock[15] oosit kümülüs kompleksi ile inkübe edilen spermlerin %32 sinin 14-18 saatte akrozom reaksiyonunu başlatıp tamamladığını göstermiştir. Bastias ise[40] spermin fertilizasyon kapasitesi üzerinde kadın genital bölgesinin endometrial, tubal, granülosa ve kümülüs hücreleri, FF ve maternal serum gibi etkilerini göstermiştir. Kontrol grubuyla kıyas edildiğinde endometrial ve tubal hücrelerin sperm fertilizasyon kapasitesini değiştirmediğini göstermiştir. Fakat FF, granüloza veya kümülüs hücereleri ile inkübe edilen spermlerde hamsteroositlerin daha fazla penetre ettikleri görülmüştür. Buradan kümülüs hücre sekresyonlarının sperm akrozom reaksiyonunda önemli rol oynadığı düşünülebilir.

Siegel[41] FF içindeki maddelerin sperm fizyolojisini etkileyerek fertilizasyon kapasitesini artırdığını görmüşlerdir. FF de tanımlana Sephadex G-75 insan sperminde hücre içindeki Ca'un hızlı bir şekilde

artmasını sağladığı gösterilmiştir[42]. Ca'un hücre içine bu şekildeki girişi akrozomal ekzositozdan sorumludur. İndirek immunofloresanla FF'nin spermin 10 saatlik inkübasyonundan sonra akrozom reaksiyonunu indüklediği gösterilmiş[43]. Transmisyon mikroskopla FFve/veya aktif Sepahdeks G-75'in akrozom reaksiyonu için gerekli ultrastriktürel kriterleri yerine getirdikleri gösterilmiştir[16].

Yudin ve ark[16] 40 derecede 6 saat kapasite edilen insan sperminin FF'le 180 saniye inkübe edildiği zaman spermlerin %40'ının cevap verdiği görülmüş. FF muamelesi öncesi 22 saat inkübe edilenlerde akrozom reaksiyonu 6 kat artmış bu daFF in potansiyel etkisini ispatlamıştır. O yüzden FF öncesi yeterince preinkübasyon zamanı verilmesi kapasitasyonu senkronize eder ve akrozom reaksiyonunu kolaylaştırır. Tersine stock ve ark[44] FF maruz kalan insan spermlerinde spontan akrozom reaksiyonunun incelemişlerdir ve FF in stimule etmesi için 6 saatten fazla maruz kalması ve Medium da FF in %50 oranında olması gerekir. 1 saat kalırsa hatta 24 saatlik preinkübasyondan sonra bile olsa reaksiyonu indüklemediği görülmüştür.

Yeni çalışmalar göstermiştir ki FF deki akrozom reaksiyonunu indükleme yeteneği içindeki progesterona (P) bağlıdır. Osman ve ark[24] preovulatuar insan folükülünden elde ettikleri sıvıyı damıtmışlar ve 4-pregnen-3, 20-dione(progesteron) ve 4-pregnan-3, 20dione (17 hidroksiprogesteron) bulunmuştur. Bu durum Blackmore[25], Foresta[45] ve Baldi[46] tarafından konfirme edilmiş ve bunlar P ve !7-hidroksiprogesteronun hücre içi Ca oranının doza bağlı uzun süreli ve çabuk bir şekilde artırdıkları maksimum etkininde 1.0 mg/ml ile elde edildiğini bulmuşlardır. Sueldo ise 1.0 mg/ml'lik P dozunun 24 saatlik inkübasyondan sonra akrozom reaksiyonununa etkisi olduğunun göstermiştir[27].

Luconi ve ark[47] insan sperminde P ve Estrojen (E) in hızlı ve genetik olmayan etkilerini göstermişlerdir. Bu etki plasma membranındaki klasik olmayan reseptörler tarafından ve bu reseptörlere steroidlerin bağlanması ile olur. Özellikle P Ca'un hücre içine girişini, çeşitli sperm proteinlerinin tirosin fosforizasyonunu, Klorun dışarı çıkışını ve cAMP nin artışını sağlayarak kapasitasyonu indükler, hiperaktif hareketlilik ve akrozom reaksiyonuna yol açar. Diğer taraftan folükül sıvısında mikromolar düzeyde bulunan E spermin P'na cevabını düzenler. Bu E Ca'un hücre içine girişini sağlayarak ve proteinlerin tirozin fosforilasyonuna etki ederek yapar.

Genel olarak, P (mPR) ve E (mER) spermdeki putatif membran reseptörlerinin isolasyonu ve özellikleri halen net değildir. Luconi[47] insan sperminde mPR ve mER'nin varlığı ve fonksiyonları ile ilgili delillere ulaşmıştır. Bu membran reseptörlerini tanımlayabilmek için PR için c262 v eER için H222 antikorlarının bu reseptörlere bağlanmak üzere göndermiştir. Sperm lizatların Western Blot analizinde PR içi 57kDa v eER için 29kDa luk bantlarda antikorlar tespit edilmiştir, ve klasik reseptörler hariç tutulmuştur. Canlı insan sperminde her iki antikorda P ve E ye cevaben oluşan Ca içeri girişi ve akrozom reaksiyonunu bloke edebilmiş Klasik PR ve ER reseptörlerine karşı geliştirilen antikorlar ise etkisiz olmuştur. c262 antikoru ise invitro olarak spermin hamster oositini penetre etmesini engellemiştir. Bütün bu veriler birleştirildiğinde mPR ve mER'nin varlığı ve klasik reseptörlerden farklı olduğu ve bu steroid hormonların insan sperminde çabuk etki göstermesini sağladığı sonucuna varabiliriz.

Siegel[41] farklı kadınlardan elde ettiği FF in fertilizasyon potansiyelini etkilemediğini bulmuştur. Morales[48] ise her bir folükül sıvısındaki P düzeyi ile akrozom reaksiyonunu indükleme aktivitesi arasında pozitif ve istatistiki olarak ciddi bir korelasyon olduğunun (r=0. 72;p>0. 005) bulmuştur.

Son zamanlardaki çalışmalarda FF sıvısının içindeki akrozom reaksiyonunun indükleyen molekülün kimyasal yapısı hakkında çelişkiler vardır. Bunun Progesteron olduğunun söyleyenler olduğu gibi, Miska ve ark[49] bu maddenin bir protein olduğunu öne sürmüştür. Bu otörler bu proteinin 50 kDa olduğunu unspesifik proteazlara, ısı ve pH artışlarına hassas olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada[50] Akrozom reaksiyonunu indükleyen maddenin (ARİS) progesteron bağlayan protein kortikoid bağlayan globulin (CBG) olduğunu tanımlamışlardır. Anti CBG antikorları ve dextran'la kaplanmış kömür kullandıklarında görmüşler ki sadece CBG ye bağlı P reaksiyonu indüklemektedir. CBG SERPİN (Serine proteinaz inhibitörü) ailesinin bir üyesidir ve P sıkıca bağlanır. Serin proteazlarla proetoliz olunca bu steroid hormon serbestleşir. Bu mekanizma inflamasyondaki nötrofillerin aktive olması için gerekli olan mekanizmadır.

Spermdeki serin preteinaz akrosin'dir ve plasma membranında bulunur bu inaktif ve akrosomda bulunan proakrosinle birliktedir. Kapasitasyon sırasında akrosin ve proakrosin plasma membranında belirir. CBG Progesteron kompleksi akrosinin proteolitik etkisi ile parçalanır ve yüksek konsant-

rasyonda P serbestleşir, bu da sırayla akrozom reaksiyonunun indükler bu durum akrosinin bu işteki önemini göstermektedir. P la uyarılmış Ca girişinin insan spermindeki mekanizması tam anlaşılmamıştır. Merak edilen diğer konuda CBG nin kaynağıdır. Bu karaciğer orijinli olup FF da mı birikmektedir yoksa kümülüs ya da granuloza hücreleri bunu sentez mi etmektedir.

ZP nın akrozom reaksiyonunu indüklemekteki fonksiyonu iyi bilinmektedir[29-31,51-53]. Spermler oositi penetre edip fertilize etmeden önce bu son bariyeri reaksiyon oluşturarak penetre etmeleri gerekir. Saling ve Storey[54] sıçan spermi kullanarak ilk defa ZP nın akrozom reaksiyonundaki rolünü göstermişlerdir. Bunlar kümülüssuz yumurtalarla spermleri inkübe etmişler %50'den fazlası akrozom reaksiyonuna girmiştir. Santrifuj sonrası sadece akrozomu intact spermler ZP üzerinde tespit edilmiştir. Fertilize olan sıçan sperminde akrozom reaksiyonu ZP üzerinde olmaktadır. SAling, Bleil ve Wassarman[56] en azından sıçanlarda akrozom reaksiyonu ZP içeriği glükoprotein olan ZP3 tarafından indüklenmektedir. Aşağıdaki kavramları öne sürmüşlerdir

- Spermin ZP ye bağlanması
- ZP ye spesifik ve geridönüşsüz bağlanması
- Akrozom reaksiyonunun Fizyolojik indüksiyonu
- ZP nın penetrasyonu

Cross[36] insan sperminde ZP nin akrozomal egzositozisi indüklemesinde iki yaklaşım kullanmıştır. Yaşamayan yumurtalar ve asitle yapısı bozulmuş zonalar kullanılmıştır. Bunların herikiside akrozom reaksiyonunu indüklemiştir. Monoklonal antikor tekniği kullanıldığında (T-6) Coddington ve ark[57] ortadan ayrılmış ZP'ya bağlanan spermlerin %93'ünde akrozom reaksiyonu görülmüştür. Hoshi[58] sperm zona ya tutunduktan 6 saat sonra akrozom reaksiyon hızı %35. 7+-!7.7 gibi kontrol grubundan %2.8 bayağı yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar göstermektedir ki spermin ZP'ya doğru hareket etmesi çok düzenli bir mekanizmayla olmakta ve spermler uygun bir dönemlerinde ZP'ye tutunup penetre etmektedirler.

Sıçan ve insanlarda P ZP tarafından uyarılmış akrozom reaksiyonunda primer rol oynar[59,60]. Önceki çalışmalarda P ile tedavilerde ZP dada fosfotidilinositol4, 5-bifosfonat (PİP2)nın ortaya çıkması p nin egzositozu başlattığını gösterir. Cross ve ark[29] ilk defa asitle dağıtılmış ZP ile tedavi edilen spermlerde akrozom reaksiyonunun artmış bulmuşlardır.

Lee ve ark[30] boğmaca toksini ile muamele edilen spermlerde ZP ile indüklenmiş akrozom reaksiyonunun inhibe olduğu görülmüştür. Tersine Ca ionoforla (A-23187) indüklenen akrozomal egzositozda inhibisyon olmamıştır. Franken ve ark[31] çözülebilir insan ZP sinin akrozom reaksiyonundaki etkisi doza bağlıdır ve bu 0.25-1 ZP/ml sınırlarındadır. Daha da yeni olarak Franken (51) yeni bir mikro ölçüm yöntemi bildirmiştir burada minimal hacimlerde çözülebilir insan Zp'si akrozom reaksiyonunda fizyolojik indükleyici olarak kullanılmış ve buna (ZP ile indüklenmiş akrozom reaksiyon testi veya ZİAR) denmiştir. Bu tür çalışmalarda çözülebilir ZP nin doza bağlı indüksiyon etkisi 1.25-2.5ZP/ml dozlarında ulaşılmıştır. Aynı şekilde Ca ionoforlarının da akrozom reaksiyonundaki indükleyebilirliği aynı şekilde ölçülebilir.

Çalışmalar arasındaki farklılık türlerdeki farklılıklardan kaynaklanabilir ancak major olarak deney şartlarının ve ölçme yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Çalışmanın yapıldığı invitro şartlar spermlerin reaksiyonunda çok önemli etkileri vardır, ayrıca da oosit kümülüs kompleksinin maturasyonu ve kompleksin içindeki moleküllerin tutulmasında da bu etkiler aynı şekilde vardır.

AKROZOM REAKSİYON BÖLGESİ

Akrozom reaksiyonunun tam yeri bilinmemektedir. Üç muhtemel bölge düşünülmektedir[3].

- Ampullanın yumurta kanalı sıvısı
- Kümülüs Matriksi
- Zona pellucidanın yüzeyi

Önceki sperm akrozom reaksiyon bölgeleri çalışmaları golden hamsterlerin akrozom başlığı büyük olduğu için onların kauda epididimal spermleri ile yapılmıştır. Akrozom reaksiyonunun ilerlemesi faz kontrast mikroskopla takip edilebilir. Yumurta kanalı çalışmalarıda bu çalışma sonuçları ile uyumludur. Cummins ve Yanagimachi[61] dişi hamster ampuller içeriği ile faz kontrast mikroskopta çalışma yapmıştır, inseminasyondan 4-10 saat sonra gözlemiştir ki serbest şekilde yüzen 96 spermden 93'ü de akrozom başlığında şişme ve değişiklik gözlemiştir. Yanagimachi ve Philips'in[62] önceki çalışmalarında ise golden hamster spermlerinden 14 ünün sadece 4 tanesi serbest yüzmüş ve akrozom başlığı modifiye olmuştu.

Kümülüs matriksini akrozom reaksiyonu bölgesi olarak değerlendiren çalışmalarda Cummins ve Yanagimachi[61] yumurta kanallarının kumulisinde gözlenen bütün hareketli golden hamster spermlerinin akrozom reaksiyonuna gittiği gözlenmiştir. Yanagimachi ve Phillips[62] ampulladan oluşan golden hamster sperm kümülüs intact kompleksinin kümülüsunun akrozomu değiştirdiği bildirilmiştir. Ancak Cherr ve ark[63] vidoe bant çalışmalarında kümülüs matriksi içinde spermlerin sadece %3-6'sı akrozom reaksiyonunun tamamlamıştır bu sonuç serbest yüzen spermlerde kontrol grubu olarak oluşan akrozom reaksiyonu ile karşılaştırılabilecek durumdadır. Çalışmaları kümülüslü ve kümülüssuz yumurtaları içermektedir reaksiyon gösteren spermler kümülüslü yumurtayla beraber olan zona pellucidalarda daha çok olmuştur.

Tesarik[64] taze insemine insan yumurtasını penetre eden spermlerde akrozom bölgesini tespit etmek için çalışma yapmıştır. İnsemine olan oosit antiakrosin monoklonal antikorla muamele edilmiş ve bağlanan antikor ikinci bir peroksidaz konjuge antikor kullanılarak çok detaylı bir şekilde gözlenmiştir. Onun bulguları göstermiştir ki, fertilize spermin akrozom reaksiyonu penetrasyon ile senkronize olmalı ve bu oosit kümülüs komplaksindeki akrozom reaksiyonunun uyarıcı maddeler tarafından yapılmış olmalı. Kantitatif analizler göstermiştirki ZP içindeki sperm sayısı ZP yüzeyindeki akrozom hayaletleri ile ilişkili akrozin deposit miktarı ile uyumludur.

İVF de üçlü boyama tekniği kullanılarak kümülüs içinde ve dışındaki akrozomun durumu incelenmiştir[65]. Eğer kümülüs içinde inkübe edilirse akrozom reaksiyonuna giden sperm sayısı anlamlı bir şekilde %14.5'den %24.5'e artış göstermekte, eğer oosit içeren olgun genişlemiş kümülüs dokusu varsa bu artış %49 gibi daha fazla olmaktadır. White ve ark[13] hazırlanmış spermleri 20-30 dakikalığına insan kümülüs ooforusları ile karşılaştırmış;bu spermler kümülüs kitlesini derinlemesine peneter edebilirken hiçbirinde bariz akrozom reaksiyonu olmamıştır. Bu çalışmadan çıkardıkları başka bir sonuç spermlerin penetrasyon için kapasitasyon periodunda ihtiyaç duymamalarıdır.

İn vitro bir sistemde yüksek konsantrasyonda sperm kullanılırsa kümülüs matriksinde yumuşama (depolimerizasyon) oluşabilir. bu spermin intact akrozomla zona pellucidaya ulaşmasını sağlar. Cummins ve Yanagimachi[61] bu yüzden hamster spermlerinin düşük sperm /yumurta (3/1) oranlarında intact kümülüs matriksini penetre etme yeteneklerini çalışmışlardır. Kapasitasyonu olmayan sperm 2 saatlik ön inkübasyon olsa bile kümülüsu penetre edemez. İnvitro olarak kapasite edilmiş kümülüs üzerinde görülen 628 spermin; 270'i, ki bunların 10'unda intact değişmemiş akrozom vardır ancak penetre edebilir. Onlar kümülüs penetrasyonunun akrozom reaksiyonu tamamlanmadan önceki kapasitasyon fazı ile limitli olduğu sonucuna varmışlardır. Çünkü akrozom başlığını kaybeden sperm zayıf penetrasyon yapar ve hayatiyetini kaybeder. Corselli ve Talbot[66] kapiller tüplerdeki taze hamster oosit kümülüs kompleksini zorlamak için fizyolojik sperm numaralarının kullanıldığı bir sistem geliştirmişlerdir. Bunlar kapasite olmuş akrozomu intact hamster sperminin kümülüs hücrelerinin arasından ekstaraselüler matriksi delebileceğini ve ZP'ya bağlanabileceğini göstermişlerdir. Bu iki grubun sonuçları göstermiştir ki kapasite olmamış spermler periferden kümülüs hücrelerine yapışır ancak penetre edemezler ve de akrozom başlığını kaybeden sperm de zor penetrasyon yapar.

O yüzden kümülüs matriksi zona pellucidayı delmek için normal akrozom reaksiyonuna gidecek morfolojik olarak normal spermleri selektif olarak seçen bariyer görevi görmektedir, ve/veya spermin reaksiyona gitmesini uyaracak moleküller içermektedir. Kümülüs matriksinde fazlaca bulunan CBG ve P akrozom reaksiyonun başlaması için fizyolojik uyarı görevi görmektedir.

AKROZOM REAKSİYONUNUN KLİNİKLE BAĞLANTISI

İki birbirinden bağımsız çalışmada Barros[67] ve Singer[68] golden hamster ve insan spermi kullanılarak yapılan çalışmada uzamış inkübasyona rağmen ZP'ya bağlanamayan ve penetre edemeyen sperm lere infertil demişlerdir. İnkübasyonun uzayıp penetrasyonun azalması akrozom reaksiyonu olan spermlerin oranındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmüştür. Tersie zonasız hamster yumurtalarında penetrasyonun inkübasyonla birlikte artması (akrozom reaksiyonlu populasyonun artmasına bağlıdır). Böylece akrozom reaksiyonu olan spermler ZP penetrasyonunu engellemektedir. Bu sonuçlar göstermektedir ki, spermin fertilizasyon kapasitesi zamana bağlı bir olaydır.

Yalnızca akrozom reaksiyonlu spermlerin zonasız oositlerle birleşme yeteneğinin olması aynı za-

manda akrozom reaksiyonlu hücrelerle gözlenen spem oosit birleşme seviyeleri arasında ciddi bir korelasyon yoktur. Bu iki biyolojik ölçüm spermin akrozom reaksiyonu kabiliyetinin iki değişik yönünü ölçmektedir. White ve ark benzer bir şekilde[13] İn vitro olarak insan oositlerinde akrozom reaksiyonu hızı ile fertilizasyon hızları arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir. Pampiglionen[69] invitro olarak oositi fertilize etmeyen spermlerde akrozom cevabı eksikliği tanısı konabilir, oositi fertilize eden hastalar ise fertil donörler gibi cevap vermişlerdir. Bir de akrozom reaksiyon oranı <%31.3 olanlarda öngörülen fertilizasyon yetmezliği %100'dür. Spontan gelişen reaksiyonların fertilite ile bir ilişkisi yoktur, akrozom reaksiyonunun indüklenebilirliği yaşayan spermlerin akrozom reaksiyonuna gidebilme yeteneğini gösterir, bu durum subfertil erkeklerde ciddi olarak azalmış veya yoktur ve bu fertilizasyon olmamasının sebebi olarak akrozom disfonksiyonunu gösterir[19].

Henkel ve ark[70] iyi bir fertilizasyonun göstergesi olabilmesi için indüklenebilirliğin en az %7.5 olması gerekir. Akrozom reaksiyonu indüklendikten sonra, akrozom reaksiyonlu spermler % 13'den fazla ise bu da fertilizasyon potansiyeli hakkında prediktif değeri vardır, çünkü başarılı fertilizasyon için daha çok sayıda spermin akrozomunu kaybedebilmesi gerekir. Tanısal amaçlar için indüksiyonun çeşidi yani ZP glikoproteinleri kullanılarak fizyolojik mi olduğu veya Ca ionoforlar veya düşük ısı kullanılarak non fizyolojik mi olduğu çok önemli değildir. Ancak indüklenebilirlik ve ZP'yı penetrasyonla birlikte uygun zamanlı akrozom reaksiyonu iyi bir fertilizasyon için şart olan süreçlerdir[61,52,71].

Liu ve ark[72,73] bozuk ZP indüklenmiş akrozom reaksiyonu diye sperm bozukluğu tariflemişlerdir (DZPİAR). Bu uzun süreli infertil hastalarda İVF sırasında sperm penetrasyon bozukluğuna yol açan bir sperm defektidir. Bunlar daha önce idiopatik infertilite tanısı almış hastalar idi.

Bastiaan ve ark[52,71] ve Esterhuizen[53] 164 vakalık morfolojiye dayalı bir çalışmalarında benzer sonuca ulaşmışlardır , burada <%4 (n=71), %5-14 arası (n=73), >%14(n=20) şeklinde normal formlara göre gruplara ayrılmış.

Bunlar için ZİAR sonuçları <%4, %5-14, >%14 için sırasıyla %9.6, %13.9, %15.0 bulunmuştur. Kontrol grubundaki fertil erkeklerin ZİAR sonucu ise %24'dür ki, yukarıdaki androlojik 164 kişilik gruptan oldukça yüksektir. Hemizona ölçümlerinde de önemli farklılıklar görülmüştür, %38 (<%4'lük grup), %54.5 (%5-14'lük grup), %62.6 (>%14'lük grup). >%14 olan grupta (Tablo13.2) 21 vakanın 5 tanesinde %23 ZİAR sonuçlarını bozmuştur (<%15). Bunların 3 tanesinde (%14) normal morfoloji ve sperm zona bağlanması olmasına rağmen ZİAR sonuçlarında azalma görülmüştür. Bu çalışma göstermiştir ki erkek infertilite çalışmalarında ZİAR testi ikinci level test olma özelliğine sahiptir.

Tablo 13.2: *Başarısız Zona Pellucida indüklenmiş Akrozom Reaksiyon (ZİAR) testinde beş vaka sonuçları.*

Vaka	Sperm-zona bağlanma (HZI)	Morfoloji (% normal formlar)	ZIAR (%)
1	77	11	16
2	92	6	16
3	63	9	15
4	26	6	14
5	37	12	14

HZI, hemizona bağlanma indeksi

Luive Baker[72] oligozoospermlerde bozuk sperm-ZP ilişkisinin sıklığını araştırmışlar. Oligo spermleri olan 72 infertil erkekte Sperm ZP bağlanması ve ZP ile indüklenmiş akrozom reaksiyonları çalışılmış. Klinik İVF de fertilize olamamış oositler test için kullanılmış. Dört oosit her bir semen örneğinden swim upla elde edilen 2 milyon motil spermle l2 saat inkübe edilmiş. Her bir ZP ve ZİAR için bağlanan sperm sayısı değerlendirilmiş. Bu şartlarda <%40 sperm bağlı/ZP düşük ve <%15 ZİAR da yine düşük olarak kabul edilmiştir. 72 oligospermik hastada %28'inde düşük sperm/ZP bağlanması olmuştur. Normal sperm ZP bağlanması olan (n=52) kişinin %69'unda düşük ZİAR oluşmuştur. Toplamda %78'inde düşük ZP bağlanması veya normal ZP sperm bağlanması olmasına rağmen düşük ZİAR olmuştur. Sadece %22'sinde hem sperm ZP bağlanması normal hem de ZİAR normal bulunmuştur. Oligospermik erkeklerde yüksek sıklıkta defektif sperm ZP ilişkisi gözlenmiş, bu da İVF de infertilitenin veya düşük fertilizasyonun en önemli sebebidir.

Esterhuizen ve ark[53] 35 çiftte normal ve iyi prognozlu sperm morfolojililerde ZP ile indüklenmiş akrozom reaksiyonu cevabının(ZİAR) yardımla üreme tekniklerinde kötü fertilizasyon sonuçları bildirmişlerdir. Sonuçlar Metafaz II oositlerin invitro fertilizasyon oranları ile karşılaştırılabilir. İnteraktif nokta diyagramında hastalar iki gruba

bölünmüş; örneğin ZİAR <%15 ve ZİAR >%15 ve fertilizasyon oranları sırasıyla %49 ve %79 bulunmuştur. Eğrinin altındaki alan %99 ve %95 güven aralığında ve 0.5'i içermemektedir, bu da ZİAR testinin İVF hastaları arasında fertilizasyon başarısızlığını değerlendirebileceğini gösterir.

SONUÇLAR

Fertilize edecek sperm geçici ve uzaysal olarak regule edilen devamlı bir reaksiyon prosesinden geçer. Özel transformasyon evreleri boyunca spermler işaretlere cevap verirler ve belirli bölgeden ZP ya bağlanıp onu penetre ederler. Sadece doğru zamanda ve doğru yerdeki spermler ZP'yı penetre edebilir ve oositi fertilize edebilir. İn vivo durumda buna benzer ve kapasitasyonun doğru bir evresinde mümkün olan en fazla sayıda normal spermlerin oosite ulaşmasıyla olur.

Biz gösterdik ki, sebebi belli olmayan infertil vakaların %14'ünde bozuk ZİAR vardır, ve bunlar İVF yerine İCSİ ile tedavi edilmelidir. ZİAR[53] veya DZPİAR[72] testleri doğru diagnostik potansiyeli vardır klinisyene İCSİ'den fayda görüp görmeyecekleri hakkında bilgi verir. Hastaların İVF mi yoksa İCSİ ile mi tedavi edileceklerini belirlemede, fertilizasyonda rol alan önemli sperm özelliklerine göre karar vermek gerekir. Sperm zona ilişkisi bozuk olan örneğin Zona pellucida bağlanması ve Zona ile indüklenmiş akrozom reaksiyonu bozuk olanlar İVF yerine İCSİ ile tedavi edilmelidir[53,73]. Bu yüzden bu fonksiyonel testlerin infertil erkeklerde veya sebebi açıklanamayan vakalarda temel sperm parametreleri ile birlikte bakılıp hastalar İCSİ'ye yönlendirilmeli ve başarısız olacak tedavilerle inseminasyon gibi vakit kaybetmemek gerekir.

KAYNAKLAR

1. Oliphant G, Reynolds ALB, Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. Am J Anat 1985; 174: 269
2. Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with mammalian sperm surface. Am J Anat 1985; 174: 285
3. Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Res 1985; 12: 183
4. Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A. Effects of human seminal plasma on fertilization capacity of human spermatozoa. Fertil Steril 1979; 31: 321
5. Zaneveld LJD, et al. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. Hum Reprod 1991; 6: 1265
6. Yanagimachi R. In vitro sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemically defined medium in in vitro fertilization and embryo transfer. In Hafez ESE, Semm K, eds. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. New York: Alan Liss, 1982: 65
7. Fleming AD, Yanagimachi R. Effect of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa, with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. Gamete Res 1981; 4: 253
8. Murphy SJ, Roldan ERS, Yanagimachi R. Effects of extracellular cations and energy substrates on the acrosome reaction of precapacitated guinea pig spermatozoa. Gamete Res 1986; 14: 1
9. Katz OF, Cherr GN, Lambert H. The evolution of hamster sperm motility during capacitation and interaction with the ovum vestments in vitro. Gamete Res 1986; 14:333
10. Yanagimachi R. Calcium requirements for sperm-egg fusion in mammals. Biol Reprod 1978; 19: 949
11. Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp Cell Res 1974; 89: 161
12. Stock CE, Fraser LR. Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. J Reprod Fertil 1989; 87: 463
13. White DR, Phillips DM, Bedford JM. Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa. J Reprod Fertil 1990; 90: 71
14. NagaeT, et al. Acrosome reaction in human spermatozoa. Fertil Steril 1986; 45: 701
15. Stock CE, et ai. Human oocyte—cumulus complexes stimulate the acrosome reaction. J Reprod Fertil 1989; 86:723
16. Yudin AI, Gottlieb W, Meizel S. Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. Gamete Res 1988; 20: 11

17. Fraser L. p-Aminobenzamidine, an akrosin inhibitor, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. J Reprod Fertil 1982; 66: 185
18. Jamil K, White IG. Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. Arch Androl 1981; 7: 283
19. Cummins JM, et al. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: relationship to fertility and other seminal parameters. J Androl 1991; 12:98
20. Sanchez R. A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. Andrologia 1991; 23: 197
21. Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG. Analysis of the response of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. J Androl 1993; 14: 132
22. Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. Effects of phosphodiesterase inhibitors caffeine and pentoxifylline on spontaneous and stimulus-induced acrosome reactions in human sperm. Fertil Steril 1992; 58: 1185
23. Tesarik J, Mendoza C. Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency. Fertil Steril 1993; 60: 141
24. Osman RA, et al. Steriod induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. Biochem Biophys Res Commun 1989; 160: 828
25. Blackmore PF, et al. Progesterone and 17-hydroxprogesterone: novel stimulators of calcium influx in human sperm. J Biol Chem 1990; 265: 1376
26. Calvo L, et al. Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization. Hum Reprod 1994; 9: 1880
27. Sueldo CE, et al. Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. Fertil Steril 1993; 60: 137
28. Suarez SS, Wolf DP, Meizel S. Induction of che acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. Gamete Res 1986; 14: 107
29. Cross NL, et al. Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. Biol Reprod 1988; 38: 235
30. Lee MA, Check LH, Kopf GA. Guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. Mol Reprod 1992; 31: 78
31. Franken DR, Morales PJ, Habenicht UF. Inhibition of G protein in human sperm and its influence on acrosome reaction and zona pellucida binding. Fertil Steril 1996; 66: 1009
32. Talbot P, Chacon RS. A new technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J Cell Biol 1979; 83: 2089
33. Kohn FM, et al. Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, Pisum sativum agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. Hum Reprod 1997; 12: 714
34. Lee MA, et al. Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. Fertil Steril 1987; 48: 649
35. Talbot P, Chacon RS. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J Exp Zoo! 1981; 215: 201
36. Cross NL, et al. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res 1986; 15:213
37. Wolf DP, et al. Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. Biol Reprod 1985; 32: 1157
38. Fenichel P, et al. Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. J Reprod Fertil 1989; 87: 699
39. Aitken RJ, Brindle JP. Analysis of the ability of three probes targeting the outer acrosomal membrane or acrosomal contents to detect the acrosome reaction in human spermatozoa. Hum Reprod 1993; 8: 1663
40. Bastias MC, Kamijo H, Osteen KG. Assessment of human sperm functional changes after in vitro coincubation with cells retrieved from the human female reproductive tract. Hum Reprod 1993; 8: 1670
41. SiegelMS, Paulson RJ, Graczykowski JW. The influence of human foflicular fluid on the acrosome reaction, fertilizing capacity and proteinase activity of human spermatozoa. Hum Reprod 1990; 5: 975
42. Thomas P, Meizel S. An influx of extracellular calcium is required for the initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicu-lar fluid. Gamete Res 1988; 20: 397
43. Fukuda M, et al. Correlation of the acrosomal status and sperm performance in the sperm penetration assay. Fertil Steril 1989; 52: 836
44. Stock CE, et al. Extended exposure to follicular fluid is required for significant stimulation of the acrosome reaction in human spermatozoa. J Reprod Fertil 1989:86:401
45- Fotesta C, et al. Progesterone induces capacitation in human spermatozoa. Andrologia 1991; 24: 33
46. Baldi E, et al. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. J Androl 1991; 12: 323
47. Luconi M. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and esrrogens. Steroids 2004; 69: 553
48. Morales P, et al. The acrosome reaction-inducing activity of individual human follicular fluid samples is highly variable and is related to the steroid content. Hum Reptod 1992; 7: 646
49. Miska W, Henkel R, Fchl P. Recent studies on the structure of the acrosome reaction-inducing substance (ARTS) in human follicular fluid. Mol Reprod Dev 1995; 42: 80

50. Miska W, Fehl P, Henkel R. Biochemical and irnmunological characterization of the acrosome reaction inducing substance (ARIS) of hFR Biochem Biophys Res Commun 1994; 199: 125
51. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. A microassay for sperm acrosome reaction assessment. J Assist Reprod Genet 2000; 17: 156
52. Bastiaan HS. Zona pellucida induced acrosome reaction (ZIAR), sperm morphology and sperm-zona binding assessments among subfertile men. J Assist Reprod Genet 2002; 19: 329
53. Esterhuizen AD, et al. Clinical importance of zona pellucida induced acrosome reaction (ZIAR test) in cases *of* failed human fertilization. Hum Reprod 2001; 16: 138
54. Saling PM, Storey BT. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro: chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse acrosome reaction. J Cell Biol 1979; 83: 544
55. Saling PM, Irons G, Waibel R. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. Biol Reprod 1985; 33: 515
56. Bleil DJ, Wassarman PM. Sperm—egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. Dev Biol 1983:95:317
57- Coddington CC, et al. Sperm bound to zona pellucida in hemizona assay demonstrate acrosome reaction when stained with T-6 antibody. Fertil Steril 1990; 54: 504
58. Hoshi KH, et al. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by human pellucida and effect of cervical mucus on zona-induced acrosome reaction. Fertil Steril 1993; 60: 149
59. Roldan ERS, Murase T, Shi Q-X. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. Science 1994; 266: 1578
60. Schuffner AA, et al. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. Mol Hum Reprod 2002; 8: 722
61. Cummins JM, Yanagimachi R. Development of the ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro in relation to the timing of the acrosome reaction. Gamete Res 1986; 15: 187
62. Yanagimachi R, Phillips DM. The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vivo. Gamete Res 1984; 9: 1
63. Cherr GN, Lambert H, Katz D. Completion of the hamster sperm acrosome reaction on the zona pellucida in vivo. J Cell Biol 1984; 99: 261
64. Tesarik J. Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. Hum Reprod 1989; 4: 957
65. Carrell DT, et al. Role of the cumulus in the selection of morphologically normal sperm and induction of the acrosome reaction during human in vitro fertilization. Arch Androl 1993; 31: 133
66. Corselli J, Talbot P. An in vitro technique to study penetration of hamster oocyte-cumulus complexes by using physiological numbers of sperm. Gamete Res 1986; 13: 293
67. Barros C, et al. Relationship between the length of sperm preincubation and zona penetration in the golden hamster: a scanning electron microscopy study. Gamete Res 1984; 9: 31
68. Singer SL, et al. 1 he kinencs of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte in vitro. Gamete Res 1985; 12: 29
69. Pampiglione JS, Tan S, Cambell S. The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. Fertil Steril 1993; 59: 1280
70. Henkel R, et al. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. Hum Reprod 1993; 8: 2128
71. Bastiaan HS, et al. The relationship between zona pellucida induced acrosome reaction (ZLAR), sperm morphology, sperm—zona pellucida binding and in vitro fertilization. Fertil Steril 2003; 79: 49
72. Liu DY> Baker HWG. Disordered aCfOsome reaction of spermatozoa bound to the zona penucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona penetration and reduced fertilization in vitro. Hum Reprod 1994; 9: 1694
73. Liu DY, Garrett C, Baker HWG. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization-embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. Fertil Steril 2004; 82: 1251

14

Sperm-Zona Pellusida Bağlanma Analizleri

Sergio Oehninger, Murat Arslan, Daniel R. Franken

Çeviri: *Ahmet Bostancı*[*]

FERTİLİZASYON BİOLOJİSİ

Normal fertilizasyonun başarılı olarak tamamlanabilmesi için zorunlu ihtiyaçlar matür metafaz II oositi ve kapasitasyonunu tamamlamış hareketli spermotozoadır. Yeni oluşmuş zigot oositin endojen sistemine bağlı olarak erken bölünmelere maruz kalır ve 4-8 hücre basamağında embriyonik genomun transkripsiyonunu başlatır. In vivo bu olaylar endometrial mukozanın (implantasyon penceresi) hazırlanmasıyla senkronizedir ve blastokist için yeterli tutunma alanı sağlar.

Spermtozoalar çok gelişmiş hücrelerdir ve bunların asıl görevleri oositi özellikle de onun DNAsını aktive etmek ve böylece embriyo oluşumunu sağlamaktır. Oositi fertilize edebilmesi için spermotozoonun en azından şu fonksiyonları gerçekleştirebilmesi gerekir: migrasyon (yeterli hareket patternleriyle fertilizasyon bölgesine transportu sağlar), zona pellusidayı tanıma ve bağlanma (spesif reseptör-ligand ilişkisine bağlı bir olay), zona pellusidaya penetrasyon (zona bileşikleri tarafından akrozom reaksiyonunun indüklenmesini takiben enzimlerin salınmasına sekonder), oolemmaya bağlanma (karşılıklı gamet moleküllerinin ilişkisine bağlıdır), oosit aktivasyonu, çekirdek dekondensasyonu ve syngamiye yol açan pronükleus oluşumunda rol alma[2].

Sperm-oosit ilişkisine yol açan olaylar

Sadece kapasitasyonu tamamlayan spermotozoanın, yeterli hareket karakteristiklerine, akrozom reaksiyon cevabına, oosit ve onu çevreleyen komponentleriyle interaksiyonuna sonuç verecek yeterli fizyolojik stimulusa cevap verme kabiliyeti vardır. Kapasitasyon sırasında gerçekleşen diğer değişiklikler arasında hücresel değişiklikler; yüzey proteinlerinin uzaklaştırılması ve modifikasyonu, membranlardan kolestrol akışı, oksidatif metabolizmada değişiklikler, motilitenin hiperaktif patternini yakalama ve birçok proteinin fosfotirosin içeriğini artırma şeklindedir. Bazı özel proteinlerin tirosin fosforilasyonuna ek olarak hücresel regulatörlerin diğer modifikasyonları gerçekleşir ve bunlar mesela proteinlere kalmodulin bağlanmasında azalma ve hücrelere kalsiyum alımında, intraselüler pH ve cAMP konsantras-yonunda artma şeklindedir[2,3].

Sperm-zona pellusida ilişkisi: tanıma, bağlanma ve akrozom reaksiyonunun indüksiyonu

Fertilizasyon sırasında gerçekleşen erken olaylar son derece kompleks hüce-hücre tanımanın bir özel formu olarak değerlendirilebilir. Birçok somatik hücre sistemlerinde hücre-hücre tanıma mekanizmaları membran glikoproteinlerinin karbonhidrat zincirleri arasındaki iletişim iledir ve birçok araştır-

[*] T. C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Doğum Kliniği, Ankara.

ma memelilerdeki spermotozoa-oosit bağlanmasında da benzer moleküllerin rolü olduğunu göstermiştir. Şu anda ilgi gören kanıt da sperm yüzeyindeki karbonhidrata bağlanan proteinlerin zona pellusidadaki gliko eşdeğer komplekslerine yüksek afiniteyle bağlanarak gamet tanınmasını sağladığına dairdir.

Farelerde, şu ana kadar en iyi bilinen tür, zona pellusida protein3 (ZP3) ile plazma membranda mevcut olduğu farzedilen tamamlayıcı sperm-bağlanma proteinleri arsında sıkı bağlanma sağlanır. ZP3 akrozom reaksiyonunu tetikler ve bunu takiben zona pellusida protein 2 (ZP2) ve iç akrozomal sperm zarının zona penetrasyonuna yol açarak ikinci olarak bağlanma olayı gerçekleşir. ZP3-bağlanma fonksiyonu için glikozilasyon bir zorunluluk olarak gözüküyor. Fare gamet interaksiyonu için O-glikozilasyonu, özellikle O-bağlı oligosakkaridlerin terminal galaktoz kısımlarının glikozilasyonunun zorunlu olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda farelerdeki sperm-zona ilişkisinde amino şeker N-asetilglukozamin(NAG)in de anahtar terminal monoskkarid olarak görev aldığını gösteren bazı deliller vardır. Buna karşılık, ZP3ün akrozom reaksiyonunu tetikleyen aktivitesinin protein yapısına bağlı olduğu gözüküyor[5,11 ve 12]. ZP3 proteinlerinin DNA dizisine göre sentezlenen peptidler bazı canlılarda akrozomal ekzositozu tetikleyebilir.

ZP3 için olan sperm yüzey reseptörlerinin moleküler yapısının tanımlanması şu anda yapılan yoğun çalışmaların konusu oldu. Sıçangillere ait bir seri aday ZP3 reseptör molekülleri olduğu öne sürülüyor ve bunlar sp56, p95, β-1-4 galaktosiltransferaz ve D-mannozidaz gibi potansiyel karbonhidrat-bağlayan proteinleri içeriyor. Fakat henüz bu moleküllerin hiçbirinin ne yapı veya biolojik rolü ne de onların komplementer bağları doğrulanmıştır.

Farelerde ZP3 bağlanma ve ZP3 tarafından indüklenmiş akrozomal ekzositoz birbirinden ayrılabilir, çünkü şöyle ki her ikisi birbirinden farklı iki olay olarak gözüküyor. ZP3 ün sperm-bağlanma aktivitesi ve akrozom reaksiyon indükleme aktivitesi için konsantrasyon-bağımlılığında farklılıklar vardır. Özellikle, ZP3'ün akrozom reaksiyon tetikleme aktivitesi için konsantrasyon cevap eğrisi ZP3 bağlanma aktivitesi için olan konsantrasyon cevap eğrisine göre sağa kaymıştır. ZP3ün birçok 'fonksiyonel bağlar' dediğimiz komponentlerden oluştuğu ve bu bağların sperm yüzeyiyle olan ilişkisinin hem sperm bağlanma aktivitesi (glikozilasyona uğramış bölgeler sayesinde) ve hem de tüm akrozom reaksiyonunu tetikleme kabiliyetinden sorumlu olduğu düşünülen bir model teori öne sürülüyor. Gamet tanıma ve adezyonu muhtemelen çok çeşitli bağ interaksiyonuna dayanıyor ve bu sayede sperm protein reseptörleri ZP3 üzerindeki bir çok farklı bölgelere bağlanıyor. Bu fonksiyonel bağlar özdeş olmak zorunda değildir. O- veya N-bağlı glikozilasyon bölgelerinin katılımıyla ilgili veriler de özellikle insanlarda şüphelidir. Direk karbonhidrat analizleri için doğal insan zona pellusidanın yokluğu da halen kesin yapısal tanımlamanın yapılmasını imkansız kılıyor.

Biz de insanda spermin zona pellusidaya spesifik ve sıkı bağlanması için 'selektin-benzeri' ilişkinin gerekli olduğunu iddia ediyoruz. Hapten-inhibisyon testleri, zona pellusida lektin-bağlanma çalışmaları ve fonksiyonel karbohidratların kimyasal ve enzimatik metodlarla uzaklaştırılması/ modifikasyonu ilk bağlanmada tanımlanmış karbonhidrat parçalarının katılımına delil sağlamıştır. Bizim çalışmalarımız insan spermi üzerindeki selektin bağlara bağlanabilen farklı zona-bağlayıcı proteinlerin varlığını savunuyor[21]. Ayrıca sonuçlar ilk gamet bağlanması ve immün/enflamatuar hücre interaksiyonları sırasında karbonhidrat dizilerinde yakınlaşma olabileceğini gösteriyor[22]. Selektin bağlanma aktivitesi gösteren glikokonjugantların tümüyle karekterize edilmesi insan gametinin fizyolojik ve patolojik durumlardaki ilişkilerini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. Bununla birlikte, insan zona proteinlerinin biyokimyasal komponentleri ve sekonder yapısını tanımlanması biyolojik materyalin azlığından dolayı engelleniyor.

Geçen 20 yıl süresince araştırmacılar 'sperm-reseptör' olarak bireysel protein veya karbohidrat yan-zincir tanımlamaya çalıştılar. Sersemletilmiş fareler kullanarak ZP2 veya ZP3 yokluğunda zona pellusidanın büyüyen oositler etrafında toplanamadığı ve kadınların infertil olduğu gösterildi. ZP1 yokluğunda zonanın düzensiz bir şekilde büyüyen oositler etrafında toplandığı ve kadınların fertilitesinin azalmış olduğu görüldü. Bu araştırmalar ZP2 ve ZP3ün uzun Z-filamentler oluşturduğu ve ZP1 tarafından çapraz bağlandığı zona pellusidanın yeni tanımlanmış yapısıyla uyuşuyor[23].

Ama yeni genetik datalar farelerde sperm bağlanmasını sağlamada tek bir protein (ya da karbonhidrattan) ziyade üç boyutlu yapının bağıntılı olduğunu gösteriyor. Toplarsak, genetik data sadece tek bir fare zona-pellusida proteinin taxon-spesifik

sperm-bağlanması için yeterli olmadığını ve iki insan proteininin insan sperm bağlanması için yetersiz olduğunu vurguluyor. Farenin 'insanlaştırılmış' zona pellusidaya sperm bağlanmasının fertilizasyon sonrasında gözlem-lenmiş devamlılığı yıkılmamış ZP2 varlığıyla ilişkilidir. Bu araştırmalar sperm bağlanma için gerekli olan ve ZP2 yıkımı tarafından modüle edilen zona pellusidanın supramoleküler yapısını içeren sperm bağlanma modeliyle uyum gösterir.

Zona Pellusida bağlanma sonrası olayları: füzyona neden olan sperm ve oosit ilişkisi, oosit aktivasyonu, pronükleus oluşumu ve erken embiryogenezde paternal etki

Akrozomal reaksiyonunu tamamlamış spermotozoa zona pellusidaya yaklaşıp penetrasyon yaptıktan sonra oosit plazma membranına (oolemma) bağlanabilir. Bu olay spermin ekvotaryal bölgesine yerleşmiş olduğu varsayılan moleküller(sperm füzyon proteinleri) ile henüz tam tanımlanamamış oosit resptörleri arasında spesifik bir tanıma olarak gözüküyor. Gametlerin bağlanması membranların füzyonuna ve tüm spermotozoonun ooplazma ile birleşmesine yol açar. Spermotozoonun oosit membranıyla teması oositte elektriksel membran değişikliklerini (membran depolarizasyonu) ve polispermiye karşı hızlı ve geç koruyucu mekanizmaları sağlayan kortikal granüllerin salgılanmasını tetikler[2].

Hala spermotozoonun oositi nasıl aktive ettiğine dair öne sürülen üstü kapalı mekanizmalar arasında anlaşmazlıklar var. Oosit aktivasyonu muhtemelen spermotozoonun oosit içine girdikten hemen sonra salınan bir faktör tarafından modüle edilen hücre içi kalsiyum ion kaonsantrasyon değişiklikleri ile ilişkili olarak gerçekleşir. İnsanda ve diğer canlılardaki bu faktörün net tanımlanması halen gerçekleştirilememiştir. Sperm-oolemma bağlanması ve füzyonunu oositin ikincil-mesaj sistemlerin(kalsiyum, fosfotidilinositol-4, 5-bifosfat (PIP2)) aktivasyonu, pH değişiklikleri, protein sentezi, siklin birikimi, DNA sentezi, çekirdek zarfının yıkılması ve bazı canlılarda ilk bölünme takip eder. Kalsiyum konsantrasyonunda artış mikrotübüler yeniden düzenleme ve pronükleus oluşumu ile ilişkilidir. Çok açıkça görülmekte ki spermotozoon ve oosit arasında çokça bağlantı vardır. Membran füzyonuna sekonder gelişen olaylar ve spermotoozoon tarafından salınan oosit aktivasyon faktörlerine ek olarak oosit sperm başı dekondasyonunu ve protaminlerin histonlarla değiştirilmesini indükleyen molekülleri kullanır. Fertilizasyon oositin mayoz bölünmeyi tamamlamasıyla sağlanır, daha sonra dişi ve erkek pronükleuslar oluşturulur ve singami (pronükleusların birleşmesi) oluşumu sağlanır.

FERTİLİZASYON ANOMALİLİKLERİ: İN VİTRO FERTİLİZASYON VE İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYON AYARLARINDAN DERSLER

Daha önceden bahsettiğimiz üzere sperm-zona pellusida bağlanması çok önemli bir basamaktır ve bu birçok sperm fonksiyonunu yansıtır. İn vitro fertilizasyonda (IVF) oositleri fertilize edemeyen birçok hastada bu fonksiyonel stepte bir bozukluk vardır. Akrozom reaksiyonuna girme kapasitesinde bir defekt de muhtelemelen bazı hastalarda önemli bir faktördür. Yeni araştırmalarda gösterilmiştir ki akrozomal ekzositoz küçük hacimlerde çözünebilen insan zona pellusida kullanılarak in vitro çalışılabilir ve burada G-proeinleri mediatör olarak devreye girer. Bu daha önce diğer canlılarda akrozom reaksiyonu için heterotrimerik G-proteinlerinin devreye giridiğini gösteren diğer çalışmaları doğrular. Ayrıca araştırmalar gösteriyor ki birçok erkek infertilitede fonksiyonel/biyokimyasal/ morfolojik sperm immatürasyonu (mesela yüksek kreatin konsantrasyonu) mevcuttur ve bu da fertilizasyon bozukluklarına yol açar.

Fertilizasyon kusuru sperm-zona pellusida ilişkisindeki defekte ek olarak, sperm-oolemma füzyon defektleri veya penetre olan spermotozoon ve oosit arasındaki anormal ilişki nedeniyle de meydana gelebilir(mesela sperm-oosit aktivasyon faktorü, male pronükleus büyüme faktörü veya diğer faktörelerin eksikliği veya yokluğu). Şu zamanlarda yapılan intrasitoplazmik sperm enjeksiyon (ICSI) çalışmaları post-gamet füzyon anomaliliklerin olabileceğini açıkça gösteriyor. Lazer scanner aynı odaklı mikroskop ile florasan görüntüleme ve diğer tekniklerdeki gelişmeler gamet ve embriyoların karmaşık olan iyi çözümlenmiş incelemelerinin yapılmasına izin verir ve böylece sperm sentrozomu, oosit mikrotübül oluşum merkezi, mitokondrial dağılım ve embriyo bölünmesinin başlaması hakkında fikir edinmemizi sağlar. Biz hala gametlerin (fonksiyonel, biyokimyasal-

moleküler ve genetik) erken embriyogenez ile ilişkisini açıklamak ve fertilizasyon bozukluklarında rol oynayan spesifik molekülleri tanımlamak için şu anda devam eden çalışmaları ve sonuçlarını merak ediyoruz.

KLİNİK BAKIŞ AÇISI: ERKEK SUBFERTİLİTE VE SEMEN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfertilite için başvuran erkeklerde-ki bu erkek faktör olarak tanımlanır, sperm analizi anomalilikleri vardır ve bu oligoastenoteratozoosperminin farklı dereceleriyle yalnız veya birlikte olarak alakalıdır. Buna ek olarak diğer yapısal veya biyokimyasal değişiklikler gösterilebilir. Anatomik olarak bu anomaliler şu şekilde sınıflandırılabilir:membran değişiklikleri (osmotik basınca dayanıklılık testleri, fosfotidilserin ve diğerlerinin translokasyonu ile ölçülebilir), nüklear hatalar (anormal kromatin kondensasyonu, histonların kaybolmaması ve DNA fragmanlarının varlığı), sitoplazmik lezyonlar (reaktif oksijen parçacıklarının fazlaca oluşması, mitokondrial membran potansiyeli kaybı veya sitoplazmanın kaybolmaması, kreatin kinaz içeriğinin fazla olması veya kaspazların varlığı gibi immaturite belirteci) ve flajeller bozukluklar (mikrotübül ve fibröz yapının bozuklukları). Bu değişikler immatürite belirteci, apoptoz fenotip varlığı, enfeksiyon-nekroz veya diğer sebepler nedeniyle gerçekleşebilir[37-43].

Bunların gerçekleşmesi ve klinik sonuçlarla zayıf ilişkisine rağmen bu anormalliklerin spermin özellikle gamet transportu, fertilizasyon ve embriyogenezde rol almasıyla ilgili fonksiyonunu nasıl direkt olarak etkilediği net değildir. Ayrıca bu analizlerin çoğu deneysel aşamadadır, ve bu analizlerin klinikteki yerinin değerlendirilmesi ve bunların erkek infertiliteyi göstermedeki gerçek kapasitesinin tanımlanması için daha çok araştırma yapılamalıdır.

Bunun yanı sıra, in vitro daha güvenilir olarak gerçekleştirilebilecek diğer spesifik ve kritik sperm fonksiyonel kapasiteleri vardır. Bu fonksiyonlar şunlardır:motilite, kapasitasyonu tamamlama kapasitesi, zona pellusida bağlanması, akrozom reaksiyonu, oolemma bağlanması, dekondansasyon ve pronükleus oluşumu. Bu özelliklerin değerlendirilmesi sperm fonksiyon testi olarak tanımlanır.

SPERM FONKSİYON ANALİZLERİNİN GÜVENİLİRLİĞİ:BİR META-ANALİZ SONUÇLARI

Genellikle uygulanan fonksiyonel analiz kategorileri şunlardır: (1) gamet ilişki bioanalizleri (mesela heterolog zonasız fare oosit testi ve homolog sperm-zona pellusida bağlanma analizleri); (2) indüklenmiş akrozom-reaksiyon testi;ve (3) sperm hareket karakteristiklerini değerlendirmek için bilgisayar yardımlı sperm hareket analizidir. (CASA)[33, 44-50].

34 yayınlanmış prospektif olarak düzenlenen kontrol çalışmalarda ele alınan 2906 hastadan elde edilen sonuçlar üzerine yapılan yeni mevcut analizlerin geçerliliğinin sonuç bazlı değerlendirildiği objektif bir yayın yayınladık. IVF sonucu için sperm fonksiyon analizlerinin (bilgisayar yardımlı sperm hareket analizi veya CASA, indüklenmiş akrozom-reaksiyon testi, sperm penetrasyon analizi veya SPAve sperm-zona pellusida bağlanma analizleri) dört kategorisinin tahmini değerleri metaanalitiksel bir yaklaşımla incelenerek amaca ulaşıldı.

Bu metaanaliz sonuçları in vitro koşullarda fertilizasyon meydana gelmesi için sperm-zona pellusida bağlanması ve indüklenmiş akrozom reaksiyon analizlerinin çok güçlü tahmin gücü olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan fertilizasyon göstergeci olarak sperm penetrasyon analizlerinin düşük klinik değeri olduğu ve CASA sistemlerinin potansiyel klinik yarar için daha çok araştırılmaya ve standardizasyona gerçekten ihtiyacı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışma klinik yönetim ve gelecekte yapılacak çalışmaları yönlendirecek objektif delil sunsa da aynı zamanda şu an yapılan testlerin kısıtlamaları olduğunu, şimdiki yöntemlerin standardizasyon ihtiyacı olduğunu ve yeni teknolojilerin geliştirilmesi gerektiğini ortaya koyuyor. Şunu da belirtmek gerekir ki bu analizlerin doğal konsepsiyonda geçerliliğini ve tahmin gücünü gösteren hiçbir çalışma yoktur.

IN VITRO SPERM-ZONA PELLUSİDA BAĞLANMA ANALİZLERİNİN DÜZENLENMESİ

Grubumuz insan sperminin homolog zona pellusida ile sıkı bağlantısın sağlanması için yapılan in vitro bioanalizin (hemizona analizi veya HZA) doğruluğu ve gelişmesi için yoğun olarak çalışma yapmıştır.

İlk çalışmalar kapasitasyonunu tamamlamış spermotozoanın spesifik sıkı ve geri dönüşsüz olarak homolog biyolojik olarak intakt olan zona pellusidaya bağlanması ve fizyolojik olarak indüklenmiş akrozom reaksiyona girmesi (zona pellusida tarafından tetiklenmiş ekzositoz) hipotezi üzerine kurulmuştur. Bu hipotez spermotozoa ve mikrodiseke edilmiş insan oositinden elde edilen zona pellusida ile inkübe edilerek test edilmiştir ve bunun devamında kinetik, sperm konsantarsyonu, sperm morfolojisi ve bağlanmanın zaman bağımlılığı ve sıkı bağlanmada sperm akrozom durumunun belirlenmesi yapılmıştır.

HZA; potansiyel fertilizasyon tahmini için insan spermotozoasının insan zona pellusidaya bağlanmasının test edildiği yeni bir diagnostik test olarak tanıtılmıştır. HZA'da insan oositinin mkrodiseksiyonuyla elde edilmiş iki karşılıklı zona küresi 3 önemli avantaj sağlar: (1) her iki yarım küre fonksiyonel olarak eşit yüzeylerdir ve bunlar tek bir yumurta tarafından bağlanan spermin bağlanma ve üreme ölçümlerinin kontrollü karşılaştırılmasını sağlar; (2) kısıtlı sayıda olan insan oositleri çoğaltılabilir çünkü bir tek oosit üzerinde içten kontrollü test yapılabilir; ve (3) oositler mikrocerrahiyle ayrıldığı için taze oositlerin kullanılması dikkatsiz fertilizasyon ve pre-embriyo oluşumuna yol açmaz[46,52].

Şu anda en çok kullanılan iki zona bağlanma testi, HZA[46] ve zona pellusida bağlanma testidir[32,47]. Her iki bioanaliz de spermin homolog zona pelllusidaya bağlanmasında fonksiyonel homolog test sağlaması ve aynı analizde fertil ve infertil spermotozoası olan popülasyonları karşılaştırması yönünden avantajlıdır. HZA ile iç kontrol sağlanması, analiz esnasında gerekli olan oosit sayısını azaltması ve intra-analiz değişikliğini azaltması avantajı sunar[46, 52-57].

Analizde insan oositinin farklı kaynakları kullanılabilir: cerrahi olarak çıkarılan overlerden veya posmortem overyan dokudan elde edilen oositler ve IVF programından elde edilen oositler. Test için her zaman taze oosit bulmak zor olduğu için depo için çeşitli alternatifler geliştirilmiştir. Diğer araştırmacılar insan oositlerinin çok düşük ısılarda dimetilsulfoksid (DMSO) içinde saklanılabildiğini göstermiştir. Ek olarak Yanagimachi ve arkadaşları yoğun konsantre edilmiş tuz solusyonlarında fare ve insan oosit stoğunun efektif olarak yapılabileceğini ve böylece spermin zona pellusida bağlanma kapasitesinin korunduğu nu göstermişlerdir. Geliştirilen HZA tekniğiyle taze ve DMSO ve tuzla stoklamış (kontrollü pH durumları altında)insan oositlerinin bağlanma kapasitesini inceledik ve tüm bu durumlarda sperm zona bağlanma kapasitesinin sağlam kaldığı sonucuna vardık. Devamında hem fertil hem de infertil semen örneklerinin benzer bağlanma eğrileri ile gamet koinkübasyonunun 4-5 saat zaman zarfında olan maksimum bağlanmasını göstererek spermin zonaya bağlanma kinetiklerini değerlendirdik.

Oosit toplanması, elde edilmesi ve mikromaniplasyonunun detaylı tanımlanması, HZA için semen inceleme ve destekleme hazırlıkları gibi birçok yerde yayınlanmıştır. Bu çalışma her bir hemizonanın bir sperm damlasına maruz kaldığı (swim-uptan sonra hazırlanan 500 000 hareketli sperm/ml nin 50-100µl dilüsyonu) 4 saatlik gamet koinkübasyonu ile standardize edilmiştir. Sperm hazırlanması ve gamet koinkübasyonu için, sentetik serum ile desteklenmiş insan tuba sıvısı veya insan serum albumini genellikle kullanılan ortamdırlar. Koinkübasyondan sonra hafifçe bağlanmış spermi yerinden oynatmak için cam pipetle hemizona pipetlenir. Son olarak, faz-kontrast mikroskop ile zonanın dış yüzeyine sıkıca bağlanan sayısı sayılır. (x200). Sonuçlar hasta ve kontrol grubu için hemizonaya sıkıca bağlanan sperm sayısı ve hemizona indeksi (HZI) olarak sunulur. Kontrol örnekler için sıkı bağlanan sperm sayısı (x100) olarak sayılır.

Bu analiz veri değerlendirmesini etkileyen faktörlerin net tanımlanmasıyla değerlendirilir ve bu faktörler: bağlanma kinetikleri, yumurta değişkenliği ve olgunlaşma durumu, analiz içi varyasyon ve sperm konsantrasyon, morfoloji, motilite ve akrozom reaksiyon durumudur. Analiz kısıtlamalarının tanımlanması ve onun küçük analiz içi varyasyonu (%10'dan daha az) nedeniyle HZAnın ayrım gücü maksimize edildi. Buna karşılık diğer sperm-zona bağlanma testleri için yumurta içi yüksek varyasyon olduğu için birçok sayıda oosit kullanılması gerekiyor ve bu testlerde aynı zamanda analiz içi yüksek varyasyon katsayısı rapor edilmiştir.

HZA koşullarında insan spermotozoa ve insan zona pellusidanın spesifik ilişkisi zonaya sıkı bağlanan spermin akrozom reaksiyonunu tamamlamış olmasıyla güçlenir. İnsan, maymun, fare gametleri gibi farklı türler üzerine yapılan deneylerin sonuçları HZA koşullarında insan sperm-zona pellusida fonksiyonlarının yüksek tür spesifikliğiolduğunu göstermiştir ve bu sonuç da bu bioanaliz testinin infertilite ve kontrasepsiyon testi için kullanımına daha fazla destek sağlar.

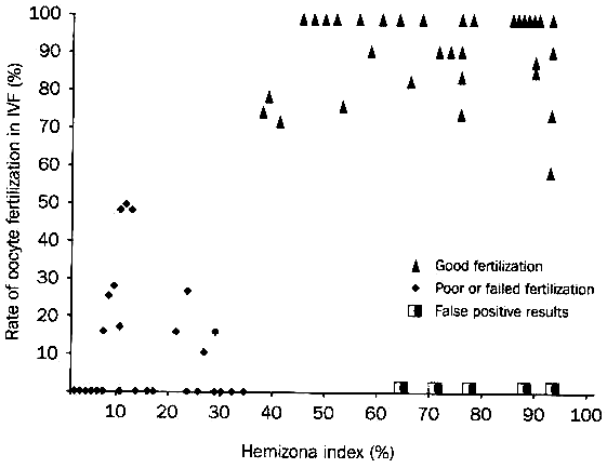
HEMİZONA ANALİZ TESTİNİN IVF SONUÇLARI İÇİN TAHMİN DEĞERİ

Prospektif kör çalışmalarda spermin hemizonaya bağlanması ve IVF sonucu arasındaki ilişkisini ortaya koyduk[31,56,65-67]. Sonuçlar HZAnın başarısız ve kötü fertilizasyon riski olan erkek infertilitesi olan hastaları başarılı bir şekilde ayırdığını göstermiştir (Şekil 14.1).

Güçlü istatistiksel sonuçlar HZA'nın fertilizasyon oranını saptamada kullanılmasına izin veriyor. HZA IVFde düşük fertilizasyonla karşılaşacak erkek infertilitesi olan hasta popülasyonu ayırabilir ve diğer sperm parmetreleri (morfoloji ve hareket özellikleri)nden elde edilen bilgiyle birleştirildiğinde klinik arenada güvenilir ve yararlı bilgiler sunar. Temel sperm parametreleri arasında sperm morfolojisi, spermatozoanın zona pellusidaya bağlanma kapasitesini gösteren en iyi belirteçtir. Ciddi teratozoospermisi (kötü pognoz patterni veya sıkı kriterlere göre %4'den daha az normal sperm skoru) olan hastaların spermi HZA koşulları altında zona pellusidaya bağlanmada bozulmuş kapasiteye sahiptir (membran/reseptör eksiklikleri?).

Bizim çalışmalarımızda diğer sperm parametrelerinin (sperm konsantrasyonu, morfolojisi, ve hareket özellikleri) tahmin değerini saptamak için HZA'yı regresyon analiz testinden çıkardığımızda, IVF sonucunun en iyi ikinci belirteci ise ileri hareket yüzdesidir. Sperm morfolojisi ve IVF sonucu arasındaki ilişkinin zona pellusidaya bağlanmadaki bir etkene bağlı olduğunu düşündük. Diğer taraftan, motilitenin HZA'nın tahmini dışında fertilizasyon oranını etkilediği görüldü. Motilite, bağlanmayı sağlamada önemli olsa da, HZA da direk değerlendirilmeyen faktörler olan kümülüs oluşumu ve zona pellusida penetrasyonu için çok daha önemli olduğu ortaya çıkacaktır. Lojistik regresyon analizi oositin fertilize olma potansiyeli için güçlü bir HZI tahmin aralığı sağlamıştır. Bu HZI cut-off değeri yaklaşık %35'dir. Tüm başarısız/başarılı ve kötü/iyi fertilizasyon oranları için HZAnın gerçek tahmin edebilirliliği (ayrım gücü) sırasıyla %80 ve %85'di. Sonuç olarak bu bilgi insanları IVFe yönlendirmede çok değerlidir. (mesela HZI<%35 ise kötü fertilizasyon şansı %90-%100'dür, buna karşılık HZI>%35 ise iyi fertilizasyon şansı %80-%85'dir.) (Şekil 14. 1)[31, 67, 68, 70].

HZA düşük yanlış pozitif sonuçlarla birlikte çok iyi spesifisite ve sensitivite gösterir. HZI %35 değeri için HZA'nın pozitif tahmin değeri %79'dur ve negatif tahmin değeri ise %100'dür (iyi ve kötü fertilizasyon oranları değerlendirilerek). HZA'da yalancı pozitif sonuçlar beklenir, çünkü spermin zona pellusidaya bağlanmasını diğer fonksiyonel basamaklar takip eder ve bunlar fertilizasyon ve preembriyo oluşumu için önemlidir.



Şekil 14.1: *HZI indeks cut-off değeri %35 alarak IVFde hemizona indeks(HZI)ve fertilizasyon oranının küme analizi. Küme ▲:yüksek HZI, %50-%100 oosit oranında başarılı fertilizasyon;Küme ♦:düşük HZI, %0-50 oosit oranında kötü veya başarısız fertilizasyon;küme■: yüksek HZI fakat başarısız fertilizasyon olan yalancı-pozitif sonuçlar(vakaların <%15). IVF tedavisi alan hastalarda eğer HZI sonuçları <%35 ise kötü fertilizasyon şansı %90-%100dür, diğer taraftan HZI sonuçları >%35 ise, iyi fertilizasyon şansı %80-85dir. Yalancı negatif sonuçların olmadığına ve vakaların %15inde yalancı-pozitif sonuç olduğuna dikkat edin. Bu küme analizi referans 56 ve 66-68 den elde edilen verilerle gerçekleştirilmiştir.*

INTRAUTERİN İNSEMİNASYON TEDAVİSNDE GEBELİK SONUCU İÇİN HEMİZONA ANALİZİNİN TAHMİN DEĞERİ

Intrauterin inseminasyon sikluslarında gebelik tahmininin IVF'de fertilizasyon tahmininden çok daha zor olduğu tahmin ediliyor. Bu kontrasepsiyonun multifaktöryel doğasından kaynaklanıyor çünkü o birçok sperm fonksiyonu ve buna ek olarak birçok

dişi parametrelerine bağlıdır. IUI tedavisi için en çok önemli olan dişi parametreleri oositlerin niteliği veya miktarı ve kapasitasyonunu tamamlamış spermin fetilizasyon bölgesine transportudur (mesela tubal ve uterin çevrenin etkisi, IUI hazırlama tekniği)[71]. Bunun yanı sıra yine birçok potansiyel ve çözümü daha zor dişi faktörler bunlardan biri de spermotozoanın periton ve folliküler sıvıya maruz kalmasıdır ki bu olayın spermin zona pellusidaya bağlanmasını ve akrozom reaksiyonu fizyolojik tetikleyicilere karşı cevap verebilme yeteneğini etkilediği bulunmuştur[72,73]. Sperm-zona pellusida bağlanması in vivo ve in vitro modellerde fertilizasyona götüren yolculukta önemli ve ortak bir basamaktır.

Biz bu yüzden, kocanın spermini kullanan IUI terapisine maruz kalan hastalarda gebelik sonucunu tahmin etmesi için HZA'in gücünü test ettik. Klinik denemeye açıklanamamış ve erkek faktör infertilite tanısı almış çiftlerin katılması istendi. 3 yıllık zaman zarfında açıklanamamış/erkek faktör infertilitesi tanısı almış ve 313 IUI tedavisi almış 82 çift çalışma katılmayı kabul etti. Erkek partnere ilk IUI tedavi siklusunun 3 ay zaman zarfında HZA yapılır ve çiftler takip eden 12 ay zaman zarfında 1-6 IUI siklusuna tabi olur. Bütün dişi hastalar gonodotoprin protokolü uygulanarak kontrollü olarak hipersitümüle edilir.

Çalışmaya katılan tüm hastalarda HZI sonuçları %0 ile %178 arasında değişmektedir. Gebelik sağlanan minimum ve maksimum HZI değerleri sırasıyla %17 ve %109'dur. IVF'de başarılı fertilizasyon tahmini için optimum olarak ispatlanan %30-35 HZI cut-off değerine göre verileri incelediğimizde HZA yaklaşık %90 gibi bir negatif tahmin değerine sahiptir (mesela HZI<%35 olan hastaların düşük kontrasepsiyon şansı vardır) (Tablo 14.1). Bir başka taraftan sonuçlar gösteriyor ki testin negatif tahmin değerinin cut-off değerleri arttıkça buna parelel olarak pozitif tahmin değeri de azalır (r =-0. 7, p<0. 05 ve r =-0. 8, p<00. 5 sırasıyla pozitif tahmin ve negatif tahmin değeri için). Bu daha yüksek HZI değerleri için yalancı pozitif oranlarının artması olarak olarak yansır (Şekil 14.2). Bu sonuç gebelik oluşumu için bir çok pre ve post sperm-zona pellusida bağlanma faktörlerinin aktif rol oynadığını doğrular: yüksek HZI değerine sahip hastalarda konsepsiyon oluşmayabilir.

Bu bulguların ışığında HZI değerlerinin %0-%60 aralığındaki verileri tekrar inceledik. Bu yaklaşım erken IVF çalışmalarında da kullanılmıştır, ki bu çalışmalarda optimal IVF koşullarında ve HZI>%60 olduğunda başarılı fertilizasyon olduğu rapor edilmiştir. HZI cut-ff değeri %30-%35 olduğunda relatif olarak yüksek pozitif tahmin değeri (%69) bulduk fakat yüksek negatif tahmin değeriyle (%93) birlikte hala çok yüksek yalancı pozitif değeri olduğunu tespit ettik.

Veriler tüm popülasyon içinve ayrıca etyolojiye göre (erkek faktör veya açıklanamamış) subgruplara ayrıldıktan sonra erkek ve dişi parametrelerinin katkısını değerlendirmek için alıcı işlem karakteristik analizine (ROC) tabi tutulmuştur.. Bu modelde HZI cut-off değeri %32 alındığında %69 PPV ve %93 NPV ile (p =0. 005) erkek faktör infertilitesi olan subgrupta gebelik tahmini için önemli bir güç sergiledi. Bu grupta ortalam yol hızı belirteç olarak öneme sahip ikinci erkek faktör parametresiydi. (%30 PPV ve %95 NPV cut-off değeri 46. 5μm/s, p =0. 001). İnfertilite süresi hem tüm hastalarda hem de her iki subgrupta gebeliğin güçlü bir prediktörüdür. Tüm erkek ve dişi paremetrelere uygulanan ikili lojistik regresyon analizi erkek faktör infertilite tanısı alan çiftlerde konsepsiyon tahmininde en güçlü ve tek parametre olduğunu doğrulamıştır (-2 log olasılığı 28. 778'in ve 7. 7202'nin $\chi 2$, p =0. 005) (tablo 14.2).

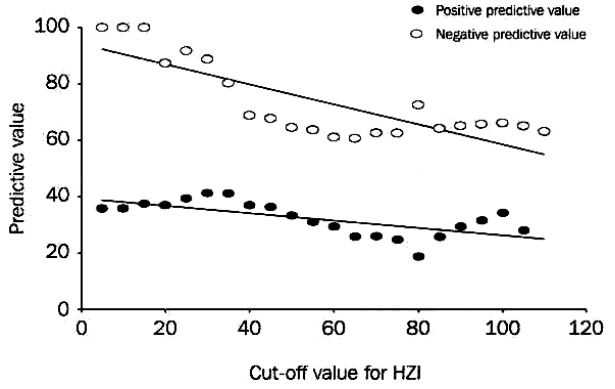
Tablo 14.1: *HZI cut-off değeri %30-35 aralığıolarak alınan IUI tedavisi alan gebeliklerde HZA'nın tahmin değeri. Tahmini değerler tüm hastalar ve HZI sonuçları %0-60 aralığında olan hastalar için hesaplandı.*

	Tüm hastalar	HZI değeri %0-60 olan hastalar
Pozitif tahmin değeri (%)	40	69
Yalancı pozitif oranı (%)	69	42
Yalancı negatif oranı (%)	11	11
Negatif tahmin değeri (%)	89	93

Her ne kadar elde olan deliller IUI tedaviye başlamadan çiftleri yönlendirme tarama çalışmasında HZA'nın kullanımını desteklese de bu ilk sonuçları doğrulamak için daha geniş prospektif çalışmalarına hala ihtiyaç var.

DOĞAL KONSEPSİYONDA HEMİZONA ANALİZİNİN TAHMİN DEĞERİ

Semen analizinden elde edilen bilginin dişinin bir süre içinde gebe kalabilme olasılığını tahmin etmede kullanılabileceğini düşündük. Bu olasılık semen niteliğini etkileyen birçok faktör tarafından etkilenir ve buradaki kısıtlamaları engellemek için büyük grupları içeren basit modellerin kullanıldığı çalışmaların yapılması gerekir. Dünya literatürleri klinik durumları belirlemek için saptanan cut-off değerleri için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) guideline'ları kullanır. Fakat yeni çalışmalar bu mevcut yol göstericiler (quide-line) hakkında şüphe olduğunu göstermiştir.



Şekil 14.2: *Hemizona indeksinin(HZI) farklı cut-off değerlerive IUI tedavisinde konsepsiyon için olan pozitif ve negatif tahmin değerleri*

Tablo 14.2: *Farklı sperm parametreleri ve erkek faktörü olarak tanımlanan ve IUI tedavisi alan hastalarda gebelikle sonuçlanmasının lojistik regrasyon analiz sonuçları*

	r[t]	p değeri
Morfoloji	0.19	0.07
konsantrasyon	0.00	0.27
Motilite	0.00	0.99
Hızı	0.30	0.02*

[t] parsiyel katılım; * statistiksel anlamlı; HZI, hemizona indeksi

Prospektif yapılan bir çalışmada Ombelet ve arkadaşları farklı sperm parametreleri için normal değerleri tanımlamak için fertil ve subfertil popülasyonları karşılaştırdı. Semen analizleri sperm morfolojisi dışında WHO guideline'larına göre yapıldı. Tek ve birleşik sperm parametreleri için cut-off değerleri ve tanı potansiyelini belirlemek için yazarlar ROC eğri analizini kullandı. Sperm morfolojisi %78 değeri ile (ROC eğrisi altında kalan alan) en iyi skoru gösterdi. İstatistik özetleri subfertil popülasyondaki birçok semen parametrelerinde anormalliğe kayma olduğunu gösterdi. Fertil popülasyonun %10'unu cut-off değer olarak kullanarak aşağıdaki sonuçlar elde edildi:14. 3x1000000/ml sperm konsantrasyonu, %25 ileri hareket ve %5 spem morfolojisi. ROC analizi kullanıldığında ise cut-off değerler sırasıyla 34X1000000/ml, %45 ve %10. Burada normalite için alınan cut-off değerleri WHO'nun son yayınladığı gaydlaynlardakinden farklıydı.

Ayrıca aynı erkekten alınan farklı ejakulatların sperm parametreleri arasında ve farklı hasta grupları arasında bilinen farklılıklar vardır. Bizim bilgilerimize göre spermin yapısal-biyokimyasal özelliği ve doğal konsepsiyon sonucu için sperm fonksiyon testi tahmin değerleri hakkında birçok veri vardır. Van der Merwe ve arkadaşları subfertil erkek tanımlaması için <%5 sperm morfolojisi, <15x100000/ml konsantrasyon ve <%30 motilite sınırları kullanılması gerektiğini savunur.

En düşük morfoloji treşoldu daha önceden hesaplanan IVF ve IUI datalarına uyuyor. Fakat doğal kontrasepsiyon için treşoldları (belirlenen süre zarfında yüksek oranda gebelik belirteci) HZA ve diğer fonksiyon testleri gibi sperm parametreleri için belirlenmeye ihtiyaç duyar.

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Yüksek negatif tahmin değeri ama daha da önemlisi düşük yalancı-negatif oranı (IVF'de yüksek oranda fertilizasyon riski ve IUI ile konsepsiyonda başarısızlık olan hastaları tanımlamadaki gücü) HZA'nın klinikteki tahmin kapasitesini azaltır.

Liu ve arkadaşları, bir çiftten alınan tüm veya çoğu oositin standart VF'de fertilize olmadığında bu fertilizasyon başarısızlığının major sebeplerinin; kötü sperm-zona bağlanmasıyla alakalı sperm defektleri veya bozulmuş zona pellusida -tetikli akrozom reaksiyonu ve bozulmuş sperm-zona pellusida penetrasonu olduğunu raporlamıştır. Bu yazarlar ayrıca oligozoospermisi (<20x1000000/ml) ve ciddi teratozoospermisi (katı normal sperm mor-

folojisine göre<%5) olan erkeklerde sperm-zona pellusida ilişkisinde yüksek oranda defekt olduğunu gösterdiler. Bu yazarlara göre sperm morfolojisi sperm-zona bağlanmasıyla ilişkilidir ve sperm konsantrasyonu >20x100000/ml olan infertil erkeklerde sperm konsantrasyonu zona pellusida-tetikli akrozom reaksiyonu ile koreledir. Yazarlar bozuk birzona pellusida-tetikli akrozom reaksiyonun idiopatik infertiliteyle birlikte erkeklerin %25ine kadar infertiliteye neden olabileceğini savunmuştur. Bu hastalarda hastaların normal standard semen analizi olsa da ICSIye ihtiyaç duyulur.

İndüklenmiş akrozom reaksiyon analizlerinin sperm-zona pellusida bağlanma testleri ile eşit düzeyde fertilizasyon sonucunu tahmin ettiği ve meodlarının daha basit olduğu görülüyor. Şu anda kalsiyum iyonofor kullanımı akrozom reaksiyonunu tetiklemede en çok kullanılan metod olsa da bu analiz fertilizasyon potansiyelini doğru yansıtmayan fizyolojik olmayan koşulları kullanıyor. Küçük volümlerde çözünebilir insan zona pellusida, biolojik aktif rekombinant insan ZP3 veya aktif sentetik ZP3 peptidleri kullanarak analizlerin yeni uyarlaması belki daha gelişmiş fizyolojik oryente akrozom reaksiyon analizlerinin düzenlenmesini sağlar.

Daha önceleri insan ZP3 geninin klonlanmasının, doğal materyal eksikliği olarak karşımıza çıkan engelden kaçınmayı sağladığına inanılıyordu ve böylece rekombinan proteinin devamlı sağlanması mümkün olabilecekti. Fakat bu iş için yapılan birçok labaratuvar çalışmalar genel olarak devamlı ve güvenilir olarak biolojik aktif bir ürün henüz arındıramadılar[5]. Bunun, muhtemelen proteinin kullanılan farklı hücre dizileri ile yetersiz ve heterojen glikozilasyonundan dolayı meydana geldiği açıkça görülüyor. Biolojik aktivitelerin tüm spektrumunu gösterdiği görülen bir insan rekombinant ZP3 tanımlayıp arıtabildiysek de sabit fiksasyon, protein depolama ve bioaktivitenin devamının sağlanması gibi problemler bu konuda ilerlemeyi engelledi.

Franken ve arkadaşları kullanımı kolay ve hızlı olan bir mikroanaliz icat ettiler ve bu analiz insan akrozom reaksiyonunun sağlanması için minimal hacimlerde çözünmüş zona pellusida (hatta tek bir zona) kullanımını destekler. Bu mikroanaliz standart makroanalizler ile değerlendirildi ve daha sonra homolog zona pellusida tarafından akrozomal ekzositozu fizyolojik tetiklenmesini test etmede eşsiz bir arena istediği görüldü. Ayrıca mikroanalizin kullanıldığı ilk klinik çalışmalar, zona tetikli akrozomreaksiyonunun (ZIAR) IVF çalışmalarında fertilizasyon başarısızlığını tahmin edebileceğini gösterdi. Bu ZIAR mikro analiz testi tedaviye başlamadan önce erkek infertiliteye yaklaşımı geliştiriryor. Bastiaan ve arkadaşları bu mikroanalizi kullanarak sperm morfolojisi ve akrozomun çözülmüş zona pellusidaya afinitesinin, sperm zona bağlanma potansiyelinin (HZA) ve IVF sonucu arasındaki ilişkiyi prospektif olarak değerlendirdi. ROC eğri analizleri IVF tedavisi sırasında ZIARın fertilizasyon başarısızlığında %81 sensitivite ve %75 spesifisite ile güçlü bir indikatör olduğunu belirlemiştir.

Sperm fonksiyon testleri çiftleri yardımcı üreme tekniklerine (ART) yönlendirmede en yüksek değere sahiptir. ARTye en çok aşağıdaki nedenlerden dolayı başvurulur: (1) infertil erkekte (eğer endikasyonu varsa) medikal/ürolojik tedavilerin başarısızlığı; (2) çift açıklanamamış infertilite tanısı almışsa; (3) orta veya yüksek derecede temel sperm anomaliliklernin mevcut olması veya (4) tamin edici analizlerle (HZA veya ZIAR)sperm fonksiyon anomalilikleri.

Tipik olarak aşağıdaki durumlarda hastalar ICSI için seçilir: (1) kötü sperm parametreleri (ayrımdan sonra yeterli ileri harekete sahip<1. 5x1000000 total sperm sayısı ve/veya sınırda-düşük total hareket fraksiyonu varlığında <%4den daha az normal form içeren ciddi teratozoospermi); (2) HZI'nın<%30 ve/veya düşük ZIAR ile birlikte kötü sperm-zona pellusida bağlanma kapasitesi;(3) antisperm antikor varlığını da içeren anormal sperm parametreleriyle başvuran vakalarda IUI tedavisinde başarısızlık; (4) daha önce IVFde başarısızlık olan vakalar ve (5) ICSI'nin testis veya epididimden elde edilen sperm ile birleştirildiği obstrüktif veya obstrüktif olmayan azospermi varlığında[51,93-95]. Ciddi oligoastenozoospermi varlığında veya eğer sperm fonksiyon test sonuçları spermin fertilize etme kapasitasyonunda önemli bir bozukluk gösteriyorsa çiftler hemen ICSI'ye yönlendirilmelidir. Bu yaklaşım daha costefektiftir ve >35 yaş bayanlarda değerli olan zamanın kaybolmasını önleyecektir.

Hem in vivo hem de in vitro gebelik sonucu tahmini için kullanışlı olabilecek daha basit sperm fonksiyon analizlerini geliştirmek için daha çok çalışma yapılmalıdır. Moleküler biyoloji metodlarında ve yeni bioteknolojilerdeki gelişmelerin bu amaca ulaşmaya yardımcı olacağı bekleniyor.

KAYNAKLAR

1. Braude P, Bolcon V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplanratioa development. Nature 1988; 332: 459
2. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In Knobil N, Neill JD, eds. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994: 189
3. Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylarion during sperm capacitation. Biol Reprod 1998; 59: 1
4. Macek MB, Shur BD. Protein-carbohydrate complementarity in mammalian gamete recognition. Gamete Res 1988; 20: 93
5. Chapman NR, Barratt CLR. The role of carbohydrate in sperm-ZP3 adhesion. Mol Hum Reprod 1996; 2: 767
6. Oehninger S. Molecular basis of human sperm-zona pellusida interaction. Cells Tissues Organs 2001; 168:58
7. Bleil JD, Wassarman PM. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellusidae possessing receptor activity for sperm. Cell 1980; 20: 873
8. Bleil JD, Wassarman PM. Sperm—egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellusida glycoprotein. DevBiol 1983; 95: 317
9. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. Cell 1999; 96: 175
10. Wassarman PM, Litscher ES. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. Cells Tissues Organs 2001; 168: 36
11. Wassarman PM. Profile of a mammalian sperm receptor. Development 1990; 108: 1
12. Wassarman PM. Regulation of mammalian fertilization by zona pellusida glycoproteins. J Reprod Fertil 1990; 42: 79
13. Hinsch E, Oehninger S, Hinsch K. ZP3-6 peptide and acrosome reaction. Semen evaluation, testing and selection: a new look in the 2000s. Presented at the Andrology in the Nineties Precongress Training Course, Genk, Belgium, 1998, 25
14. Leyton L, Saling P. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as ryrosine kinase substrates in response to zona binding. Cell 1989; 57: 1123
15. Leyton L, Saling R Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. J Cell Biol 1989; 108: 2163
16. Bleil JD, Wassarman PM. Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffmity crosslinking. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 5563
17. Cornwall GA, Tulsiani DR, Orgebin-Crist MC. Inhibition of the mouse sperm surface alpha-D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. Biol Reprod 1991; 44: 913
18. Miller DJ, Macek MB, Shur BD. Complementarity between sperm surface beta-l,4-galactosyitransfcrase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. Nature 1992; 357: 589
19. Kopf GS. Zona pellusida-mediated signal transduction in mammalian spermatozoa. J Reprod Fertil 1990; 42: 33
20. Patankar MS, et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. J Biol Chem 1993:268:21770
21. Oehninger S. Biochemical and functional characterization of the human zona pellusida. Reprod Biomed Online 2002; 7: 641
22. Clark GF, et al. The species recognition system: a new corollary for the human fetoembryonic defense system hypothesis. Cells Tissues Organs 2001; 168: 113
23. Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. Mouse zona pellusida genes and glycoproteins. Cytogenet Genome Res 2004; 105: 228
24. Rankin TL, et al. Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. Development 1998; 125: 2415
25. Rankin TL, et al. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. Dev Cell 2003; 5: 33
26. Castle PE, Dean J. Manipulating the genome to study reproduction. Mice with 'humanized' zonae pellusidae, Hum Reprod 1999; 14: 1927
27. Hoodbhoy T, Dean J. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. Reproduction 2004; 127: 417
28. Fissore RA, Reis MM, Palermo GD. Isolation of the Ca2+ releasing component(s) of mammalian sperm extracts: the search continues. Mol Hum Reprod 1999; 5: 189
29. Thibault C, Gerard M, Menezo Y. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. J Reprod Fertil 1975; 45: 605
30. Oehninger S, et al. Failure of fertilization in in vitro fertilization: the 'occult' male factor. J In Vitro Pert Embryo Transf 1988; 5: 181
31. Oehninger S, et al. Prediction of fertilization in vicro with human gametes: is there a litmus test? Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 1760
32. Ein DY, et al. A sperm-zona pellusida binding test and in vitro fertilization. Fertil Steril 1989; 52: 281
33. Fraser E, et al. Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. ESHRE Andrology Special Interest Group. Hum Reprod 1997; 12: 873
34. Franken DR, Morales PJ, Habenicht UF. Inhibition of G protein in human sperm and its influence on acrosome reaction and zona pellusida binding. Fertil Steril 1996; 66: 1009
35. Huszar G, Vigue E. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured

by creatine kinase activity in human spermatozoa. J Androl 1994; 15:71
36. Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. Dev Biol 1994; 165:299
37. Baccetti B, Collodel G, Piomboni E Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). J Submicrosc Cytol Pathol 1996; 28: 587
38. Baccetti B, et al. Recent advances in human sperm pathology. Contraception 2002; 65: 283
39. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane transloca-tion of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15: 1338
40. Marchetti C, et al. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. Hum Reprod 2002; 17: 1257
41. Oehninger S, et al. Presence and. significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. Reprod Biomed Online 2003; 7: 469
42. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. Reprod Fertil Dev 2004; 16: 581
43. Huszar G, et al. Semen characteristics after overnight shipping: preservation of sperm concentrations, HspA2 ratios, CK activity, cytoplasmic retention, chromatin' maturity, DNA integrity, and sperm shape. J Androl 2004; 25: 593
44. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Bioi Reprod 1976; 15: 471
45. Cross NL, et al. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res 1986; 15:213
46. Burkman LJ, et al.Thc hcmizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellusida to predict fertilization potential. Fertil Steril 1988; 49: 688
47. Liu DY, et al. A human spcrm-zona pellusida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. Fertil Steril 1988; 50: 782
48. Mortimer D. Objective analysis of sperm motility and kinematics. In Keel BA, Webster BW, eds. Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. Boca Raton: CRC Press, 1990: 97
49. Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR. Combined use of fluorescent peanut agglutinin lectin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa. Hum Reprod 1990; 5:99
50. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1992: 23
51. Oehninger S, et al. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. Hum Reprod Update 2000; 6: 160
52. Hodgen GD, et al. The hemizona assay (HZA): finding sperm that have the 'right stuff'. J In Vitro Pert Embryo Transf 1988; 5: 311
53. Franken DR, et al. Hemizona assay using salt-stored human oocyres: evaluation of zona pellusida capacity for binding human spermatozoa. Gamete Res 1989; 22: 15
54. Franken OR, et al. Defining the valid hemizona assay: accounting for binding variability within zonae pellusidae and within semen samples from fertile males. Fertil Steril 1991; 56: 1156
55. Franken DR, et al. Comparison of sperm binding potential of uninseminated, inseminated-unfertllized, and fertilized-noncleaved human oocytes under hemizona assay conditions. Mol Rcprod Dev 1991; 30: 56
56. Oehninger S, Acosta AA, Veeck L. Recurrent failure of in vitro fertilization: role of the hemizona assay (HZA) in the sequential diagnosis of specific sperm/oocyte defects. Am J Obstet Gynecol 1991; 164:1210
57. Oehninger S, et al. Human preovulatory oocytes have a higher sperm-binding ability than immature oocytes under hemizona assay conditions: evidence supporting the concept of 'zona maturation'. Fertil Steril 1991; 55: 1165
58. Overstreet JW, Hembree WC. Penetrarion of the zona pellusida of nonliving human oocytes by human spermatozoa in vitro. Fertil Steril 1976; 27: 815
59. Yanagimachi R, et al. Retention of biologic characteristics of zona pellusida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. Fertil Steril 1979; 31:562
60. Yoshimatsu N, Yanagimachi R. Zonae pellusidae of salt-stored hamster and human eggs: their penetrability by homologous and heterologous spermatozoa. Gamete Res 1988; 21: 115
61. Kruger TF, et al. Hemizona assay: use of fresh versus salt-stored human oocytes to evaluate sperm binding potential to the zona pellusida. J In Vitro Pert Embryo Transf 1991; 8: 154
62. Coddington CC, et al. Sperm bound to zona pellucida in hemizona assay demonstrate acrosome reaction when stained with T-6 antibody. Fertil Steril 1990; 54:504
63. Coddington CC, et al. Functional aspects of human sperm binding to the zona pellusida using the hemizona assay. J Androl 1991; 12: 1
64. Oehninger S, et al. The specificity of human spermatozoa/zona pellusida interaction under hemizona assay conditions. Mol Reprod Dev 1993; 35: 57
65. Franken DR, et al. The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in in vitro

fertilization (IVF) treatment. J In Vitro Fert Embryo Transf 1989; 6: 44
66. Oehninger S, et al. Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 1989; 51: 665
67. Oehninger S, et al. Clinical significance of human sperm-zona pellusida binding. Fertil Steril 1997; 67: 1121
68. Franken D, et al. The ability of the hemizona assay to predict human fertilization in vitro in different and consecutive IVF/GIFT cycles. Hum Reprod 1993; 8: 1240
69. Gamzu R, et al. The hemizona assay is of good prognostic value for the ability of sperm to fertilize oocytes in vitro. Fertil Steril 1994; 62: 1056
70. Oehninger S, Franken D, KrugerT. Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? Fertil Steril 1997; 67: 434
71. Duran HE, et al. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. Hum Reprod Update 2002; 8: 373
72. Marin-Briggiler CI, et al. Effect of antisperm antibodies present in human follicular fluid upon the acrosome reaction and sperm-zona pellusida interaction. Am J Reprod Immunol 2003; 50: 209
73. Munuce MJ, et al. Modulation of human sperm function by peritoneal fluid. Fertil Steril 2003; 80: 939
74. Coddington CC, et at. Hemizona index (HZI) demonstrates excellent predictability when evaluating sperm fertilizing capacity in in vitro, fertilization patients. JAndrol 1994; 15:250
75. Ford WC. Prediction of fecundability from semen analysis: problems in providing an accurate prognosis. Hum Fertil 1999; 2: 25
76. Ombelet W, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. Hum Reprod 1997; 12:987
77. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999: 14
78. van der Merwe FH, et al. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. Gynecol Obstet Invest 2004; 59: 86
79. Liu de Y, Garrett C, Baker HW Clinical application of sperm—oocyte interaction tests in in vitro fertilization-embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. Fertil Steril 2004; 82: 1251
80. Liu DY, Baker HWG. Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellusida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona penetration and reduced fertilization in vitro. Hum Reprod 1994; 9: 1694
81. Liu DY, Baker HW. Defective sperm-zona pellusida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. Hum Reprod 2000; 15: 702
82. Liu de Y, Baker HW. Frequency of defective sperm-zona pellusida interaction in severely teratozoospcrmic infertile men. Hum Reprod 2003; 18: 802
83. Liu de Y, Baker HW. High frequency of defective sperm-zona pellusida interaction in otigozoospermic infertile men. Hum Reprod 2004; 19: 228
84. Tesarik J. Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon Hum Reprod 1989; 4: 957
85. Cummins J, et al. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. J Androl 1991; 12:98
86. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger S. Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellusida. J Assist Reprod Genet 2000; 17: 374
87. van Duin M, Polman J, De Breet IT. Rccombinant human zona pellusida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm—egg fusion. Biol Reprod 1994; 51: 607
88. Dong KW, et al. Characterization of the biological activities of a recombinant human zona pellusida protein 3 (ZP3) expressed in human ovarian (PA-1) cells. Am J Obstet Gynecol 2001; 184: 835
89. Esterhuizen AD, et al. Clinical importance of a microassay for the evaluation of sperm acrosome reaction using homologous zona pellusida. Andrologia2001;33:87
90. Esterhuizen AD, et al. Clinical importance of zona pellusida induced acrosome reaction (ZIAR test) in cases of failed human fertilization. Hum Reprod 2001; 16: 136
91. Bastiaan HS, ct al. Zona pellusida induced acrosome reaction, sperm morphology, and sperm—zona pellusida binding assessments among subfertile men. J Assist Reprod Genet 2002; 19: 329
92. Bastiaan HS, et al. Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellusida binding, and in vitro fertilization. Fertil Steril 2003; 79: 49
93. Oehninger S. Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status. J Androl 2000; 21: 814
94. Oehninger S. Place of intracytoplasmic sperm injection in clinical management of male infertility. Lancec 2001; 357: 2068
95. Oehninger S, Gosden RG. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? No, not in light of the scientific data. Hum Reprod 2002; 17: 2237
96. Monz6 A, et al. Outcome of ICSI in azoospermic patients: stressing the liaison between the urologist and reproductive medicine. Urology 2001; 58: 69

15

Spermdeki DNA Hasarının Saptanması

Ralf Henkel

Çeviri: *Cabir Alan*[*], *Emre Ulukaradağ*[**]

GİRİŞ

Spermdeki DNA hasarı doğal konsepsiyon sonrası ve intrauterin inseminasyon (IUI), invitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) adı verilen farklı yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) kullanımını takiben fertilizasyonun ve gebeliğin belirleyicisidir[1-12]. Bunun kullanılan yardımcı üreme teknikleri için önemli bir anlamı vardır çünkü ne kadar invaziv bir teknik kullanılırsa oosite transfer edilen ve oositi invitro fertilize eden erkek genomunun genetik hasarlanma ihtimali de o kadar fazla olacaktır[10,13].

Normalde eğer erkek germ hücresindeki hasar ciddi ise, embriyonik gelişim paternal genom açıldığında durur ve başarısız hamilelikle sonuçlanır. Bununla birlikte genetik ve biyolojik korunma mekanizmaları ileri embriyonik gelişimi mutlak engellemezler. Ahmadi ve Ng hasarlı spermatozoayla döllenme ile canlı doğan fare yavruları elde edilebileceğini göstermişlerdir[14]. Bu çalışma aynı zamanda sitozolik sperm faktörünün oosite enjeksiyonunun oosit aktivasyonunda anahtar nokta olduğunu da göstermiştir. Semen kalitesi düşük olan hastalarda DNA kırık oranı anlamlı olarak yüksektir ve DNA hasarı ICSI için enjekte edilecek spermatozoa seçiminde belirlenemez, ICSI'de defektif spermatozoa kullanım ihtimali yüksek olur, bu da hasarlı DNA'nın oosite transferi riskini arttırır. Ek olarak, artmış kromozomal anomalinin, minör veya majör doğumsal defektler veya çocukluk çağı kanserlerinde ICSI sonrası doğan bebekler için riski artırmış olabileceğini belirtmiş ve bu teknikle ilgili ciddi tartışmalara yol açmıştır[15-20].

Bu ciddi nedenlerden ötürü farklı gruplardan pek çok bilim adamı DNA bütünlüğünün ve hasarının test edilmesini, rutin androlojik laboratuar çalışmalarıyla ortaya konulmasını önermişlerdir[21-25]. Motilite gibi diğer sperm parametreleriyle karşılaştırıldığında, Zini ve arkadaşları düşük biyolojik çeşitliliği nedeniyle sperm DNA kırıklarının saptanmasının kısmen güvenilir bir analiz yöntemi olduğunu dikkate almışlardır[26]. Geçmişte, değişik düzey ve yerlerdeki sperm DNA hasarının saptanması için perkçok test sistemi geliştirilmiştir. Bunların doğrultusunda, kromozomal sapmaların tespiti için multikolor floresans insitu hibridizasyon (FISH) veya sperm DNA'sının yapısal bütünlüğünü saptayan akım sitometrisi kullanılarak sperm kromatin striktür analizini (SCSA) içeren bazı ileri derece sofistike tahliller yapılmıştır. Sperm nükleer matürasyonu ve kondansasyonu için anilin mavisi boyaması gibi diğer test sistemleri daha basit ve teknisyen tarafından yıkanmış sperm örneklerinin araştırılmasında temel alınır.

Bu tahlillerin pek çoğunun fertilizasyon ve hamilelikte belirleyici olduğu belirtiliyorken, bu bölüm bugünkü kullanılan tahlillerin anlaşılmasına katkıda bulunacak, böylelikle her birinin sonucu daha iyi değerlendirilebilecektir. Üstelik, androloji

[*] Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Çanakkale.
[**] İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Bolu.

laboratuarlarının finansal durumlarının değişiklik gösterdiği göz önüne alındığında bir taraftan androlojik tanı için hangi test önerildiğinde daha efektif sonuç alınabileceği diğer taraftan da yardımcı üreme tekniğini takiben alınacak en iyi sonuç ön görülmüş olur. Bu bölümde karşılaştırılan test sistemlerinin sonucu, kısa tanımlamaları, ana avantaj ve dezavantajları tablo 15.1'de gösterilmiştir.

DNA HASAR / KIRIKLARINI DEĞERLENDİREN TEST SİSTEMLERİ

Sperm DNA hasarı farklı düzeylerde oluşabilir; örneğin 1) apopitoz, oksidatif stres veya radyasyona bağlı olarak DNA zincirinde kırıklar gibi direkt hasarlar 2) kromatin kondensasyonu ve paketlenmesi sırasında immatür nükleer kondansasyon oluşması veya 3) kromozomal sapmalar veya anöploidiler gibi kromozomal düzeydeki hasarlar. Tüm bu düzeylerin her biri erkek genetik bilgisinin ve kromatin kondansasyonunun geçişi sırasında önem taşır. Hasarlanan bölgelerin fertilizasyon ve gebelik oluşumu üzerine ciddi etkileri olabilir. Bu nedenle, hasarların tespiti için bazı metodlar geliştirilmiştir. Bu tahlillerden bazıları YÜT programına yönelik erkek infertilitesindeki tanısal değerlerine yönelik incelenmişlerdir.

Direkt DNA hasarı temel modifikasyonlarda veya tek ve/veya çift zincir kırıklarında ortaya çıkabilir. Temel modifikasyonlar; DNA oksidatif hasarının 20 major biyomarkerlarından biri olan, tanımlayıcı, büyük oranda spesifik ve olasılıkla mutajenik ürün olan 8-hidroksideoksiguanozin ölçümü aracılığıyla belirlenebilir. DNA zincir kırıkları genellikle komet (tek hücre jel elktroforezi) analizi, TUNEL (terminal deoksinükleotid transferaz aracılıklı dUTP işaretlemesi) analizi, insitu translasyon, akridin oranj zincir testinde metakromatik akridin oranj floresans kayması veya sperm kromatin yapısı analizi ile ölçülür.

8-hidroksideoksiguanozin ölçümü

8-hidroksideoksiguanozin DNA'nın substansiyel oksidatif modifikasyonu ile oluşur ve insan spermatozoa DNA'sında her 100000 deoksiguanozin molekülünde 2-4 düzeyde görülür[27-29]. Genomik DNA'da yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC), elektrokimyasal veya gaz kromatografi-kütle spektrometrisi ile ölçülebilir. Bu testin yapımında insan sperminden enzimatik parçalanma ve HPLC analizi aracılığı ile saptanmayı takiben elde edilen DNA kullanılır. Metod yeterli 8-OHdG eldesine dayandığı için, HPLC'nin DNA parçalama ve saptama kalitesinin sınırlı olması nedeniyle rölatif olarak yüksek sayıda spermatozoa gereklidir[30].

Çok sayıda çalışmada sigara içenlerin spermatozoasında içmeyenlere oranla yoğun oksidatif DNA hasarına bağlı olarak; 8-OHdG belirgin olarak yüksek gösterilmiştir. Diğer taraftan, vitamin C gibi antioksidanların alımı ve bunların seminal plazmadaki konsantrasyonu bu oksidatif hasra karşı korunma sağlar[9,31]. Yüksek miktarlardaki 8-OHdG aynı zamanda erkek infertilitesi ile de ilişkilendirilmiştir[32-34]. Eğer bu DNA hasarı tamir edilmezse, 8-OHdG mutajenik olabilir ve embriyonun kaybına, malformasyonlara veya çocukluk çağı kanserlerine neden olabilir[3,28]. Buna rağmen bu test yüksek spesivitesi ve sperm fonksiyonları ile korelasyon göstermesi nedeniyle belirgin klinik önem gösterir[30,35,36]. Metod özel ekipman gerektirdiğinden yaygın olarak kullanılmamaktadır. Üstelik deoksiguanozinin oksidasyonu oluşabilir ve doğru olmayan sonuçlara neden olabilir.

Comet analizi

Tek hücre jel elektroforezi veya Comet analizi somatik hücrelerdeki tek ve çift zincir kırıklarını içeren DNA bütünlüğünü değerlendirmek için geliştirilmiştir[37]. 1988'de Singh ve arkadaşları bu metodun mofike formunda DNA tek zincir kırıklarını, alkali hassas bölgeleri, DNA-DNA/ DNA-protein çapraz bağlanmalarını ve inkomplet eksizyon tamir bölgeleri ile ilişkili tek zincir kırıkları saptamaya elverişli ve testin sensitivitesini arttıran pH>13 alkali ortamlar kullanmışlardır[38]. O zamandan beri, uygulamaların aralığı ve kullanıcıların sayısı artmıştır. Bu analizde, sağlam süpersarmal bütün DNA nukleus içinde kalırken DNA zincir kırıkları agaroz jel içine göç eder ve hasarlı DNA miktarına bağlı olarak büyük veya küçük kuyruk oluştururlar. Bunlar DNA spesifik boyamalar aracılığıyla görülebilir hale gelir[39]. Şekil bir kuyruklu yıldıza benzediğinden metodun ismi buradan gelir. Comet analizinin değerlendirilmesinde kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA oranı veya bu iki parametrenin ürünü, kuyruk hareketi göz önüne alınır.

Tablo 15.1: *Sperm DNA hasarı ve kromozomal aberasyonların saptanmasında kullanılan en önemli testlerin prensip, avantaj ve dezavantajları*

Analiz tipi	*Analiz*	*Test Prensibi*	*Avantajları*	*Dezavantajları*
DNA hasarı	8 Hidroksideoksiguanozin ölçümü	Baz modifikasyonlar	Klinik olarak anlamlı Yüksek spesivite Kantitatif Sperm fonksiyonu ile korele	Özel ekipman Deokssiguanozinin artefaktüel oksidasyonu Fazla örnek gereksinimi
	Comet analizi	DNA fragmantasyonu, tek ve çift zincir kırıkları	Uygulaması kolay ve ucuz TUNEL testi ile korele Yüksek sensitivite Tek hücrenin araştırılması Az sayıda hücre gereksinimi Fertilite ile korele	Floresan mikroskobu Tecrübe gereksinimi Oksidatif hasara spesifik değil
	TUNEL testi	DNA fragmantasyonu, tek ve çift zincir kırıkları	Klinik olarak anlamlı Yüksek sensitivite ve spesivitesperm fonksiyonu ve fertilite ile korele	
			TUNEL testi ile korele Tek zincir DNA kırıklarına spesifik	Oksidatif hasara spesifik değil Daha maliyetli Özel ekipman
	İn situ nick translasyonu	Tek zincir DNA kırıkları	Endojen DNA kırıklarına spesifik Uygulaması kolay Düşük maliyet Sperm fnksiyonu ve fertilite ile korele	Oksidatif hasara spesifik değil Özel ekipman
	Akridin oranj testi	Tek ve çift zincir DNA ve RNA ayrımı Nükleer DNA'nın denatürasyondan kolaylıkla etkilenmesi	Klinik olarak anlamlı Yüksek sensitivite ve spesivite Flow sitometri ile çok sayıda sperm sayılması DNA'ya bağlı akridinoranjın tarafsız kantitatif değerlendirilmesi	Farklı işaretli spermler arasında ayrım her zaman kolay değil Özel ekipman
	Sperm kromatin yapı analizi (SCSA)			Özel ekipman Daha maliyetli
DNA kondensasyonu/ paketlenmesi	Anilin mavisi boyası	lmış histonlardaki rezidü lizinlerin boyanması	Klinik olarak anlamlı Yüksek spesivite ve sensitivite Düşük maliyet IVFdeki fertilite ile korele Uygulanması kolay Akridin oranj boyası, TUNEL testi ve anilin mavisiboyası ile korele Uygulaması kolay	Diğer sperm parametreleri ile ters korelasyon
Kromozomal aberasyon ve anöploidi	Toluidin mavisi boyası	Hasarlı kromatine bağlanma	Klinik olarak anlamlı Yüksek spesivite ve sensitivite IVF ve ICSI'deki fertilite ile korele	Klinik önemi henüz kanıtlanmamış Subjektif değerlendirme nedeniyle tutarsız
	Kromomisin A3 boyası	Protaminlerle aynı DNA bağlanma noktaları için yarışma Kromozomal anormalliklerin saptanması	Klinik olarak anlamlı Yüksek spesivite ve sensitivite Fertilite, sperm hastalıkları ve hamilelikle korele	Subjektif değerlendirme nedeniyle tutarsız Yoğun uğraş gerektirmesi Pahalı Özel ekipman

Pek çok çalışmada Comet analizi ile erkek infertilitesi ve sperm fonksiyonu arasında klinik ilişki gösterilmiştir[40-43]. Her ne kadar IVF ve ICSI'nin her ikisinde fertilizasyon ve embriyo gelişimi için belirgin değeri gösterilmiş olsa da DNA hasarının kaynağı belirsizdir[7,44,45]. Spermatogenezis esnasındaki apopitozis, uygunsuz DNA paketlenmesi ve ligasyonu veya oksidatif stresi içeren nedenler tartışılmaktadır. Sonuncusu için iki farklı kaynak, lökositler tarafından veya spermatozoanın kendisi tarfından üretilen reaktif oksijen radikalleri olası görülmektedir. İlginç olarak erkek üreme kanalında normalde bulunan reaktif oksijen radikalleri bu DNA hasarını indükleyebilir[47]. Üstelik DNA hasarının toksinlere maruziyeti, kemoterapi ve radyasyonu takiben arttığı bildirilmiştir[48-51]. Ne yazık ki günümüzde bu testi uygulamada ve değerlendirmede standart bir protokol yoktur. Dolayısıyla değişik gruplardan elde edilen sonuçları karşılaştırmak zordur. Her ne kadar bazı otörler kuyruklu yıldız oluşturan sperm oranını hesaplarken diğerleri verilen sperm populasyonundaki ortalama kuyruk uzunluğunu bildirmişlerdir[40,52,53]. Diğer taraftan, testin uygulaması kolaydır, DNA zincir kırıklarını ölçmek için kullanılabilen en sensitif tekniklerden biridir ve TUNEL test sonuçları ile çok iyi korelasyon gösterir[54].

TUNEL testi

Kırılmış sperm DNA'sına spesifik diğer bir test TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick-end labeling) testidir[55]. Prensibi; işaretlenmiş terminal deosinükleotit transferaz (TdT) kullanarak enzimatik olarak katalizlenmiş reaksiyon aracılığı ile tek ve çift zincir DNA kırıklarındaki DNA prekürsörlerinin (dUTP: deosiüridin trifosfat) gösterilmesidir. Bu zincir kırık sayısını arttırarak biotinile veya flouresans edilmiş dUTP ile DNA'nın 3 '-OH ucunu birleştirir. Diğer metotlarla DNA hasarının tespitine yönelik olarak karşılaştırıldığında TUNEL testi daha karmaşık, daha pahalı ve daha zaman alıcıdır. Bununla birlikte araştırma içi ve araştırmalar arası farlılıkların azlığı da gösterilmiştir[56]. Ek olarak, geniş hücre gruplarını değerlendiren, sperm örneklerinin flow sitometrik ölçümü mümkündür.

Yüksek spesifite ve tekrarlanabilirliği sperm DNA fragmantasyonunun araştırılmasında TUNEL testinin en sık kullanılan test sistemlerinden biri olmasını sağlar. Fertilizasyon ve gebelikle olduğu kadar sperm fonksiyonu ile ilgisi de tekrar kanıtlanmıştır[4,5,8,57,58,59,60]. Sperm DNA fragmantasyonu, erken embriyo ölümü ve tekrarlayan düşüklerin nedenini açıklar[61,62]. Üstelik Shoukir ve ark. IVF'le karşılaştırıldığında ICSI'den sonra anlamlı olarak düşük blastosist oluşum oranı bulmuş ve embriyonik gelişim preimplantasyonu üzerine negatif paternal etkisini göstermişlerdir[63]. TUNEL testi apopitozisin geç döneminden çok DNA fragmantasyonunu gösterir ve apopitotik ve nekrotik hücreler arasında ayrım yapamaz[64,65]. Sakkas ve ark. sperm plazma membranındaki asimetrik fosfotidil serin dağılımı gibi apopitotik belirteçler ve TUNEL pozitifliğinin her zaman uyumlu olmadığını bulmuşlardır[66].

İn situ nick translasyonu

Tek ve çift zincir DNA kırıklarını tespit eden TUNEL testinin aksine, bu test sadece tek zincir DNA kırıklarını tespit eder. Bu test DNA polimeraz I aracılı enzimatik reaksiyonla elde edilen tek zincir DNA'nın 3'-OH ucundaki işaretlenmiş (biotinile veya flouresans edilmiş) dUTP miktarını ölçer. İn situ nick translasyonu ile işaretleme DNA'daki endojen nicklerin saptanmasını sağlar[67,68]. Her iki teknikle (in situ nick translasyon ve TUNEL testi) insan spermatozoasından toplanan bilgiler yüksek oranda korelasyon gösterir[69]. TUNEL testi apopitozisi daha iyi gösterirken, somatik hücrelerde nekrotik nükleuslar in situ nick translasyonu ile boyanarak görünür hale getirilir[70]. Bununla birlikte, spermatozoa somatik hücrelerdeki apopitozisin tipik morfolojik karakteristik değişikliklerini göstermiyorken ek olarak apopitoz ve nekrozun açıkça ayrımı için apopitozun diğer markerları olan fosfatidilserin eksternalizasyonu, Fas ekspresyon veya diğer aktif proapopitotik faktörler uygulanabilir.

Akridin oranj testi

Tejada ve arkadaşları tarafından uygulanmış insan sperm kromatin heterojenite testinin bir versiyonudur[71,72]. Bu test sperm nüklear DNA'sının akridin oranjın metakromatik özelliği aracılığıyla asitle oluşturulan denatürasyona dayanıklılığını ölçer. Bu boya DNA'ya monomermiş gibi eklenerek çift zincir DNA ile yeşil refle verir ve tek zincirli DNA'ya veya RNA'ya eksitasyon sonrası kırmızı-turuncu ışık yayarak bağlanır[73].

Basitliğine ek olarak, pek çok çalışma grubu akridin oranj testini farklı sperm fonksiyonel para-

metreleri ile korele bulmuştur. İbrahim ve Pedersen akridin oranj testi ile sperm motilitesi ve sperm penetrasyon testindeki zonasız hamster oosit penetrasyonu arasında anlamlı korelasyon saptayamamıştır[74]. Diğerleri IVF ve ICSI kullanılan yardımcı üreme tekniklerindeki motilite, sperm sayısı, sperm-zona pellusida bağlanması ve fertilizasyonla anlamlı korelasyon bulmuşlardır[72,75-79].

Bu akridin oranj testinin klinik değerini gösteren pozitif bulgulara rağmen güvenilirliğine yönelik tartışmalar da doğmuştur. Bunlar temel olarak; 1) yeşilden kırmızı-turuncuya metakromatik geçiş için cam yüzeydeki boya absorbsiyonu gibi kötü koşullar ve 2) normal, yeşil ve anormal, kırmızı-turuncu, özellikle hem tek hem çift zincir DNA içeren sperm başı arasında ayrımın güçlüğüdür. Ayrıca floresansın hızla değişimi ve heterojen boyanma, testin uygulanması sırasında karşılaşılan ek problemlerdir[80,81]. Bu nedenle Evenson ve arkadaşları daha güvenilir olan sperm kromatin yapı analizini geliştirmişlerdir (SCSA)[53,71].

Sperm kromatin yapı analizi

Sperm kromatin yapı analizi akridin oranj testindeki akridin oranj renk metakromatik değişimi ile aynı prensip üzerine kurulmuştur. Bununla birlikte, farklı olarak SCSA'daki tespit akım sitometrisi ile yapılır. Bu yaklaşım örnek başına geniş oranda spermatozoa (örnek olarak 5000-10000) ölçümünü mümkün kılar. Bu da testi kolay ve yüksek oranda tekrarlanabilir kılar[82]. Üstelik, bu otomatize edilmiş okuma yöntemi akridin oranj testinde anlatılan teknik problemler kadar test içi ve testler arasında olan değişkenlikleri ortadan kaldırır. Sperm kromatin hasarının flow sitometrik saptanmasının test içi değişkenliği %5'den azdır (83). Tablo 15.1'de anlatılan avantaj ve sonuçlara ek olarak bu testin esnekliğinden de bahsetmek gerekir. Test taze ve donmuş örneklerle uygulanabilir. Bu da spesmen toplanmasını kolaylaştırır[22].

Pek çok çalışma SCSA'nın güvenilir ve erkek infertilitesi düzeyinin tanımlanmasında önemli olduğunu göstermiştir. Spermatozoa kromatin dengesizliği yüzdesinin (kırmızı-turuncu boyanmış sperm) %30'un üzerinde olduğu durum erkek infertilitesi ve gebelik için uygulanan IUI, IVF ve ICSI ile zayıf fertilizasyon için bir göstergedir[81,82,84-87]. Sperm DNA bütünlüğünün SCSA aracılığı ile ölçüldüğü göz önüne alındığında diğer sperm parametreleri ile karşılaştırıldığında uzun zaman periodunda daha stabil olduğu görülmektedir[83]. Bu test aynı zamanda epidemiyolojik çalışmalar için de uygun gözükmektedir[88].

SPERM DNA KONDENSASYONU / PAKETLENMESİNİ TEST EDEN SİSTEMLER

DNA'nın bütünlüğü ve kalitesinin direkt analiz edildiği test sistemleri bir yana, DNA paketlenmesi ve matürasyonunun incelendiği testler de geliştirilmiştir. Spermiogenez sırasında çok basamaklı bir süreçte protaminler tarafından yer değiştirilen, her somatik hücrede predominant olan nükleer proteinler; histonlar, spermatozoada önemli bir parçadır. Disülfid köprülü bu protaminler DNA'nın minör parçalarına uyan temel proteinlerdir. Fosfat gruplarının negatif yüklerini nötralize eder ve bu DNA'nın komşu zincirdeki majör parçasına uyum için lineer dizilim oluşturmasını sağlar. Bu, yoğunlaşmış sperm nükleusununda DNA'nın total volümün %90'dan fazlasını oluşturması ile sonuçlanır. Diğer taraftan, mitotik kromozomlardaki DNA yüzdesi %15 ve somatik hücrelerde %5 civarındadır[89].

Dengesiz kromatin dağılımında, histonlar sperm nükleusuna girerek spermatozoon oosite girdikten sonra erkek genomundaki dekondansasyon problemine neden olur. Bu nedenle spermiogenez sırasındaki esansiyel sperm maturasyon sürecinde anormallik göstereren bu hastalar subfertil ya da infertildirler[90-92]. Sperm kromatin dağılımının derecesinin değerlendirilmesine yönelik çeşitli metotlar gösterilmiş ve aşağıda ele alınmıştır.

Anilin mavi boyası

İmmatür, zayıf kromatin yoğunluklu sperm nükleusları lizinden zengin histonlar içerir. Asit-baz reaksiyonunda asidik anilin mavisi lizin rezidülerine bağlanır ve böylelikle lizinden zengin histonlar ve arjinin/sisteinden zengin protaminler arasında ayrım yapar. Bu test dengesiz kromatin dağılımlı spermatozoada pozitif mavi boyanmaya neden olur. Protamin içeren matür spermatozoalar boyanmayacaktır. Terquem ve Dadoune bu basit ve ucuz testi ilk olarak tanımlamışlardır[93]. Bununla birlikte testin uygulayan tarafından görsel değerlendirilmesi değerlendirmede kişisel farklılıklar ve tutarsızlıklara neden olabilir ve bu da tekrarlanabilirliğini tehlikeye atar. Diğer taraftan Franken ve arkadaşları test içi

değişkenlik oranını %10'un altında bularak tekrarlanabilir bir test olduğunu göstermişlerdir[94].

Dadoune ve ark. ve Auger ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre normal ejakulat en az %75 anilin mavisi negatif spermatozoa içerir, bu da normal kromatin dağılımını gösterir[95,96]. Bu bilgi fertilizasyonun oluşumu için normal kromatin dağılımının zorunlu olduğunu gösteren Haidl ve Schill ve Hammadeh tarafından da doğrulanmıştır[90,97]. IVF ve gebeliğe gelince, farklı grup çalışmalarında bu testin klinik anlamlılığı gösterilmiştir[97-100]. Androlojik araştırmalarda rutin semen analizinin bu testle yapılması önerilmiştir[100]. Bununla birlikte ICSI sonrası düşük fertilizasyon ve gebelik oranlarına neden olan sperm kromatin dağılım kalitesi halen tartışılmaktadır. Van Ranst ve arkadaşları ve Hammadeh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sırasında ICSI ile fertilizasyon tespitinde anilin mavisi boyası başarısız bulunmuştur[101,102]. Sakkas ve arkadaşları Kromomisin A3 (CMA3) boyası uygulandığında ejakülatta düşük paketlenmiş kromatinli spermatozoaları anlamlı şekilde yüksek oranda göstermişler ve IVF hastaları ile karşılaştırıldığında ICSI hastalarında fertilizasyon oranını yarıyarıya bulmuşlardır[103]. ICSI embriyolarının blastosist düzeyine ulaşmak için gelişme potansiyeli de anlamlı olarak düşüktür. Anilin mavisi ve CMA3 boyasının kullanıldığı karşılaştırmalı bir çalışmada Razavi ve arkadaşları CMA3 ile sadece sperm protamin hasarının saptanmasının ICSI sonucuna anlamlı etkisinin olduğunu bildirmişlerdir[104]. Bu düşük sperm kromatin dağılımının ICSI sonrası fertilizasyon başarısızlığına neden olabileceğini gösterir.

Toluidin mavisi boyası

Toluidin mavisi boyası sperm DNA yapısı ve paketlenmesinin değerlendirildiği, kromatinin metakromatik ve ortokromatik boyanabilirliğine dayanan bir diğer ucuz ve kolay bir testtir[105,106]. Toluidin mavisi temelde nükleer boyadır. Akridin oranj gibi somatik apopitotik hücrelerin asit tedavisi sonrasında bu boya açık maviden (normal sperm başında) mor-menekşe (parçalı DNA nukleusunda) renge değişim gösterir[106]. Erenpreisa ve arkadaşları DNA bütünlüğünün saptanması için bu yöntemi kullanmışlardır[107]. Kendileri toluidin mavisi, akridin oranj ve anilin mavisi boyaları arasında yüksek korelasyon ($r=0.63-0.70$; $p<0.01$) olduğunu göstermişler ve DNA bütünlüğünün in situ belirlenmesinde tekniğin yeterli derecede sensitif olduğu kanaatine varmışlardır. Ek olarak, mor-menekşe boyanma paterni ile TUNEL çalışması arasındaki anlamlı korelasyon da gösterilebilmektedir[108]. Daha önceki bir çalışmada Barrera ve arkadaşları fertil donörlerden alınan spermlerde genellikle ortokromatik açık mavi boyanma paterninin olduğunu, oligozoosperik hastalarda yüksek oranda metakromatik mor-mekşe boyanma paterninin gözlendiğini göstermişlerdir[109]. Maalesef doğrudan klinik anlamı henüz gösterilmemiştir. O nedenle akridin oranj testi ile yüksek korelasyonu ve bu test üzerine olan tecübeye güvenilebilir.

Kromomisin A3 boyası

Kromomisin A3 (CMA3) boyası DNA'nın protaminlerle doğrudan aynı bağlanma yeri için yarıştığı guanin-sitozin spesifik florokromdur. Anilin mavisi boyası gibi CMA3 boyası da zayıf yoğunluklu DNAnın belirlenmesinde kullanılır. CMA3 ile boyanan sperm başları zayıf protamin içerenlerdir. CMA3 ile boyanmayanlar normal kromatin dağılımı gösteren spermatozoalardır. Bu nedenle, bu boya spermatozoanın düşük protaminasyonu için indikatiftir[67,68]. Bizzaro ve arkadaşları som balığı protaminleri ile in situ protaminasyon sonrası müren ve insan spermatozoasında CMA3 pozitifliğinin azaldığını göstererek bunu doğrulamışlardır[110]. Dahası, bu araştırmacılar som balığı protaminlerinin ilavesinin artırılması sonrasında morfolojik değişikliklerin de olduğunu göstermişlerdir. Böylelikle tedavi sonrası deprotamine sperm başları orijinal dağılım görünümlerini geri kazanırlar.

Diğer sperm parametrelerine gelince, CMA3 boyası normal sperm morfolojisi ile anlamlı ve pozitif korelasyon gösterirken sperm sayısı ile negatif korelasyon gösterir[94,111,112]. Manicardi ve arkadaşları CMA3 pozitifliği ile sperm DNA'sındaki endojen nick varlığı arasında anlamlı birlikteliği göstermişlerdir[68]. Bu nickler normalde geç spermatogenez sırasında oluşup sperm kromatin paketlenmesi sırasında kaybolurken hasarlı spermiogenezde bu belirteç değişir[113,114]. Bu testle IVF sonrası aynı ICSIdeki gibi fertilizasyonun yüksek oranda saptanmasından sonra yardımcı üreme tekniği sonrası sonucun öngörülmesinde belirleyici olduğu gösterilmiştir[104,112,115-117]. Anilin mavisi ve akridin oranj testi ile karşılaştırıldığında sperm kromatin dağılımının tespitinde herhangi bir yardımcı üreme öncesindeki androlojik tanı programında uygulanması önerilir[117]. Fertilizasyonun saptanması için hesaplanmış cut-off değeri %30'dur (117). CMA3 negatif spermatozoa oranı en az %70'dir.

KROMOZOMAL ABERASYON VE ANÖPLOİDİNİN TESPİTİNDE KULLANILAN TESTLER

Sperm DNA'sına anormal genom paketlenmesi ve zincir kırıkları ile sonuçlanan direk hasar dışında, anöploidi veya yapısal kromozom reorganizasyonları içeren kromozomal aberasyonlar erkek infertilitesinin bir nedeni olarak saptanmıştır. Önceki çalışma infertil erkeklerde spermatozoadaki genetik hasarın arttığını ve anöploidinin tekrarlayan gebelik kayıpları olanlarda anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir[118-120]. Spermatozoadaki anöploidi ve diploidi; ejakülattaki sperm sayısı ve progresif hareketlilik ile negatif korelasyon gösterir, özellikle ICSI'de düşük kaygısını ve menideki kromozomal anormallikleri arttırır[43,121-124]. En sık gözlenen anöploidi sendromları: XXX, Klinefelter (XXY), Turner (XX veya XY yerine X), XYY, Patau (trizomi 13), Edward (trizomi 18) veya Down (trizomi 21)'dir. 11q kromozomu terminal delesyonu olan Jacobsen sendromu çok nadirdir. Cri Du Chat sendromu (5. kromozom kısa kolunda delesyon) veya Wolf-Hirschhorn sendromu (4. kromozom kısa kolunda delesyon) da diğerlerindendir. Bu kromozomal aberasyonların tespitinde seçilecek metot floresans in situ hibridizasyonudur (FISH).

Floresans in situ hibridizasyonu

Bu testteki prensip florokrom işaretli kromozom spersifik probların geniş kromozom bölgelerinin (0.2-2.0 Mb) tanınması için kullanılmasıdır. Bu problar spermatozoa örnekleri ile hibridize edilmiştir ve floresans mikroskobu ile tanımlanabilen nukleus içindeki floresans bölgesi gibi işaretlenmiş kromozom bölgeleri görülür[125]. Aynı zamanda, tüm insan ve kemirgen kromozomları için problar mevcuttur ve bazı kromozomal aberasyonların multicolor FISH denilen yöntemle saptanmasında kullanılabilir. Üç veya dört farklı prob paralel olarak hibridizedir. Bunun nedeni skorlamanın gözle yapılması ve gözün farklı floresans renklerin ayrımında kısıtlı olmasındandır.

Multicolor FISH testinin yüksek oranda spesifik olduğu gösterilmekle beraber teknik büyük oranda uygulayan kişiye bağımlı ve pahalıdır. Bu nedenle Baumgartner ve arkadaşları lazer taramalı sitometri metodunu X kromozomunun spermde otomatize analizini geliştirmişlerdir[126]. Ancak bu yöntem de halen pahalıdır ve iyi eğitimli personel gerektirir.

SONUÇ

Genel olarak, DNA hasarı direkt DNA kırıkları, anormal kromozom paketlenmesi ve kromozomal aberasyonlar gibi pek çok farklı düzeyde oluşabilir. DNA hasarı meninin sağlığında olduğu gibi insan üremesindeki önemi de kanıtlanmıştır. Hasarın tespitinde pek çok teknik geliştirilmiştir. Bu bilgiye dayanarak, androlojik araştırma sadece sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisini içeren rutin spermiogram analizinden ibaret değildir. Aynı zamanda örneğin DNA hasarı için daha sofistike testleri içerir. Bu noktada hangi testin uygulanması gerektiği akla gelir. Bu yardımcı üreme teknikleri programı veya androloji ünitesinin personel ve finansal durumuna bağlıdır. Diğer bir sorun ise testlerin standardizasyonu hakkındadır. Bu önemli bir sorundur çünkü testin prediktif değeri ile yakından ilişkilidir.

Son olarak daha çok araştırma yapılmakta ve paternal genomun üreme üzerine etkisinin ve DNA hasarı tespiti için metotlar geliştirilmektedir. Bugün sperm DNA bütünlüğünün saptanmasında pek çok metot geliştirilmiştir. Bazıları pahalı, diğerleri daha az kullanışlı olsa da bugünlerde erkek fertilitesi hakkında daha fazla bilgi toplanabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Evenson DP, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14: 1039
2. Spano M, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. Fertil Steril 2000; 73: 43
3. Loft S, et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time ro pregnancy. Hum Reprod 2003; 18: 1265
4. Duran EH, et al. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. Hum Reprod 2002; 17: 3122
5. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detecrion of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biol Reprod 1997; 56: 602
6. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. Acta Obstet Gynecol Scand 2000; 79: 189
7. Morris ID, et al. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single celi gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Hum Reprod 2002; 17: 990
8. Henkel R, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. Fertil Steril 2004; 81: 965
9. Lopes S, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasrnic sperm injection. Fertil Steril 1998; 69: 528
10. Henkel R, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and ART. Reprod Biomed Online 2003; 7: 477
11. Lewis SEM, et al. An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. Hum Reprod 2004; 19: 1385
12. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. Hum Reprod 2004; 19: 611
13. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative darnage of DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13: 1864
14. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. Hum Reprod 1999; 14: 2279
15. In't Veld P, et al. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasrnic sperm injection. Lancet 1995; 346: 773
16. KurinczukjJ, Bower C. Birrh defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an al ternative interprçtarion. Bt Med J 1997; 315: 1260
17. Ji BT, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. J Nati Cancer Inst 1997; 89: 238
18. Aitken RJ, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998; 59: 1037
19. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122: 497
20. Aitken RJ, Sawyer D. The human sperrnatozoon — not waving but drowning. Adv Exp Med Biol 2003; 518: 85
21. De Jonge C. The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. Hum Fertil 2002; 5: 51
22. Perreault SD, et al. Integrating new tests of sperm genetic inregrity into semen analysis: breakout group discussion. Adv Exp Med Biol 2003; 518: 253
23. Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. Asian J Androl 2004; 6: 139
24. TesarikJ, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. Hum Reprod 2004; 19: 611
25. Henkel R, et al. Sperm function and assisted reproduction technology. Reprod Med Biol 2005; 4: 7
26. Zini A, et al. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. Urology 2001; 58: 258
27. Floyd RA. The role of 8-hydroguanine in carcinogenesis. Carcinogenesis 1990; 11: 1447
28. Fraga CG, et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc Nati Acad Sci USA 1991; 88: 11003
29. Fraga CG, et al. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. Mutat Res 1996; 351: 199
30. Shen HM, Ong CN. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. Free Rad Biol Med 2000; 28: 529
31. Shen HM, et al. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with cigarette smoking. Reprod Toxicol 1997; 11: 675
32. Kodama H, et al. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril 1997; 68: 519
33. Ni ZY et al. Does the increase of 8-hydroxyguanosine lead to poor sperrn quality? Mutat Res 1997; 381: 77
34. Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. J Androl 1999; 20: 718
35. Chen CS, et al. Hvdroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. Biochem Mol Int 1997; 43: 291

36. Chen CS, et al. Maintenance of human sperrn motility and prevention of oxidative damage through co-culture incubation. Andrologia 1997; 29: 227
37. Östling 0, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian celis. Biochem Biophys Res Commun 1984; 123: 291
38. Singh NP, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Celi Res 1988; 175: 184
39. Collins AR, et al. The comet assay: what can it really tell us? Mutat Res 1997; 375: 183
40. Irvine DS, et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl 2000; 21: 33
41. Chan PJ, et al. A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. Fertil Steril 2001; 75: 186
42. Donnelly ET, et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. Hum Reprod 2001; 16: 1191
43. Schmid TE, et al. Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the Comet assay. Hum Reprod 2003; 18: 1474
44. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. Hum Reprod 2002; 17: 1856
45. Lewis SEM, et al. An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. Hum Reprod 2004; 19: 1385
46. Henkel R. DNA fragmentation and its influence on fertilization and pregnancy outcome. İn Kruger TF, Oehninger SC, eds. Male Infertility. London: Informa Healthcare, 2006: Ch 19
47. Aitken RJ. The Amoroso Lecture: The human spermatozoon — a cell in crisis? J Reprod Fertil 1999; 115:1
48. Chatterjee R, et al. Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. Hum Reprod 2000; 15: 762
49. Haines GA, et al. Increased levels of Comet-detected spermatozoal DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. Mutat Res 2001; 495: 21
50. Migliore L, et al. Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. Hum Reprod 2002; 17: 2912
51. Belcheva A, et.al. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. Int J Androl 2004; 27: 296
52. Hughes CM, et al. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modifled comet assay. Mol Hum Reprod 1996; 2: 613
53. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. J Androl 2002; 23: 25
54. Aravindan GR, et al. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identifled by single-cell electrophoresis. Exp Celi Res 1997; 236: 231
55. Gorczyca W, et al. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic celis. Exp Ceil Res 1993; 207: 202
56. Barroso G, Morshedi M, Oehninger 5. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15: 1338
57. Oosterhuis GJE, et al. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality Fertil Steril 2000; 74: 245
58. Younglai EV, et al. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. Hum Reprod 2001; 16: 1950
59. Shen HM, et al. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. Hum Reprod 2002; 17: 1266
60. Benchaib M, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003; 18: 1023
61. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RP. Programmed cell death and human embryo fragmentation. Mol Hum Reprod 1996; 2: 93
62. Carrell D, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. Arch Androl 2003; 49: 49
63. Shoukir Y, et al. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasrnic sperm injection: a paternal influence Hum Reprod 1998; 13: 1632
64. Frankfurt OS, et al. Monoclonal antibody to singlestranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. Exp Celi Res 1996; 226: 387
65. Didenko VV, Hornsby PJ. Presence of doublestrand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. J Cell Biol 1996; 135: 1369
66. Sakkas D, et al. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. Biol Reprod 2002; 66: 1061
67. Bianchi PG, et al. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. Biol Reprod 1993; 49: 1083
68. Manicardi GC, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its

relationship to chromomycin A3 accessibility Biol Reprod 1995; 52: 864
69. Manicardi GC, et al. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. Histochem J 1998; 30: 33
70. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic celis by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. Cancer Res 1993; 53: 1945
71. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science 1980; 210: 1131
72. Tejada RI, et al. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril 1984; 42: 87
73. Rigler R. Microfluorometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine orange. Acta Physiol Scand 1966; 67 (Suppl 1): 122
74. Ibrahim ME, Pedersen H. Acridine orange fluorescence as male fertility test. Arch Androl 1988; 20: 125
75. Shibahara H, et al. Clinical significance of the acridine orange test performed as a routine examinadon: comparison with the CASA estimates and strict criteria. Int J Androl 2003; 26: 236
76. Liu DY, Baker HWG. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology sperm—zona pellucida binding, and fertilization rates. Fertil Steril 1992; 58: 1178
77. Claassens OE, et al. The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. Hum Reprod 1992; 7: 242
78. Virant-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. J Assist Reprod Genet 2002; 19: 319
79. Katayose H, et al. Use of diamide—acridine orange fluorescence staining to detect aberrant protamination of human ejaculated sperm nuclei. Fertil Steril 2003; 79 (Suppl 1): 670
80. Duran EH, et al. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. Hum Reprod 1998; 13: 1235
81. Evenson DP, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14: 1039
82. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. JAndrol 2002; 23: 25
83. Zini A, et al. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. Fertil Steril 2001; 75: 674
84. Larson KL, et al. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum Reprod 2000; 15: 1717
85. Spano M, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. Fertil Steril 2000; 73: 43
86. Bungum M, et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. Hum Reprod 2004; 19: 1401
87. Virro MR, et al. Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, biastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril 2004; 81: 1289
88. Spano M, et al. The applicability of the flow cyto metricsperm chromatin structure assay in epidemiological studies. Hum Reprod 1998; 13: 2495
89. Ward WS, Coffey D.S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod 1991; 44: 569
90. Hammadeh ME. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. Andrologia 1998; 30: 29
91. Braun RE. Packaging paternal genome with protamine. Nat Genet 2001; 28: 10
92. Steger K, et al. Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA. Hum Reprod 2001; 16: 709
93. Terquem A, Dadoune JP. Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: evaluation of nuclear maturation. In Andre J, ed. The Sperm Cell. The Hague: Martinus Nijhoff, 1983: 249
94. Franken DR, et al. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. Andrologia 1999; 31: 361
95. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guilhard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human, spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. Andrologia 1988; 20: 211
96. Auger J, et al. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics between proven fertile and suspected infertile men. Int J Androl 1990; 13: 452
97. Haidl G, Schill WB. Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. Arch Androl 1994; 32: 263
98. Foresta C, et al. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of

histones in spermatozoa in infertile men. Int J Androl 1992; 15: 330
99. Liu DY, Baker HWG. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm—zona pellucida binding, and fertilization rates. Fertil Steril 1992; 58: 1178
100. Hammadeh ME, et al. Predictive value of sperrn chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. Arch Androl 2001; 46: 99
101. Van Ranst H, et al. Chromatin condensation assessment in spermatozoa used for intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1994; 9 (Suppl 4): 24
102. Hammadeh ME, et al. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilizadon, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. Hum Reprod 1996; 11: 2468
103. Sakkas D, et al. Spermnuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998; 13 (Suppl4): 11
104. Razavi S, et al. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. Andrologia 2003; 35: 238
105. Erenpreisa J, FreivaldsT, Selivanova G. Influence of chromatin condensation on the adsorption spectra of nuclei stained with toluidine blue. Acta Morph Hung 1992; 40:3
106. Erenpreisa J, et al. Apoptotic celi nuclei favour aggregation and fluorescence quenching of DNA dyes. Histochem Celi Biol 1997; 108: 67
107. Erenpreisa J, et al. Comparative study of cytochemical tests for sperm chrornatin integrity. J Androl 2001; 22:45
108. Erenpreisa J, et al. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. CytometryA 2003; 52A: 19
109. Barrera C, et al. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. Acta Histochem 1993; 94: 141
110. Bizzaro D, et al. In-situ competition between protamines and fluorochromes for sperm DNA. Mol Hum Reprod 1998; 4: 127
111. Bianchi PG, et al. Use of the guanine—cytosine (GC) specific fluorochrome, chromomycin A3, as an indicator of poor sperm morphology. J Assist Reprod Genet 1996; 13: 246
112. Lolis D, et al. Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. Int J Androl 1996; 19: 23
113. McPherson 5MG, Longo FJ. Localization of DNAse I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. Mol Reprod Dev 1992; 31: 268
114. Sakkas D, et al. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperrn chromatin packing in maturing and ferrilizing mouse spermatozoa. Biol Reprod 1995; 52: 1149
115. Esterhuizen AD, et al. Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. Hum Reprod 2000; 15: 657
116. Esterhuizen AD, et al. Chromatin packaging as an indicator of human sperm dysfunction. J Assis Reprod Genet 2000; 17: 508
117. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 2001; 18: 221
118. Moosani N, et al. A 47,XXY fetus resulting from ICSI in a man with elevated frequency of 24, XY spermatozoa. Hum Reprod 1999; 14: 1137
119. Ohashi Y, et al. High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. Hum Reprod 2001; 16: 703
120. Carreil DT, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. Obsret Gynecol 2003; 101: 1229
121. Vendrell JM, et al. Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. Hum Reprod 1999; 14: 375
122. Vegretti W, et al. Correlation between sernen parameters and sperm rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. Hum Reprod 2000; 15: 351
123. Lewis-Jones 1, et al. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. Fertil Steril 2003; 79: 212
124. Lathi RB, Milki AA. Rate of aneuploidy in miscarriages following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injecrion. Fertil Steril 2004; 81: 1270
125. Shi QH, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and Iifestyle factors. Cytogenet Cell Genet 2000; 90: 219
126. Baumgartner A, et al. Automated evaluation of frequencies of aneuploid sperm by laser-scanning cytometry (LSC). Cytometry 2001; 44: 156

16

Erkek İnfertilitesinde Kromozomal ve Genetik Anormallikler

Pasquale Patrizio, Jose Sepulveda, Sepideh Mehri

Çeviri: *Cabir Altan*[*], *Fatih Altunrende*[*]

GİRİŞ

İnfertilite doğurganlık çağındaki çiftlerin %15'ini etkilemekte ve bunların %50'sinde erkek faktötürü tek başına veya dolaylı olarak katılmaktadır. Erkek infertilitesinde başlangıç sınıflandırma ve ıdendifikasyon için semen analizi hala güvenilir (azospermi, oligozoospermi, astenospermi, teratospermi veya kombinasyonu) yalnız tek başına bu metod hastalığın etyolojisini ayırt etmede yetersiz. Detaylı bir çalışma için detaylı anamnez ve fiziksel muayene, hormonal ve immunolojik inceleme, ultrason ve Dopler çalışma ve genetik ve kromozomal testler gerekli olabilir.

Birçok açıklanamayan formlar son moleküler genetikteki ilerleme ile bizim anlamamızı sağlamıştır, ancak buna rağmen %50 olgu hâlâ sınıflanamamıştır.

Yardımcı üreme tekniklerindeki ilerleme ile özellikle de intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) ciddi infertilitesi olan erkeklerde gelecek nesillere kendi nesillerini devam etme imkanı vermiştir, ancak genetik ve kromozomal defekler sorumlu ise infertileteden sonra bu genetik defektleri gelecek nesillere iletme olabilir. Genetik bazda erkek infertiletisini sınıflamak için farklı yaklaşımlar mevcuttur. Bazı kitaplarda pretestiküler, testiküler ve post testiküler olarak farklı formlara bölünmüştür. Genetik veya sayısal/yapısal kromozomal hastalıklar hormonal üretimi azaltabilir veya spermatogenez stimulasyonunu azaltabilir (pretestiküler olay) veya spermatik prosesin kendisi üzerine etkisi olabilir. Hayvan modelleri ve bazı insanlarda genetik anomalilerin spermatogenezin mayotik kontrolünü içeren sinyal kaskatını etkilediği araştırılmış ve rapor edilmiştir. Diğer genetik/kromozomal anomaliler (kistik fibroz ve erişkin polikistik böbrek hastalığı)sperm transportunu etkileyebilir (posttestiküler vaka).

GEN DEFEKTİ İLE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Bu hastalıklar tek gen lokusundaki de novo veya X geçişli veya otozomal (dominant veya resesif) mutasyon nedeniyle oluşmaktadır. Tahmini 10000 hasta insan monogeniktir. Tek gen hastalıklarının global prevelansı doğumda yaklaşık 10/1000[8] dir. İnfertil erkeklerde Mendelian hastalıklar izlenmektedir. Tablo 16.1'de bu detaylandırılmıştır. Bu listede tamamı görülmemektedir ancak potansiyel klinik ile ilintili genetik kondisyonları içermektedir.

[*] Onsekiz Mart Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı, Çanakkale.
[*] Onsekiz Mart Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı, Çanakkale.

Tablo 16.1 : *Gen defekti ve erkek infertilitesi*

Durum	İlişkili Gen (harita)	insidans	fenotip	kalıtım
Hemokromatozis	HFE(6p21.3) HFE(1q21) juvenil	1:500	Demir yüklenmesi nedniyle organ yetmezliği (KC ve testis)	Otozomal resesif
Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı	PKD1(16p13.3) PKD2(4q21-23) PKD3 (?)	1:1000	Multipl kist (böbrek,KC,dalak, pankreas,testis,epididim, seminal vezikül	Otozomal dominant
Kistik fibrozis	CFTR(7q31.2)	1:2500	AC enfeksiyonları, wolf kanalı anomalileri, pankreas yetmezliği	Otozomal resesif
Konjenital adrenal hiperplazi	P450C21(6p21.3) 21-hidroksilaz eksikliği	1:5000	ACTH yüksekliği, FSH/lh sekresyonu inhibisyonu, azospermi	Otozomal resesif
Myotonik distrofi	DMPK (19q13.2-3)	1:8000	Kas güçsüzlüğü, katarakt, atrofik testisler	Otozomal dominant
Usher's sendromu	USH1(14Q32) USH2(1Q41) USH3(3Q21 Q25)	1:17000	Düşük sperm hızı, işitme kaybı, retinitis pigmentoza	Otozomal resesif
Prader-willi sendromu	SNRPN (15q11q13)	1:20000	Obesite, kas hipotonisi,mental retardasyon, hipogonadotropik hipogonadizm	Otozomal dominant
Sex reversal sendrom	SRY (Yp11.3)	1:25000	46,XX SRY(+) 46,XY SRY(-)	Y-linked
Kallman's sendromu	KAL1 (Xp22.3)' KAL2 (8p12)'' KAL3 (?)'''	1:30000	Hipogonadotropik hipogonadizm, anosmi	'X-linked resesif ''otozomal dominant '''otozomal resesif
İmmotil silia sendromu	DNAI1(9p21-p13) DNAH5(5p) 19q13.2, 16p2, 15q13	1:35000	Sinüzit,bronşektazi, hareketsiz sperm	Otozomal resesif
Serebellar ataksi	CLA1(9q34-9) CLA3(20q11-q13)	1:50000	Ökonoid fenotip, serebellar bozukluk, atrofik testis	Otozomal resesif
Orak hücreli anemi	HBB(11p15.5) (mutasyon)	1:58000	Eritrositlerde orak şekil bozukluğu,testiküler mikroinfarksiyon	Otozomal resesif
Androjen duyarsızlık sendromu	AR(xq11-q12)	1:60000	Parsiyel/komplet testiküler feminizasyon	X-linked resesif
Beta Talasemi	HBB (11p15) delesyon	1:114000	Anemi, aşırı demir birikimi (hipofiz ve testiste)	Otozomal resesif
Bardet-Biedl sendromu	BBS (11q13,16q21, 3p12-q13, 15q22.3, 2q31, 20p12, 4q27, 14q32.11)	1:160000	Retinal dejenerasyon, obezite, davranış bozukluğu, GU malformasyon, polidaktili, hipogonadizm	Otozomal resesif
Miks gonadal disgenezis ??	WT1(11p13) DAX1(Xp21.3) Testain (20p11.2)	Nadiren	Unilateral testis, ambigius external gonad	Otozomal dominant X-linked resesif sitogenetik
Kalıcı müllerian kanal sendromu	AMH(19p13.3-p13.2) AMHR(12q13)	< 200 olgu bildirildi	Müllerian yapıların incomplet değişimi	Otozomal? X-linked
LH/FSH hormon ve reseptör mutasyonu	LHB(19q13.32) FSHB(11p13)	5 olgu bildirildi	Gecikmiş puberte, spermatogenetik arrest	Otozomal resesif?
5 alfa redüktaz eksikliği	SRD5A1(5p15) SRD5A2(2p23)	bilinmiyor	Erkek pseudohermafroditizm, şiddetli hipospadias	Otozomal resessif

Kallmann sendromu

Kalman sendromu (KS) konjenital hipogonodotropik hipogonadizm ve anosmiden oluşmaktadır. X geçişli form olan KS, KAL, encode proteinleri, anosmin 1 genleri sorumlu olup bu genler GnRH nöronları ve olfaktör sinirlerin hipotalamusa migrasyonunda anahtar rolü oynamaktadır. Nöronal migrasyon yetersizliği sonucunda hipotalamus ve ön hipofiz testisi stimule edemez. KS' de gecikmiş puberte ve atrofik testis (<2 cm) ana belirtilerdir. Klinik belirtiler hipogonadizmin derecesine dayanmaktadır ve bazı vakalarda bu sendrom sadece subfertilite ile ortaya çıkabilir. Testiküler biyopsilerde germ hücre aplazilerinden fokal bölgelerde spermatogenezisin sonlanmasına kadar geniş alanlarda gösterilmiştir. Ek olarak KS'de X geçişli, otozomal dominant ve resesif akrabalık bildirilmiştir. Otozomal dominant KAL 2 8p12 (FGFR-1, Fibroblast büyüme faktör reseptör 1) ve otozomal resesif KAL 3 üreme ile ilişkisiz yarık damak,dental agenezis ve yüz asimetrisi içeren yüz hatları ile ilgilidir[10]. Son çalışmalarda konfirme edilmiştir ki, KAL 1 gen serisinin kodladığı mutasyonda minor KS olguları olmaktayken major ailesel (ve tahminen sporadik) olgular kalan 2 otosomal gen defektinden olmaktadır[11].

Konjenital adrenal hiperplazi

Kolesterolden kortizol sentezi için gerekli beş enzimatik ayaktan bir tanesinin kalıtsal defekti sonucu konjenital adrenal hiperplazi (KAH) oluşmaktadır. KAH'ın yaygın görülen formu (%95) 6p21.3 genine lokalize 21 hidroksilaz enzim defektine bağlıdır[12] .Sitokrom P450 21 hidroksilaz genindeki mutaston otozomal resesif geçme eğlimindedir. 21 hidroksilazdaki yetersizlik 3 formda olur: 1) basit virilizasyon 2) tuz kaybetme 3) klasik olmayan.

21 hidroksilaz yetersizliğinin basit kıllanma ve tuz kaybıyla giden formu uterus içindeyken adrenal androjen biyosentezinin aşırı artması ile karakterizedir. Erkek hastalar doğumda fark edilmez normal genital yapıya sahipirler ve sıklıkla tuz kaybı krizi oluncaya kadar tanı konulmaz. Kortizol ve aldosteron üretimi düşük, fakat testesteron üretimi normaldir (Androstenedion periferde dönüşmesi). KAH'lı hastalarda artmış adrenal androjen sekresyonu (Artmış adrenokortikotropik hormon nedeniyle, ACTH), LH ve FSH sekresyonu supresyonuna neden olur ve sonuçta küçük testis, azalmış spermatogenez ve testesteron androjen üretimi ile sonuçlanır[13, 14].

Prader Willi sendromu

Prader Willi Sendromu (PWS) genomik kodlanmaya bağlı insanlarda görülen ilk hastalıktır. Orjin aldığı ebevenynlere bağlı olarak genler farklı eksprese olur. PWS otozomal donimant patern göstererek paternal 15 q11.2-13 lokusundaki SNRPN genenin kaydı nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Aynı lokustaki maternal genomik genin kaybı diğer bir iletilen hastalığa neden olur (Angelman's sendromu). Bu hastalığın karekteristikleri neonatal hipotoni, çocukluk çağındaki fazla yemek yeme, obesite, mental reterdasyon ve boy kısalığıdır. GNRH'daki defekt sonucu hipogonazim olduğu varsayılmaktadır.

Tablo 16.*2:* *Bardet-biedell sendromu ile ilişkili genlerin kromozom lokalizasyonu*

İlişkili gen	Harita
BBS1	11q13
BBS2	16q21
BBS3	3p12-q13
BBS4	15q22.3
BBS5	2q31
BBS6	20p12
BBS7	4q27
BBS8	14q32.11

Bardet-Bield sendromu

Bardet-Bield sendromu (BBS) sekiz lokasyon ile bağlantılı genetik olarak heterojen hastalıktır[17,18]. Bazı BBS genleri silia fonksiyonlarını ve flagel formasyonunu tutar bu sperm motilitesini bozar ve infertiliteye sebep olur. BBS resesif hastalık[19] hastalık olduğu düşünülmesine rağmen tam tersi olarak 'çok çeşitli penetranslı'[20] resesif paternin varlığıyla karekteri bulunabilir.

Ana hatlarını obezite, retinitis pigmentosa, polidaktili, hipogonodotropik hipogonodizm, renal kistik displazi ve mental gelişim geriliği oluşturmaktadır. BBS deki diğer klinik bulgular diabet, hipertansiyon ve konjenital kalp defektidir. Klinik tanıda bu semptomların asgari dört tanesinin olması aranır [21].

Hemokromatozis

Herediter hemokromatozis (HH) diet olarak alınan demirin artmış absorbsiyonunu ile karakterize olan ve sonucunda parankimal demir birikimi ve bunu takiben doku hasarı ile sonuçlanabilecek otozomal bir hastalıktır[23]. Hipofiz gonodotroplarında demir birikmesine sekonder olarak gelişen hipogonodotropik hipogonadizm HH ile ilişkili en sık endokronopati olup libido kaybı, impotans ve vücut kılları kaybına yol açar[24]. Dört tip HH vardır ve bu tablo 16.3'de özetlenmiştir[25]. Tip 1 en sık görülendir, diğer HH tipleri daha nadir olduğu bilinmektedir ve çok küçük sayıdaki ailelerde çalışılmıştır[26].

Serebellar ataksi ve hipogonadizm

Cerebeller ataksi ve hipogonadizm 20 yaşında başlayan çoğunlukla akraba evliliklerinde görülen nadir bir durumdur. Klinik bulgularında serebellar yetersizlik (konuşma ve yürüme anormallikleri) ve düşük libido ve atrofik testis ile giden önokloid fenotip mevcuttur.

Muhtemel beyin atrofisi veya hipoplazisi sebebiyle oluşan hypotalamik-hipofiz disfonksiyonuna sekonder infertilite olmaktadır. Gen tutulumları ensık erişkin başlangıçlı tipte CLA 1 (9q34-9)[27] ve infant başlangıçlı tipte CLA3 (20q11-q13)[28] dir.

Diğer idiyopatik hypogonadotropik hypogonadizm

Daha önce idiyopatik olarak klasifiye edilen hypogonodotropik hypogonozimin diğer formları son zamanlarda genetik mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir.

Onlar nukleer transkripsiyon faktör kodlayan DAX 1 geni içerirler ve konjenital adrenal hipoplazi (KAH)[11] ile ilgili X geçişli IHH yol açar. Pro hormon konvertez (PC1) genindeki bir başka mutasyon hipogonodotropik hipogonadizm ve buna ek olarak ciddi obezite, hiperkortizolemi ve proinsulinin insuline dönüşümdeki defekt ile ilişkilendirilmiştir[29]. GPR 54 deki –G-protein- coupled receptor 54 genini kodlayan homozigot mutasyonlar son zamanlarda hipogonodotropik hipogonadizmin diğer nedeni olarak rapor edilmiştir[30].

Kromozom sayısındaki fazlalık ile giden erkek infertilitesi

Kromozomal hastalıklar genetik materyaldeki kromozom düzeylerindeki kayıp, artma ve anormal düzenlemelerle tanımlanır. Bu hastalıklar yapısal ve sayısal anormallikler olarak daha sonra bölünebilir. Yapısal kromozom hastalıklar tek (delesyon, duplikasyon ve inversiyon) veya multipl (translokasyonlar) kromozomlardır. Genellikle onlar mayoz sırasında ayrılması sonucunda olur ve erkek infertilitesine en sık katkıda bulunan faktör olarak tanınır. (%15 azospermik ve %5 oligospermik erkek)[64].

İmmotil Silia Sendromu

İmmotil silia sendromu (ICS), siliar motilite bozukluğu ile seyreden bir grup heterojen hastalığı içerir ve en sık Kartagener sendromunda görülür. Silialardaki motor apparatus veya aksonomdaki anomaliler yüzünden sperm motilitesi bozulur. Klinik olarak öksürük, sinüs enfeksiyonu, nazal polipler, bronşektazi ve astenospermi izlenir[31]. İmmotil silia sendromlu infertil olgularda karşımıza çıkan bir diğer tablo fibroz displazidir. Bu tabloda teratospermi ana tablodur (kısa kuyruk ve kalın flagella) ve sperm motil olabilir[32,33].

Bu hastalıktan sorumlu spesifik genler olmamasına rağmen, kalıtımsal özelliğinden dolayı otozomal resesif olabileceği ileri sürülmektedir. ICS nedeni dynein axoneme chain (DNA1) bölgesindeki genlerin mutasyona uğramasıdır. ICS haritasındaki 9p21-p13 (CILD1)'nin nedeni DNA-2'nin mutasyona uğramasıdır. Bir diğer form olan (CILD2)'nin nedeni 19q13.2-gter bölgesinin mutasyona uğramasıdır. ICS haritalamasında diğer mutasyona uğrayan bölgeler 5p (CILD3, DNAHS geni), 16p12 ve 15q13. Gen defekti resesif özellik gösterdiğinden doğan çocuklar normal olabilir[33].

Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı (PKB)

Bu hastalığın karakteristik özellikleri dalak, karaciğer, pankreas ve böbrekteki büyük boyutlu kistler ve %10-40 olguda beyinde gelişen berry anevrizmalardır. Yetişkin yaşa gelene kadar sendrom asemtomatik olduğundan dolayı, etkilenen erkeklerde ilk belirti infertilite olabilir. Kist; epididim ve

seminal vezikülde veya ejakulator kanal lokalizasyonunda olabilir ve tıkanıklık yaparak infertiliteye (ADPK) neden olabilir. Otozomal dominant PKB hastalığı ile ilgili olarak 3 genetik bölge tanımlanmıştır. PKD1 en sık görülen formdur (%85) ve 16p13.3 kromozomda haritalanmıştır. PKD2, hastalığın hafif formudur ve 4q21-23 kromozomda haritalanmıştır. Bir diğer form olan PKD3'ün gen haritası henüz tanımlanmamıştır[33].

Yakın zamanda ICS ile APDK arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Elektron mikroskobik çalışmalarda her iki hastalıkta da flagellar dynein kolları ve böbrek epitel sillerinde anomali olduğu saptanmıştır.

Kistik Fibrozis Transmembran Regülator Mutasyon

Kistik fibrozis (CF), Kafkaslar'da daha sık görülen en ölümcül otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır. 1:2500 doğum sıklığında görülür ve taşıyıcılık oranı 1:25'dir. Klinik özellikleri, kronik pulmoner obstrüksiyon, enfeksiyon, pankreatik yetmezlik, neonatal mezokonyum ileusu ve erkek infertilitesidir[35]. CF geni, {kistik fibrozis transmembran regulator gen (CFTR;7q31.2)}'dan sentezlenen protein c-AMP klorid kanalını kontrol eder. Bu kanal sekretuar kanal epitelinde elektrotların transportunu sağlar. CFTR geninde 1000'in mutasyon tanımlanmıştır[36]. CFTR geni aynı zamanda seminal vezikül vas deferens ve epididimin 2/3'lük distal kısmının formasyonunda etlkilidir.[37]. CF'li erkeklerin %95'inde wolfran kanal yapılarında anomali mevcuttur. En sık görülen anamali kongenital olarak bilateral vasdeferens yokluğudur (CBAVD).

Konjenital Bilateral Vas Deferens Yokluğu

Bu durum infertil erkeklerin %1-2'sinde görülür[38] ve kistik fibrozisin genital formu gözönünde bulundurulmalıdır[39]. bu hastalarda wolfran kanal defektine bağlı bulgular görülür, fakat şiddetli pulmoner, pankreatik ve intestinal problemler yoktur. CBAVD'li erkeklerin yaklaşık %90'ında spermatogenez normaldir[40]. Anatomik olarak epididimin kuyruk ve gövdesi, vas deferens ve seminal veziküller yoktur, fakat efferent duct ve kaput epididim mevcuttur[41]. CBAVD temelde CF'e benzer şekilde allel paterne (homozigot ve heterozigot) sahip olmasına rağmen şiddetli mutasyonlar daha azdır[42].

Konjenital Tek Taraflı Vas Deferens Yokluğu (CUAVD)

Bir diğer erkek infertilite nedeni olan konjenital tek taraflı vas deferens yokluğu genel popülasyonun %0,5'ini etkiler ve nadiren infertiliteye neden olur[43]. CUAVD'li hastaların yaklaşık olarak %40'ında CFTR geninde en az bir mutasyon olduğu bildirilmiştir. CUAVD en sık sol tarafta (%70) görülür ve olguların %75'inde kontralateral renal agenezis bulunabilir. Bununla birlikte CUAVD renal agenezis ile birlikte ise CFTR gen mutasyonu olma ihtimali daha azdır (%31)[44].

Tablo 16.4: *Androjen reseptör gen mutasyonu ile ilişkili sendromlar*

Komplet androjen duyarsızlık sendromu	Parsiyel androjen duyarsızlık sendromu
Testiküler feminizasyon sendromu (morris's sendromu)	Erkek pseudohermafroditizm Lub's sendromu Reifenstein's sendromu Gilbert-dreyfus sendromu

Tablo 16.5: *Androjen duyarlılığı ile ilişkili androjen reseptör (AR) genlerin exonları*

Exon 1	Androjen reseptör genlerinin aktivasyonu
Exon 2 ve 3	Encode peptid yanıtı için DNA bağlanması
Exon 4 ve 8	Encode C-terminal yanıtı için androjen bağlanması

Androjen Reseptör Gen Mutasyonları

Androjen reseptörleri (AR) maskulinizasyon ve virilizasyon için temel olan ve X kromozumunda lokalize olan steroidal reseptörlerdir. AR mutasyonları, AR'lerin yokluğu veya yapısal değişikliklerine neden olarak parsiyel veya komplet androjen rezistansı gelişmesine neden olur. Fenotipik özellikler, kadınsı görünüşten normal virilizasyona sahip infertil erkeklere kadar çeşitlilik gösterir. Klinik olarak, ambigus genitalis, testiküler atrofi, mikropenis ve hipospadias görülebilir[45].

AR'de üçyüzün üzerinde farklı tipte mutasyon geliştiği bildirilmiştir. Exon-1'deki mutasyonlar komplet androjen duyarsızlığının nedeni iken, C terminalinde ligan bağlayan alandaki (LBD) bazı mutasyonlar parsiyel tutarsızlığın nedenidir. Fenotipteki değişikliklerden dolayı, spermatogenezi parsiyel veya komplet bozulmuş olan erkeklerin %40 kadarında altta yatan nedenin androjen duyarsızlığı olduğu ileri sürülmüştür[46].

Yakın zamanda bildirilen bir raporda, idiopatik infertiliteli erkeklerin yalnızca %2'sinde AR gende önemli varyasyonlar bulunduğu bildirilmiştir[47]. AR gen 8 exondan (3 domain) oluşmuştur (tablo 16.5) ve exon-1 üzerinde yeralan tekrarlayan CAG nükleotidleri kritik öneme sahiptir. Bu bölge transaktivasyon bölgesi olarak isimlendirilmiştir. Bu bölgedeki nükleotidler (CAG) genellikle 15-30 arasında tekrarlanır. 40> tekrarlarda şiddetli spinal bulbar muscular atrofi (Kennedy's hastalığı) ortaya çıkar[48]. Bu hastalık 30 yaşından sonra ortaya çıkan bir rahatsızlık olup ilerleyici tipte anterior motor nöron delesyonu ve kas güçsüzlüğü ile kendini gösterir. Testiküler atrofi nedeniyle infertilite gelişir[49].

Halen tartışmalı olmasına rağmen bazı erkeklerde oligospermi ve CAG tekrarları orta düzeyde artmış olabilir (>30 fakat 40'dan az tekrar). Büyük miktarda CAG tekrarı olan bireylerin çocuklarında CAG tekrarı normalden fazladır[50,51].

Myotonik Distrofi

Myotonik distrofi (MD), yetişkin tip müsküler distrofinin en sık nedenidir ve genellikle katarakt, kas güçsüzlüğü ve aşırı zayıflık, hipogonadizm, EKG değişiklikleri, DM (%5 olguda) ve kolelithiazis (%25 olguda) mevcuttur. Semptomlar genellikle ikinci de kadın erken dönemlerinde ortaya çıkar. Hastalığa neden olan gen 19. kromozomun uzun kolunda q13.2-3'de (DMPK geni) lokalizedir ve ailesel serin/treonin protein kinaz (myotonin-1) kodlanır. MD'de 5. exondaki CTG nükleotid dizesinde 35'den daha fazla tekrar mevcuttur. Tekrar sayısında artışla ilişkili olarak gen fonksiyonu azaldığından ortaya çıkan durumlar çeşitlilik gösterir. Normal bireylerde CTG tekrarları 5-35 arasındadır, orta derecede etkilenmiş bireylerde 50-80 arasındadır, şiddetli etkilenen bireylerde 2000'den daha fazladır[52]. Kennedy's hastalığına benzer şekilde, bu rahatsızlık ailevi kalıtımsal özellik gösterir, özellikle anneden çocuğa geçiş görülür[53]. Olguların %30'unda erkek infertilitesi görülür ve bunlarında en az %80'inde testiküler atrofi mevcuttur. Biyokimyasal olarak FSH ve LH seviyeleri yüksek iken testesteron seviyeleri normaldir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada MD'de defektif sperm kapasitasyonu ile akrozom reaksiyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir[54].

Usher's sendromu

İnsanlardaki sağırlık-körlüğün en sık nedenidir. Bu otozomal resesif hastalık 3 kromozomal defekte bağlı olarak 3 farklı fenotipte kendini gösterir {US1 (14q32), US2 (1q41), US3 (3q21-q25)}. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada usher sendromu ile infertilite arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, spermin anormal siliar yapısı ile DHA (docosahexaenoic acid)'li fotoreseptör hücrelerinin ilişki gösterilmiş. DHA kan seviyeleri, retinitis pigmentozalı (RP) hastalarda normal insanlardan daha düşüktür ve RP'lı hastaların sperm motiliteleri azalmış ve anormal morfolojiye sahiptir. Usher sendromlu tip2 hastalarda spermdeki DHA seviyeleri oldukça azalmıştır[55,56].

β- Talasemi ve Orak Hücre Anemi

Hastalık, β- globulin genindeki (HBB) otozomal dominant genomik delesyon sonucu ortaya çıkar. Bugüne kadar 60 farklı delesyon tanımlanmıştır. Klinik olarak hafif anemiden, hemolitik anemiye kadar değişiklik gösterir ve major talasemide vücutta aşırı demir birikimi görülür. Bu hastalarda; testislerde ve hipofizde aşırı demir birikimi yüzünden infertilite ortaya çıkar. Moleküler seviyede, hipoteze göre aşırı demir birikimi serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmak suretiyle sperm DNA'sının oksidasyona [57] ve sperm membranının bozulmasına neden olur .

Otozomal resesif genetik geçişli bir rahatsızlık olan orak hücre anemi HBB genindeki glutamik asidin valine dönüşmesindeki bozukluktan kaynaklanmaktadır. Bunun sonucunda defektif hemoglobin formu olan HbS ortaya çıkar. Hipozer ve testiküler mikroinfarktlardan dolayı, orak hücre anemili hastalarda sekonder olarak hipogonadizm ve infertilite ortaya çıkar[58].

SRY Gen Defekti

SRY (Y kromozomunda cinsiyet belirleyen bölge) geni Y kromozomunun kısa kolunda lokalizedir (Yp11.3) ve erkek cinsiyetin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu gendeki mutasyonlar (1:25.000) XY female (Xp22.11-p21.2) ile gonadal disgenezis (suyer's sendromu) gelişmesine neden olur. SRY'nin X kromozomuna translokasyonu XX male fenotip oluşmasına neden olur. Y kromozomunun uzun kolundaki azospermik faktör geninin (AZF) yokluğundan dolayı tüm 46,XX erkekler infertildir. Fakat bu hastaların dış genital organ ve testisleri, X kromozomunun üzerindeki Y kromozomunun genetik parçasından dolayı gelişmiştir[59].

5α-Redüktaz Eksikliği

5 α-redüktaz tip2 izozim eksikliği otozomal resesif geçişli bir hastalık olup testesteronun aktif şekli olan dihitrotestesterona (DHT) dönüşümünde defekt mevcuttur (erkek pseudohermafrotidizmi gelişir). 5α-redüktaz enzimi iki gen bölgesinde kodlanır; tip1 5. kromozomda lokalize iken, tip2 2p23 kromozom bölgesinde lokalizedir (SRDSA2). 5α-redüktaz tip izozymdeki mutasyonlarda, biyokimyasal olarak düşük DHT (prostat ve dış genital organ gelişiminde önemlidir) seviyesine rağmen, yüksek testesteron seviyeleri mevcuttur. Klinik olarak normal internal genital duktal yapılar ve testisler mevcutken, dış genital organ kıllanması yetersizdir. Etkilenmiş olan bireylerde periskrotal hipospadias ve sıklıkla vajinal poş görülür. Genellikle testisler labioskrotal kabarıklıkta veya inguinal kanalda bulunur. Seminal veziküller gelişmemiştir ve prostat olmayabilir[60]. İnfertilite dış genital organların yapısal anomalilerinden ortaya çıkar. İnmemiş testislerde spermatogenez olduğu saptanmasına rağmen normal yoldan fertilizasyon olgusu bildirilmemiştir[52].

Mixt Gonadal Disgenezis

Erkekte ve kadında mixt gonadal disgenezis heterojen bir durumla karakterizedir, genellikle unilateral testisle, kontralateral gonad çizgisiyle karakterizedir. Fenotipik özellikler normal erkekten ambiqus genitalya'ya kadar değişiklik gösterir. Genotipik olarak hastalarda genellikle 46XY veya 45X/46XY mozaizmi (en sık olan) mevcuttur. Bu iki genotipik defektte gonad gelişiminin bozulmasıyla ilişkilidir[61]. Gonadal disgenezis sitogenetik mozaizm veya testis organize eden genlerin yakınındaki SRY bölgesindeki mutasyondan kaynaklanır. Buradaki genlerden biri yeni klonlanmış insan testatin gen (20p11.2) olabilir[61]. Skrotal testisler, inguinal herni ile ilişkili olup, sıklıkla yalnız sertoli hücrelerinden oluşmuştur (sertoli only cell). Leyding hücreleri normaldir. Disgenetik gonadlar, malign değişiklikler geliştirme eğilimindedir. Tipik olarak puberteden önce olguların 1/3'ünde gonadoblastoma veya disgerminoma gelişebilir[63].

Kromozom Sayısındaki Bozulma ile Giden Erkek İnfertilitesi

Kromozal hastalıklar genetik materyaldeki kromozom düzeylerindeki kayıp, artma ve anormal düzenlemelerle tanımlanır. Bu hastalıklar yapısal ve anormallikler olarak daha sonra bölünebilir. Yapısal kromozom hastalıklar tek (delesyon, duplikasyon ve inversiyon) veya multipl (translokasyonlar) kromozomlardır. Genellikle onlar mayoz sırasında ayrılma sonucunda olur ve erkek infertilitesine en sık katkıda bulunan faktör olarak tanınırlar (azospermik erkeklerin %15'i ve oligospermik erkeklerin %5'i).

Klinifelter's Sendromu

Klinifelter sendromu (1:1000) yaklaşık %14 azospermik olguda görülenen sık genetik sendromdur[65].

Klinik bulguları küçük, sert testis (germ hücreden yoksun), azospermi ve muhtemel jinekomasti ile ilişkili triad ile ilişkilidir[52].

Fenotip normalden androjen yetmezliği ile ilgili virilize bir erkeğe kadar değişiklik gösterir. Testiküler histoloji seminifer tubul hyalinizasyonu ile Leydig cell hiperplazisini gösterir[4].

Bu sendrom uzun boy, kadın saç tipi, düşük entellektüel seviye (IQ), alt ekstremite varisleri, obezite, diabet, lösemi non seminaatöz germ hücre tümörleri, meme kanseri insidansında artış (normal erkekten 20 kat fazla) ile ilgili olabilir[66].Yaklaşık olarak %90 erkek klasik 47 XXY, kalan %10'u XXY/XY kombinasyonu ile kromozom mozaik (30 tanınmış patern) yapı gösterir. Yaklaşık %50 XXY olgu paternel geçişlidir. Ve son çalışmalarda ileri paternal yaş ile ilişkili olduğu karar verilmiştir[67].

Tablo 16.3: *Kalıtımsal hemokromatozisin sınıflandırılması*			
Kalıtımsal hemokromatozis	**lokalizasyon**	**kalıtım**	**Görüldüğü yaş**
Tip 1 (klasik)	6p21	Otozomal resesif	> 30 yaş
Tip 2 (juvenil)	1q21	Otozomal resesif	<30 yaş
Tip 3	7q22	Otozomal resesif	Yaşamın 4.-5. dekatı
Tip 4	2q32	Otozomal dominant	> 60 yaş

Ekstra X kromozomu maternal yaş ile ilgili olarak paternal mayoz 1 (%50 vakada XY ayrılmaması) veya maternal mayoz 1 veya 2'den (%40) orjin alabilir[68].

Bu sendrom ile doğal babalık olabilir fakat çoğunlukla mozaik genotipledir[69].

Düzgün anormal somatik genotipe rağmen 47,XXY hastalarının %75-100 matur spermi normal haploid seks kromozom komplemanı mevcuttur (X veya Y yerine XY veya YY)[20].

Somatik anoploidi ile belirgin gonozomal anoploidi yokluğu testiste mayotik kontrol noktasında anormal germ hücre sıralarını daha ileri gelişmeler için bertaraf edilmiştir[52].

XYY Sendromu

XYY sendromu insidansı 1:1000 canlı doğumda birdir.47, XYY karyotipe sahip erkeklerin %2 sinden daha azı infertildir[71]. Ekstra Y kromozom çoğunlukla (%86) paternal mayotik II birleşmemesinden orjin alırken geri kalanlar postzigotik olaylardan kaynaklanır[72].

Fenotip uzun postür, agresif ve antisosyal davranış ve lösemi riskinde artışı içermektedir[3].

XYY erkeklerde matür spermlerin kromozomal komplenentlerine odaklanan çalışmalar onların çok az spermlerinde (<%1) seks kromozomal disomi olduğunu göstermiştir (YY,XX,XY)[73]. Bu bulgu spermatogenez sırasında mayotik kontrol noktalarında ekstra Y kromozomunu elemine edildiği hipotezini destekler ve bu 47 XYY sendromu olan erkeler normal karyotipli baba olabileceğini gösterir.

Noonan's Sendromu

Bu sendrom yaklaşık 1:1000-2500 tahmini insidans ile göreceli yaygın görülür. Noonan's sendromu (NS) hastalar fenotip olarak Turner's sendromu (XO) ile muadildir ve benzer karakteristikler paylaşırlar örnek olarak ağ şeklinde boyun, kısa postür, lenfödem, geniş yerleşimli gözler, kubitus valgus, kardiyovasküler hastalıklar ve pulmoner stenoz verilebilir. Bu sendrom 46,XY/XO mosaizim karyotip ile otozomal dominant patern ile geçişlidir.

Y kromozom Mikrodelesyonu

Y kromozomunun kısa veya uzun kolunun çeşitli bölgelerdeki yapısal değişiklikler (kayıp veya mikrodelesyonlar) sonucu spermatogenezis aksayabilir ve bu infertilitenin en sık ikinci genetik sebebidir.

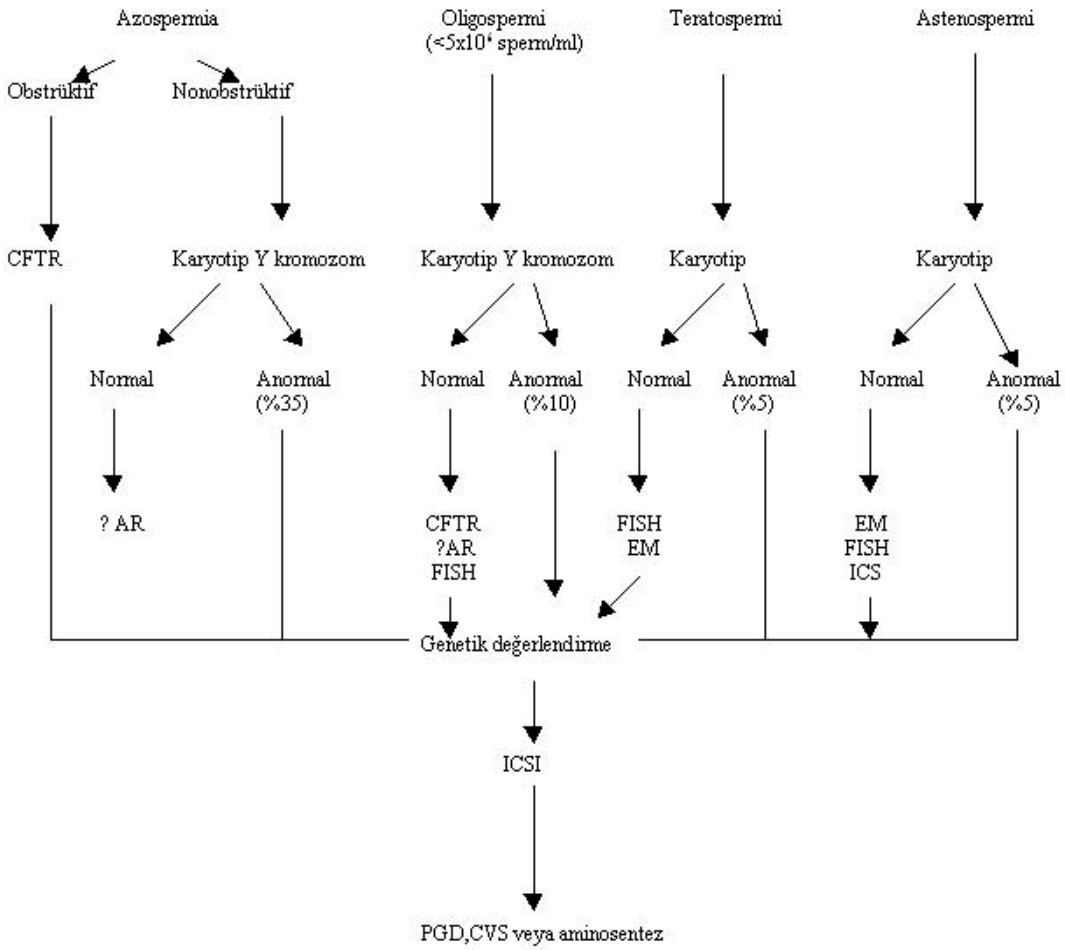
Tablo 16.6 : *Spermatogenezisle ilişkili olan genler*	
Bölge	**İlişkili gen**
AZFa	USP9Y, DBY, UTY
AZFb	RMBY, EIF1A, CDY
AZFc	DAZ

AZF: azospermik faktör

Mikrodelesyonlar tekrarlayan sekansların içindeki aynı segmentlerin homolog rekombinasyonu sonucunda türerler. Yq11 ile ilgili infertilitede azospermi faktör (AZF) iyi bilinmektedir. AZF, AZFa (proksimal), AZFb (santral), AZFc (distal) ve AZFd (AZFc nin proksimal bölgesi) gibi altgrupları vardır ve bunların herhangi bir parçasının kayıbı infertilite ve spermatogenetik varyasyonlara yol açabilmektedir. Bu bölgelerdeki transkripsiyon ünitleri (Tablo16.6) transyosyonel kontrol yoluyla spermatogenezis regulasyonu ile ilgili proteinleri (Çoğu RNA bağlayan proteinler.) kodlar. Otuzdan fazla Y kromozom geni ve gen familyası identifiye edilmesine rağmen bunların spermatogenez üzerindeki fonksiyonları tamamıyla detaylandırılamamıştır. Bununda ötesinde AZFc bölgesi parsiyel delesyon görülmesi normal erkeklerde bile izlenmektedir.

ÖZET

Günümüzde ICSI öncesi genetik değerlendirme önerilmekte, şöyle ki spermiogenezisin azaldığı veya olmadığı %35 obstrüktif olmayan azospermide (%20 anormal karyotip ve %15 genetik veya Y delesyonları) ve ciddi oligospermisi olan yaklaşık %10 erkekte (%5 anormal karyotip ve %5 genetik veya Y delesyonları) genetik açıklaması mevcuttur. Bu daha açık bir hale geliyorki spermatogenezdeki kalitatif ve kantititaif anormallikler belki non reproduktif organları ektileyen semptomları olabilir veya çok çeşitli patolojilerin fenotipi olabilir.



Şekil 16.1: *İnfertil erkekte intrastoplazmik sperm enjeksiyonu öncesi genetik değerlendirme içi algoritm. ICSI (intrastoplazmik enjeksiyon), EM (elektron mikroskopisi), CTFR (kistik fibrozis transmembran bağlayıcı gen), AR (Androjen reseptörü), PGD (preimplantasyon genetik tanı), CVS (koryonik villi sampling), FISH (floresans in situ hibridizasyon), ICS (immotil silia sendromu)*

Örnekleri şunlar ki; konjenital vas deferens olmayan erkeklerde kistik fibrozla ilişkilendirilebileceği yine immotil silia sendromu ve bazı varyantlarında ki (sperm fibröz tabaka displazisi gibi) başlangıç semptomlar bronşektazi ve kronik sinuzit; veya polikistik böbrek hastalığı veya nadir olarak spinobulber muskuler atrofi erkek infertilitesi ile ilişkilendirilebilir. Erkek infertilite-sinin birçok formunda olası genetik etoyoloji hala bilinmemektedir. Günümüzde bu modern moleküler genetik testler ve androlog/ürolog, üreme endo-kronoloğu ve genetik danışmanlığının iş birliği gerekmektedir. Zaman öyle olduki fenotip ve genetik ile ilişkisinin kapsamlı davranış ve daha fazla detaylı incelenmesi gerekli olmaktadır.

Günümüzdeki sınırlamalar erkek infertilitesi ile ilgili identifiye edilen genetik sendromlar birbirine dayandırılmamakla birlikte ICSI (ciddi erkek infertilitesi için) sonrası doğan döllerin sağlıklığı ile ilgili literatür gözden geçirilmesinde kromozomal anomalilerin genel neonatal popülasyona göre artmış olduğu gösterildi. Babalarında erkek infertilitesi olanlarda De novo seks anoploidi oranı (%0.6-%0.2) ve yapısal otozomal anomaliler (%0.4-%0.07) az miktarda artığı sonucuna inanılmaktadır.

Özet olarak ICSI yapılmadan önce idiopatik infertiliteli her erkek tamamen değerlendirilmeli ve karyotip, Y kromozom delesyonları ve androjen reseptörleri içeren minimum genetik testler planlanmalı. Azospermik ve oligoazospermik erkek hastaların her ikisinde anoploid kromozomlar veya gen defektleri taşımada artmış risk nedeniyle ek genetik bilgilendirme spermatozoada floresan in situ hibriditasyon (FISH) kullanılarak artırılabilir.

Şekil 16.1'de algoritim göstermiştir ki, infertil erkekte ICSI öncesi ve sonrası ortak genetik değerlendirilme karar verilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Shah K, et al. The genetic basis of infertility. Reproduction 2003; 126: 13
2. Brugh VM III, Lipshultz T.I. Male factor infertility: evaluation and management. Urol Clin North Am 2004; 88: 367
3. Maduro MR, Lamb DJ. Understanding new genetics of male infertility.] Urol 2002; 168: 2197
4. Hargreave TB. Genetics and male infertility. Curr Opin Obstet Gynecol 2000; 12: 207
5. Nudell DM, Turek PJ. Genetic causes of male infertility: current concepts. Curr Urol Rep 2000; 1: 273
6. Rockett JC, et al. Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. Mutat Res 2004; 549: 225
7. Patrizio P, Broomfield D. The genetic basis of male infertility. In Glover TD, Barrat LR, eds. Male Fertility and Infertility. Cambridge: Cambridge University Press, 1999: 162
8. World Health Organization. Genes and Human Disease. Geneva: WHO, 2004
9. Pitteloud N, et al. Reversible Kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 1317
10. Dode C, et al. Loss-of-funccion mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nat Genet 2003; 33: 4463
11. Oliveira LM, et al. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1532
12. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21 -hydroxylase deficiency. Hum Reprod Update 2004; 10:469
13. Cabrera MS, Vogiatzi MG, New MI. Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 3070
14. Yang RM, Fefferman RA, Shapiro CE. Reversible infertility in man with 21 -hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. Fertil Steril 2005; 83: 223
15. Belinska B, et al. De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. Nat Gener 2000; 25: 74
16. Gunay-Aygun M, et al. The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. Pediatrics 2001; 108: e92
17. Mykytyn K, et al. Bardet-Biedl syndrome type 4 {BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 8664
18. Kim JC, et al. MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. J Cell Sci 2005; 118: 1007
19. Katsanis N, Lupski JR, Beales PL. Exploring the molecular basis of Bardet—Biedl syndrome. Hum Mol Genet 2001; 10:2293
20. Burghes A, Vaessin H, Chapelle A. The land between mendelian and mtiltlfactorial inheritance. Science 2001; 293: 2213
21. Katsanis N. The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. Hum Mol Genet 2004; 13: 65
22. Beales P. Lifting the lid on Pandora's box: the Bardet-Biedl syndrome. Curr Opin Genet Dev 2005; 15:315
23. McDermott H, Walsh CH. Hypogonadism in hereditary hemochromatosis. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 2451
24. Walsh CH. Non-diabetic endocrinopathy in hemochromatosis. In Barton JC, Edwards CQ, eds. Hemochromatosis: Genetics, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 278
25. Franchini M, Veneri D. Recent advances in hereditary hemochromatosis. Ann Hematol 2005; 84: 34?
26. Worwood M. Inherited iron loading: genetic testing in diagnosis and management. Blood Rev 2005; 19: 69
27. Delague V, et al. Nonprogressive autosomal recessive ataxia maps to chromosome 9q34—9qter in a large consanguineous Lebanese family. Ann Neurol 2001; 50: 250
28. Tranebjaerg L, et al. Genome-wide homozygosity mapping localizes a gene for autosomal recessive non-progressive infantile ataxia to 20ql 1—q!3- Hum Genet 2003; 113:293
29. Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM. Hypogonadotropic hypogonadism. Sernin Reprod Med 2002; 20: 327
30. Semple RK, et al. Two novel misscnse mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 1849
31. Peeraer K, et al. Pregnancy after ICSI with ejaculated immotile spermatozoa from a patient with immorilc cilia syndrome: a case report and review of the literature. Rcprod Biomed Online 2004; 9: 659
32. Westlandet G, et al. Different fertilization rates between immotile testicular spermatozoa and immotile

ejaculated spermatozoa for ICSI in men with Kartagener's syndrome: case reports. Hum Reprod 2003; 18: 1286
33. Chemes HE. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men.] Androl 2000; 21: 799
34. Al-Bhalal L, Akhtar M. Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease. Adv Ana: Pathol 2005; 12: 126
35. Daudin M, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for generic counseling. Fertil Steril 2000; 74: 1164
36. Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. J Endocrinol Invest 2000; 23: 684
37. Patnzio P, Salameh WA. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mRNA in normal and pathological adult human epididymis. J Reprod Fertil Suppl 1998; 53: 261
38. Bernardino LF, Lima CK, Zats M. Analysis of mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in patients with obstructive azoospermia. Genet Mol Biol 2003; 26: 1
39. Patrizio P, Zielenski J. Congenital absence of the vas deferens: a mild form of cystic fibrosis. Mol Med Today 1996; 2: 24
40. Silber SJ, Patrizio P, Asch RH. Quantitative evaluation of spetmatogenesis by testicular histology in men with congenital absence of the vas deferens undergoing epididymal sperm aspiration. Hum Reprod 1990; 5: 89
41. Patrizio P, et al. Correlation between epididymal length and fertilization rate in men with congenital absence of the vas deferens. Fertil Steril 1994; 61: 265
42. Phillipson G'FM, Petrucco OM, Matthews CD. Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmk sperm injection. Hum Reprod 2000; 15: 431
43. Mulhall JP, Dates RD. Vasal aplasia and cystic fibrosis. Curr Opin Urol 1995; 32: 316
44. Casals T, et al. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. Hum Reprod 2000; 15: 1476
45. Gottlieb B, et al. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. Hum Mutar 2004; 23: 527
46. Aiman J, et al. Androgen insensitivity as a cause of infertility in otherwise normal men. N Engl J Med 1979; 300: 223
47. Hiort O, et al. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 2810
48. La Spada AR, et ai. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature 1991; 352: 77
49. Pinsky L, Beitel LK, Trifiro MA. Spinobulbar muscular atrophy. In Scriver CR, et al., eds. Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill, 2000: 4147
50. Casella R, et al. Significance of the polyglutamine tract polymorphism in the androgen receptor. Urology 2001; 58: 651
51. Patrizio P, et al. Larger trinucleotide repeat size in the androgen receptot gene of infertile men with extremely severe oligozoospcrmia. J Androl 2001; 22: 444
52. Turek PJ, Pera RA. Current and future genetic screening for male infertility. Urol Clin North Am 2002; 29: 767
53. Vogt P Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. Curr Pharm Des 2004; 10:471
54. Hortas ML, Castilla JA, Gil MT. Decreased sperm function of patients with myotonic muscular dystrophy. Hum Reprod 2000; 15: 445
55. Connor WE, et al. Sperm abnormalities in retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38: 2619
56. Tosi MR, et al. Clinicopathologic reports, case reports, and small case series: Usher syndrome type 1 associated with primary ciliary aplasia. Arch Ophthalmol 2003; 121:407
57- Perera D, et al. Sperm DNA damage in potentially fertile homozygous (3-thalassaemia patients with iron overload. Hum Reprod 2002; 17: 1820
58. Harden EM, et al. Body composition in children with sickle cell disease. Am J Clin Nutr 2002; 76: 218
59. Layman LC. Human gene mutations causing infertility. J Med Genet 2002; 39: 153
60. Hedia S, et al. Male pseudo-hermaphroditism due partial 5 alpha-reductase deficiency, a case report. Tunis Mcd 2001; 79: 261
61. AJvarez-Nava F, Soto M, Botjas L. Molecular analysis of SRY gene in patients with mixed gonadal dysgene-sis. Ann Genet 2001; 44:155
62. Eriksson A, et al. Isolation of the human testatin gene and analysis in patients with abnormal gonadal development. Mol Hum Reprod 2002; 8: 8
63. Chemes H, Muzulin PM, Venara MC. Early manifestations of testicular dysgenesis in children: pathological phenotypes, karyotype correlations and precursors stages of tumor development. APMIS 2003; 111: 12
64. Nudeli DM, Pagani R, Lipshultz LI. Indications for genetic evaluation of men in a reproductive medicine program. Braz J Urol 2001; 27: 105
65. Rives N, et al. Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and

infertile males with normal karyotypes. Mol Hum Reprod 2000; 6: 107
66. Brugh VM III, Maduro MR, Lamb DJ. Genetic disorders and infertility. Urol Clin North Am 2003; 30: 143
67. Lowe X, et al. Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefeltcr syndrome. Am J Hum Genet 2001; 69: 1046
68. HargreaveT. Genetic basis of male infertility. Br Med Bull 2000; 3: 650
69. Poulakis V, et al. Birth of two infants with normal karyotypes after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from two men with nonmosaic Klinefelter. Fettil Steril 2001; 76: 1060
70. Bergere M, et al. Biopscd testis cells of four 47.XXY patients: fluorescence in-situ hybridization and TCSI results. Hum Reprod 2002; 17: 32
71. Prabhakara MG, et al. Genetic analysis of infertile males from Bangalore, India. Presented at the 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Canada, 2004, 920/T-182
72. Rives N, et al. Meiotic segregation of sex chromosomes in mosaic and non-mosaic XYY males: case reports and review of the literature. Int J Androl 2003; 26: 242
73. Wang IY, et al. Fluorescence in-situ hybridization analysis of chromosomal constitution in spermatozoa from a mosaic 47,XXY/46,XY male. Mol Hum Reprod 2000; 6: 665
74. Tartaglia M, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. Nat Genet 2001; 29: 465
75. Van der Burgt I, Brunner H. Genetic heterogeneity in Noonan syndrome: evidence for an autosomal recessive form. Am J Med Genet 2000; 94: 46
76. Griffin DK, Finch KA. The genetic and cytogenetic basis of male infertility. Hum Fertil 2005; 8: 19
77. Antonelli A, et al. Chromosomal alterations and male infertility. J Endocrinol Invest 2000; 23: 677
78. Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. Int J Androl 2003; 26: 70
79. Hucklenbroich K, et al. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well normal spermatogenesis. Hum Reprod 2005; 20: 191
80. Mulhall JP, et al. Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997; 12: 503
81. Hoops CV, et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. Hum Reprod 2003; 18: 1660
82. Kamp C, et al. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoii-cell-only syndrome. Mol Hum Reprod 2001; 7: 987
83. Reijo R, et al. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet 1996; 347: 1290
84. Reijo R, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-hinding protein gene. Nat Genet 1995; 10: 383
85. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. EndocrRev2001;22:226
86. Affara NA. The role of human and mouse Y chromosome genes in male infertility. J Endocrinol Invest 2000; 23: 630
87. Calogero AE, et al. Spontaneous transmission from father to his son of a Y chromosome microdeletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) gene. J Endocrinol Invest 2002; 25: 631.

17

Reaktif Oksijen Türleri ve Fertilite Üzerine Etkileri

R. John Aitken, Liga E.Bennets

Çeviri: *Güldem Kilciler*[*], *Koray Erten*[**]

GİRİŞ

Gelişmiş ülkelerde 20 erkekden birini etkileyen göreceli olarak sık görülen şikâyetlerden biri de erkek infertilitesidir. Bu durumun prevelansının yanında, altta yatan patofizyoloji ile ilgili çok az şey bilinmektedir. Gerçekten, 1992 yılında terapötik olarak intrastoplazmik sperm enjeksiyonunun bulunmasından bu yana biyomedikal kurumlar bu problem üzerinde fazla durmamışlardır. Yine de, bu problemin nedeni ve tedavisi ile ilgili olası komple stratejiler etiyoloji ile ilgili hususlar ortaya konduk-ça gerçekleştirilebilir.

Kadın infertilitesinin tersine erkek nedenli infertilite de baskın olarak endokrin patolojiler yoktur. Patolojik olarak germ hücrelerine etkiler birçok infertil erkek spermatozoa üretir; yine de bu gametler sperm maturasyonu ve spermatogenesisi boyunca meydana gelen fonksiyonel defektler ile karakterizedir. Son yıllarda bu hastalardan olan spermatozoaların sadece bozulmuş fertilizasyon kapasitesinden şikâyetçi olmadığı bunun yanında hem nükleer hem de mitokondrial genomlarda yüksek oranlarda DNA hasarı gösterdiği erkek infertilitesine olan ilgide bir artış meydana getirmiştir[2–4]. Böyle bir hasarın bir olası nedeni embriyo tarafından taşınan fertilize olmuş yumurtadaki abberran DNA hasarına bağlı olarak mutasyonel yüke bağlı olabilir[5–6]. Böylece insan spermatozoasındaki yüksek oranda DNA hasarı in vivo olarak in vitro olarak azalmış fertilizasyon oranları ile birliktedir. Embriyonun bozulmuş preimplantasyon gelişimi, artmış erken gebelik kaybı oranları ve yüksek oranlarda görülen doğum sonrası morbidite ile beraberlik gösterir.

Genetik hasarı destekleyen görüşlerden biri ve belki de en önemlisi endonükleaz ile ilişkili spermatogenez esnasındaki inkomplet apopitozis sonucuna bağlı olarak oluşan DNA klivajıdır[16–18]. Ancak yeni analizlerde aberran apopitozis erkek germ hattında DNA fragmentasyonu ile korele değildir[19]. Aynı zamanda bir hipoteze göre spermiyogenezin kritik aşamasındaki defektif kromatin paketlemesinin bir sonucu olarak defektif insan spermatozoasında DNA hasarı olarak görülür. Kromatin yapısındaki defektler ya da topoisomeraz sisteminin kendi aktivitesi yüksek düzeylerde DNA fragmentasyonu gösteren gametlerin oluşmasına neden olabilir.

Gerçekten bu hipotezi destekleyen diğer bir gözlem de kromatin paketleme hataları çoğunlukla germ çizgisindeki DNA hasarı ile ilişkilidir.[21] Üçüncü bir hipotez defektif sperm fonksiyonu ve erkekteki DNA hasarı her ikisi birlikte yüksek düzeyde oksidatif strese bağlı olarak oluşmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) yoğun bir biçimde üretimi ya da maruz kalınması istatistiksel olarak bağımsız çalışmalarda sperm fonksiyonlarında defekt ya da DNA hasarı yaptığı gösterilmiştir[22–27]. Bunun öte-

[*] GATA Gastroenteroloji Bilimdalı, Ankara.
[**] GATA Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Merkezi, Bilkent, Ankara.

sinde spermatozoa daki görülen nükleer DNA hasarı, oksidatif stres belirteçleri ile apopitozis belirtilerine nazaran daha sıkı bir ilişki göstermektedir[19]. Bu ilişkiyi, defektif sperm kalitesi ile oksidatif stres, daha detaylı irdelemek için sonraki bölümde ROS kaynaksal temelleri üzerinde ve patolojileri üzerinde durmaktadır.

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE LİPİD PEROKSİDASYONU

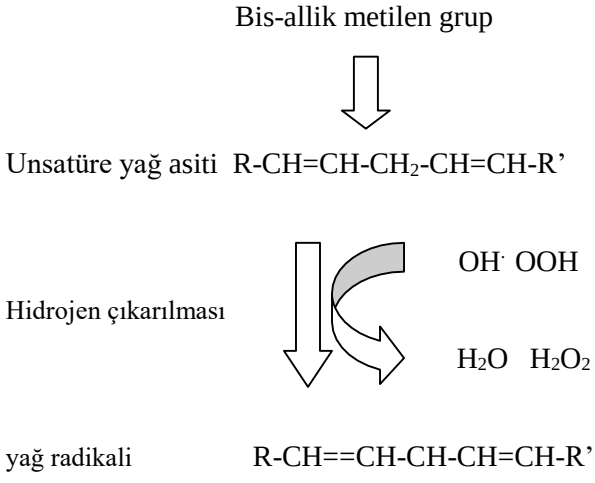
ROS kısaltması moleküler oksijenin redüksiyonu ile oluşan geniş bir metabolitleri kapsar, örneğin süperoksid anyonu ya da güçlü oksidan hidrojen peroksit gibi. Bu terim aynı zamanda oksijen ile karbon merkezli moleküllü reaksiyonları da kapsar. Örneğin peroksit radikalleri, alkoksil radikalleri ve organik hidroperoksitler şeklinde sıralanabilir, ya da diğer güçlü oksidanları refere edilebilir örneğin peroksinitrit ya da hipoklorik asit gibi bunlar aynı zamanda hayli yüksek aktif serbest radikal olan nitrik oksiti de içerebilir.

Spesifik terim "serbest radikal" anlamı çiftlenmemiş elektron içeren bir atom ya da molekül anlamına gelmektedir. Çiftlenmemiş elektronlar yüksek enerjili olduğundan ve paylaşmak için diğer elektronları aradığı için serbest radikal olarak algılanırlar. Böylece serbest radikaller ve ilişkili reaktif türler birbirleri ile reaksiyona girebilir ve farklı yapıda bir molekül oluşmasına neden olabilirler. Bunlar protein lipid ya da nükleik asit yapıda olabilir. Geniş bir aralıktaki hedefler ROS tarafından saldırıya uğrayabilmesi de bu metabolik oksijen türlerinin patolojisindeki temeli oluşturmaktadır.

Biyolojik sistemdeki en temel görülen oksijen serbest radikali O_2'dir sıvı solüsyonda bu molekül kısa yarılanma ömrüne sahiptir (1ms.) ve rölatif olarak inert dir. Bu molekül hidrofobik çevrede daha stabil ve kararlıdır. Bu sellüler membranlar tarafından sağlanır. Bu molekülün genel olarak biyolojik membranlardan temelde başarısız olduğu şeklinde yorumlanabilir. Her ne kadar bu molekül için voltaj bağımlı anyon kanallarından geçebilir diye bilinmiş olsa da, bu membran permeabilitesindeki eksiklikten dolayı, O_2 biyolojik membranlar içinde oluştuğu zaman daha fazla hasar verici olmaktadır.

Biyolojik moleküller sadece çiftlenmiş elektronlar içerdiğinden, serbest radikaller zincir reaksiyonların bir parçası da olabilirler. Bu zincir reaksiyonun klasik bir örneği biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonu olarak gösterilebilir. Bu işlemde, ROS a bağımlı bir saldırı ile unsatüre yağ asitleri peroksil ve alkoksil radikalleri oluşturur. Stabil hale gelmek için komşu karbondan bir oksijeni bırakır ve karşılık olarak bir asit oluşturur ROOH yada alkol ROH. Hidrojenin bir lipidden bırakılması karbon merkezli bir radikal oluşturur ve moleküler oksijen ile bağışlayarak diğer bir lipid peroksidi oluşturur. Stabilize etmek için sonrakinde mutlaka yanındaki lipidden bir oksijen atomu serbest bırakılmalı ve diğer bir karbon atomu oluşturmalı ve bu da moleküler oksijen ile birleşerek yani bir lipid peroksidi oluşturur. Bu bağlamda bir zincir reaksiyonda, eğer kontrol edilmezse plazma membranı boyunca peroksidatif hasara neden olur ve membran bağımlı fonksiyonların da hızlı bir biçimde kaybedilmesi ile sonuçlanır.

İnsan spermatozoasının oksidatif strese bağlı olarak kırılganlığının temel nedeni bu hücrelerin unsatüre yağ asitlerinden zengin olmasına bağlanabilir.[29] Bu membran akışkanlığı fertilizasyon için gereklidir. Bunlar akrozomal ekzositoz ve sperm oosit füzyonu olarak sıralanabilir. Ancak spermatozoa için bu unsatüre yağ asitleri oksidatif saldırıya açıktır çünkü çift bağın bulunması C-H bağlarını zayıflatır ve hidrojen bırakılması basamağını kolaylaştırır ve peroksidatif stresin oluşmasını başlatır. Aşağıda gösterilmiştir:



Bu lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları demir ve bakır gibi geçiş metallerinin bulunması, kararlılık durumlarını elektron transportları ile değiştirerek, bu reaksiyonları tetikler. Ciddi bir biçimde seminal plazma da yeterli demir ve bakır bulunması lipid peroksidasyon prosesi başladıktan sonra işlevi hızlandırır.[30] Eğer demir sülfat ve askorbat insan

spermatozoa solüsyonlarına eklenirse, geniş miktarlarda lipid peroksitler oluşur. Bu peroksidlerin büyük çoğunluğu demirin katalizlediği reaksiyonlardan meydana gelir. De novo başlangıçtan ziyade lipid peroksidasyonuna demirin katalizliği ile oluşmaktadır aşağıdaki denkleme göre;

$ROOH + Fe^{2+} \rightarrow RO + OH^- + Fe^{3+}$

Lipid hidroperoksid — alkoksil radikali

$ROOH + Fe^{3+} \rightarrow ROO^{\cdot} + H^+ + Fe^{2+}$

Lipid hidroperoksid — peroksil radikali

Böylece geçiş metallerinin eklenmesi ile oluşan lipid peroksitlerin miktarı örneğin demir, insan sperm süspansiyonlarında katalizörler eklendiği zamanki lipid peroksitleri gösterecektir. Bu hücrelerin lipid peroksit içerikleri spermatozoanın hayat döngüsü boyunca maruz kaldığı değişimlerin miktarını yansıtır. Farklılıklar bireyler arasındaki farktan meydana gelir bunlar 1) sperm plazma membranın da bulunun unsatüre yağ asitlerinin varlığı ve moleküler yapısı. 2) spermatozoanın ROS a maruziyet derecesi ve hayat hikâyesi boyunca olan metal katalizör etkisi 3) serbest radikal koruyucuları tarafından sağlanan koruma düzeyi, zincir kıran antioksidanlar ve ROS metabolize edici enzimler. Lipid peroksit yıkım ürünlerinin moniterize edilmesi örneğin malondialdehit ve veya 4 hidroksi alkenler ferroz iyonları katalizörleri varlığında inceleme de olan sperm popülasyonu ile alakalı anlamlı ve geniş miktarda veri toplanmasına neden olur[32]. Bu ölçümler yani lipoperoksidatif potansiyeli insan spermatozoası için anlamlı tanısal değer taşımaktadır[29–32].

Lipid peroksidasyona karşı koruma membranla ilişkili antioksidanların alfa tokoferol ile etkileşimi ile olmaktadır, bu vitamin alkoksil ve peroksil radikallerini etkileyerek zincir reaksiyonlarının sonlandırılmasını sağlamaktadır[33]. Bu vitamin lipid peroksidasyon kaskatını oluşturma da oldukça etkilidir. Ve spermatozoalarında yüksek düzeye lipid peroksit içeren bireylerde tedavide fertiliteyi anlamlı oranda arttırmaktadır.[34] Bunun terside bu vitaminin erkek fertilitesindeki rolü 1940 lardan beri bilinmektedir. Küçük moleküler olarak etkili diğer spermatozoa koruyucular ise vitamin C, ürik asit, triptofan ve taurin olarak sayılabilir[35.36]. Antioksidan enzim bağlamında ise spermatozoa superoksit dismutazın hem sitozolik hem de mitokondrial formunu içerir ve glutatyon siklusu enzimlerini de içerirken çok az katalaz içerir.

SOD O_2'nin mutasyon olmamasını katalizler çünkü bu molekül kendisi ile reaksiyona girerek H_2O_2 oluşturur. Ancak SOD eksikliğinde bu reaksiyon çok yavaş gerçekleşir. İnsan spermatozoasında sitosolde ve mitokondride yeteri kadar miktarda SOD bulunmaktadır eğer olmasaydı H_2O_2 aktivitesinde azalma olacaktı. Her ne kadar SOD antioksidan olarak sayılsa da bu durum ancak beraberinde sıkı şekilde bağlı olduğu bazı enzimlerin varlığında bunu gerçekleştirebilmektedir. Kısaca SOD kısa ömürlü nispeten inert membran geçirgen olmayan O_2'yi güçlü membrandan geçebilen oksidan H_2O_2'ye çevirir. Son ürün serbest radikal olmasa da, potansiyel zararlı bir moleküldür. Hızlı biçimde metabolize edilmezse sperm plazma membranında lipid peroksidasyonu başlatabilme özelliğine sahiptir. DNA hasarını tetikleyerek hem DNA hem de mitokondrial genomlarda hasarlı olabilmektedir[3,38]. Bu konu ile ilgili önemli veriler ve önyargılar ksantin oksidaz ile yapılan çalışmalardan kaynaklanmaktadır. Bu ekstrasellüler ROS u in vitro şartlarda oluşturur[39]. Bu ROS oluşturma sisteminin varlığında spermatozoalar motilitelerini hızlı bir biçimde kaybederler ve bunun nedeni de peroksidasyon defektidir. Eğer medyuma O_2'yi yok etmek üzere SOD eklenirse hareket kaybı devam eder ancak katalaz eklenirse inkube olan karışımda H_2O_2 uzaklaşacağı için lipid peroksidasyonu süprese olur ve sperm motilitesi tamamı ile tekrar sağlanabilir. bu çalışmanın sonucunda H_2O_2 majör sitotoksik moleküldür ve diğer çalışmalarda sadece hareketini etkilemediği ayrıca oositle tutunma aşamasında da negatif olarak etkili olduğu gösterilmiş ve en tehlikeli ROS türevi olarak değerlendirilmiştir[38].

H_2O_2'nin bilinen zararlı etkisine bakarak bu oksidan spermatozoadan hızlı bir biçimde uzaklaştırılarak lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı başlaması engellenebilir. Glutatyon siklusunun enzimleri peroksidaz ve redüktaz bu hücrelerdeki peroksit metabolitlerinden sorumludur. Normal şartlar altında yeterli miktarda NADPH, glikoz oksidasyonundan oluşur (heksosmonofosfat şantı yolu ile) böylece yeterli azalmış glutatyon havuzu oluşturur ve H_2O_2'ye karşı harekete destek olur bu reaksiyonlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

Glutatyon redüktaz

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH\ NADP^+$$

Glutatyon peroksidaz

$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_20$$

Burada GSSG glutatyon disülfitdir.

Ayrıca not edilmesi gereken bir nokta lipid peroksidlerin detoksifikasyonu fosfolipaz A2 gibi ek bir enzime ihtiyaç duyar. Bu enzim glutatyon peroksidin etkisini göstermesine yardımcı olur.

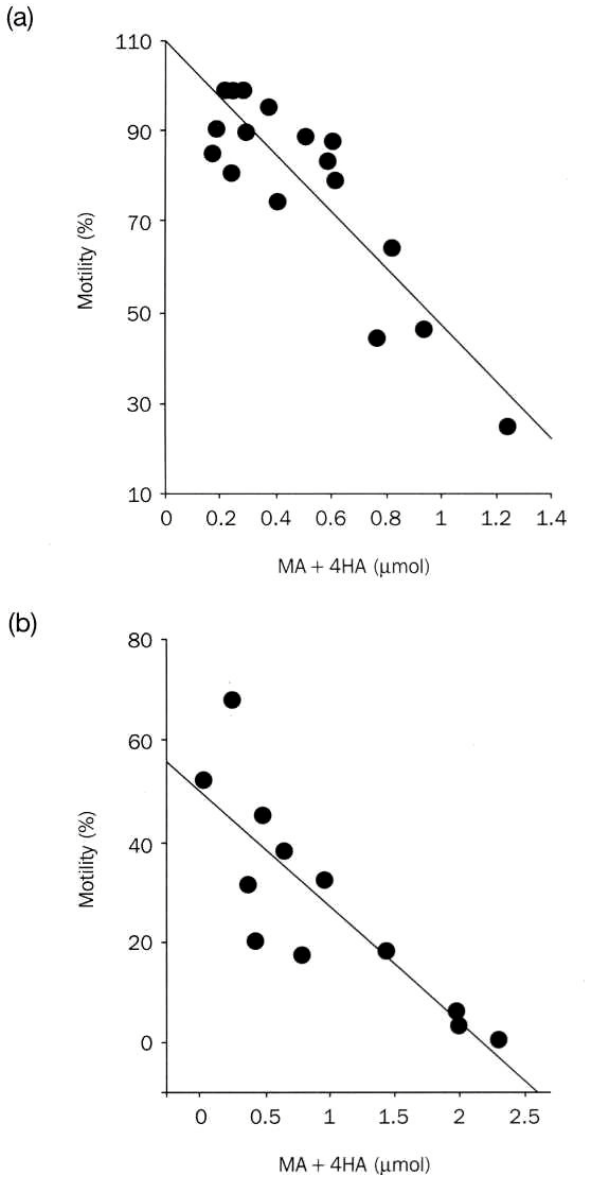
Bu intrasellüler antioksidanlara ek olarak spermatozoalar aynı zamanda hayli özelleşmiş ekstrasellüler antioksidanlar enzimler, erkek genital traktüsünden sekrete edilir. Bu enzimler glutatyon peroksidaz 5 ayrıca ekstrasellüler büyük miktarlarda SOD epididimal ve seminal plazmada bulunur.[29]

Gerçekten de seminal plazma diğer tüm vücut sıvılardan daha fazla miktarda SOD içerir. En fazla SOD eşek semeninde bulunur. Enzim aktivitesi mililitre başına 3000 dir[42].

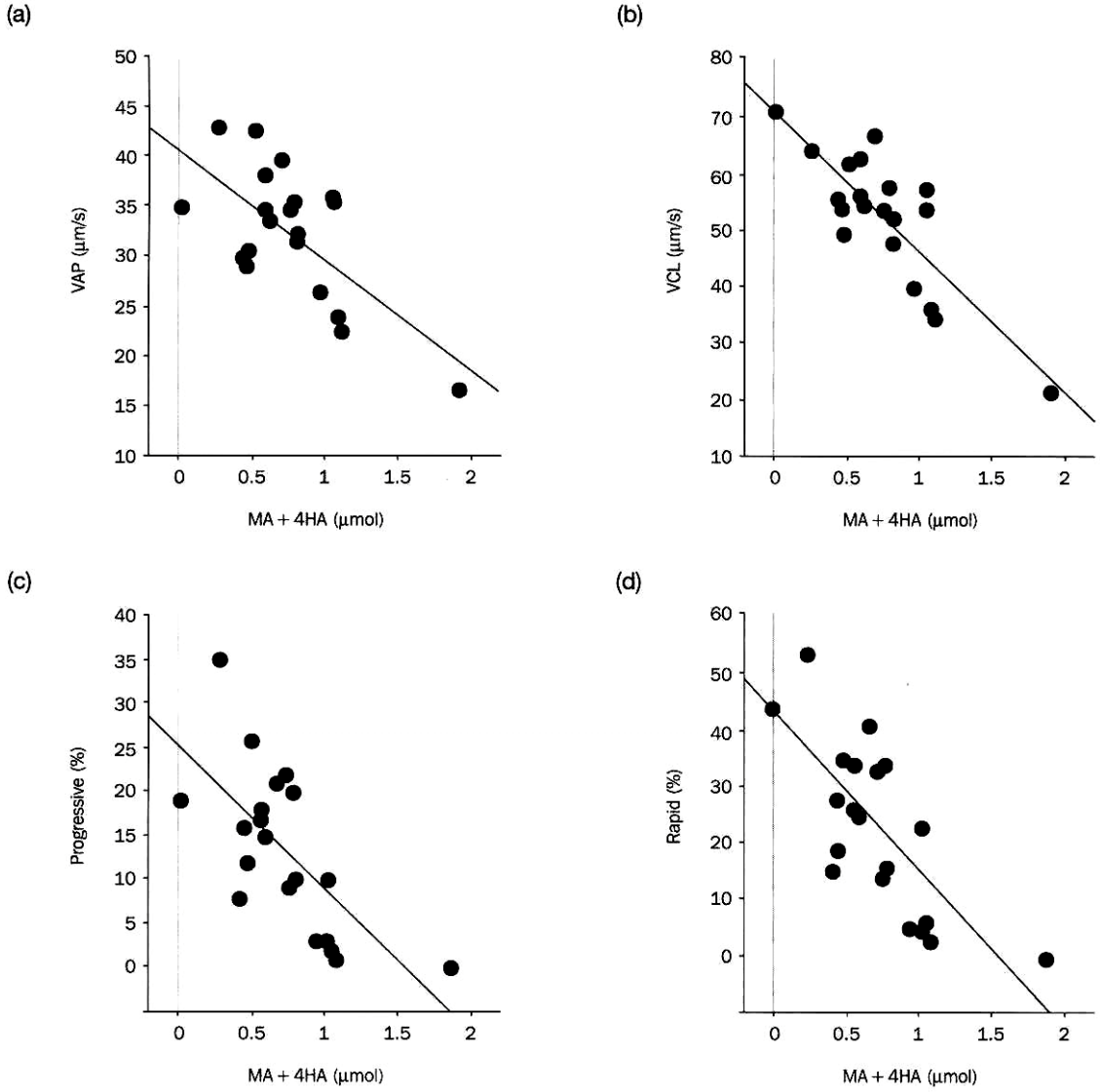
Bu konuda daha sonra görüleceği üzere semen plazmasında bulunan antioksidanlar (SOD albümin ürik asit ve vitamin C) reprodüktif sisteme giren aktive olmuş lökositlerden salgılanan ROS için koruyucudur. Bu hücre girişleri özellikte epididim distali üretra prostat ve seminal veziküllerden giriş yapar.

OKSİDATİF STRES İÇİN KANITLAR

ROS un varlığı bilinirken erkek fertilitesi için bir etiyolojik ajan olduğu da açıktır. Oksidatif stres ile bozulmuş sperm fonksiyonu arasındaki ilişkide 3 majör kaynak bulunmaktadır. İlki motilite ve sperm oosit füzyonu ile lipid peroksidasyonu arasında negatif bir ilişkinin bulunması bu ilk olarak Thaddeus tarafından Cambridge üniversitesinde ortaya konmuştur[29–43]. Bu çalışmalar daha sonra kesitsel daha geniş çaplı çalışmalar ile de ortaya konmuştur. Bu nedenle taze hazırlanmış spermatozoanın lipoperoksidatif potansiyeli ferroz iyonu katalizörlüğü varlığında hareket ve füzyon ile oldukça ilişkili olarak bulunmuştur[32,44]. Gerçekten de korelâsyonun sıkılığı nedeni ile bozulmuş motilitenin en önemli nedeni oksidatif stres olarak görülmektedir (şekil 17.1). Daha ötesinde yıkanmış lökosit içermeyen sperm süspansiyonlarının lipoperoksidatif potansiyeli sperm hareket kalitesi için orijinal ejekülata göstergedir (şekil 17.2). Bu bulgular göstermiştir ki lipoperoksidatiflerin potansiyellerin ölçülmesi hayatı boyunca spermatozoaların maruz kaldığı oksidatif stresin iyi bir göstergesidir[32,45].



Şekil 17.1: *İnsan spermatozoasında görülen hareket kaybı ve promotor varlığında MA+4HA oluşumu ile ilişkisi. spermatozoanın 37 derecede 15 saat inkübasyonu sonrası oluşan oksidatif stress (b) ksantin oksidaz içermeyen serbest radikal oluşturucu sistem tarafından oluşan oksidatif stress. MA+4HA malonaldehiti mikromol cinsinden temsil eder ve 4-hidroksi alken lerin promotor varlığında 2 saat inkübasyonu sonrası oluşması.*



Şekil 17.2: *Pürifiye sperm konsantrasyonlarının lipoperoksidasyon potansiyeli ile orijinal semen örneklerindeki sperm hareketi ilişkisi. (a)VAP (ortalama yolak ivmesi); (b) VCL (lineer eğim ivmesi (c) ileri hareketli yüzde ve (d) hızlı yüzde(>25mikrom/s). MA+4HA malonaldehiti mili mol cinsinden ve promotor varlığında 2 saat inkübasyon ile 2 x 10^7 spermatozoa tarafından oluşan 4-hidroksi aklenleri temsil eder.*

Oksidatif stres varlığı ile ilgili ikinci kanıt defektif sperm popülâsyonun da fertil hastalara nazaran infertil hastalardaki gözlenen spermatozoalardaki artmış oksidatif DNA hasarıdır[2.27.46].

Sperm DNA hasarı ile redoks aktif probların varlığında sinyal yoğunluğundaki artış bu görüşü destekler niteliktedir (luminol ve lusigenin). Klinik olarak karakterize olan örneklemeleri içeren çalışmalarda artmış kemolüminesans sinyalleri oligozoospermia olan hasta gruplarında görülmüştür. Spinal kord yaralanmasında ve varikoselde de görülmüştür. Anlamlı olarak artmış kemolüminesans sinyalleri açıklanamayan infertilite olgularında da görülmüştür.[22,51]

Önemli bir klinik çalışma luminol varlığında kemolüminesans sinyalleri olan tedavi edilmemiş bir grup hastada maksimum 4 yıllık takipte spontan gebelik açısından önemli bir çalışmadır[52]. Ancak bu veri grubunda fertilite ile semen kriterlerinin konvansiyonel hali arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu nedenle kemolüminesans ölçümleri insan sperm solüsyonların da geleneksel ölçümlere değer katabilecek niteliğe sahiptir. Bu örneklerin

önemi yardımcı üreme tekniklerinde sperm kemolüminesansı ile bu hücrelerin fertilizasyon potansiyeli arasında ters orantı olduğunu göstermesidir[53].

Bu bilgilerle rağmen kemolüminesans ile fertilite ilişkisinde belirtilmesi gereken iki uyarı bulunmaktadır. Luminol ve lusigenin ile ortaya konan biyokimyasal ilişkide şüpheler bulunmaktadır. Lusigenin ile sıklıkla kullanılan deneysel çalışmalarda, kemolüminesansın spermatozoa popülâsyonunda ekzojen elektron kaynağından NAD(P)H 54 eklenerek tetiklendiği görülmüştür. Bu şekilde uygulanan deneylerde yoğun kemolüminesans oluşturur ve bu sinyaller hücrelerin geçirgenliği ile ters olarak ilişkilidir. Lusigenin kemolüminesans kimyası karışıktır ancak buradaki kimyasal olay basitçe bir elektron redüksiyon reaksiyonudur. Bu aktivasyon enzimatik olarak sitokrom p 450 ya da sitokrom b5 redüktaz ile de sağlanabilir[56].

Bir kez aktive olduktan sonra probun ardından O_2 ile reaksiyona girerek stabil olmayan tioksetan oluşturduğu ve ışık ile kompozisyonunun ayrıştığı düşünülmektedir. Ancak indirgenmiş lusigeninin kendi başına da zemin düzenindeki oksijeni etkileyerek bir elektron redüksiyonu yaratabileceği ve O_2 oluşturabileceği tahmin edilmektedir ve böylece anaç lusigenin molekülü oluşmaktadır. Eğer lusigenin konsantrasyonu reaksiyon karışımında NADPH ile birlikte yeterli miktarda yüksek ise bu redoks döngüsü davranışı sonuç olarak yüksek miktarlarda O_2 molekülü oluşturma potansiyeline sahiptir. Sonuç olarak bu durumda hangi oranda kemolüminesans oluşumunun lusigenin ve NADPH varlığında primer O_2 üretimi ile oluştuğunu ya da probun redoks döngüsü ile sekonder metabolitleri ile oluştuğu konusunda emin olamamaktayız. Eğer sonraki açıklama doğru ise anormal düzeyde yüksek redüktaz aktivitesi infertil erkeklerin spermatozoasında vardır şeklinde değerlendirme yapılabilir[58].

Luminol durumunda ise prob bir elektron oksidasyonuna uğramalıdır ve bu şekilde aktive hale gelmelidir. Birçok şekilde lusigenine göre luminol daha güvenli bir probudur ve lökosit kontaminasyonu sonucunda oluşan ROS kaydını alabilmek için etkili bir biçimde kullanılmaktadır[59,60]. Yine de ikinci nokta burada yatmaktadır: kontamine edici lökositlerin varlığında sonuçlar hangi dereceye kadar etkilenmektedir.

OKSİDATİF STRESİN KAYNAKLARI

Her ne kadar bu alandaki birçok çalışma lökosit içeren spermleri dışarıda tutarak yapılmış olsa da basitçe ($1x10^6$/ml) bu açıkça lökosit kontaminasyonu içermeyen veriler anlamına gelmemektedir. Semenlerde en fazla bulunan lökosit olan nötrofil spermatozoana nazaran ROS oluşturma konusunda 1000 kat daha aktiftir, lökospermi eşiği altındaki lökosit konsantrasyonlarında yıkanmış sperm solüsyonları ile ROS oluşumu konusunda hayli yüksek korelâsyonlar elde edilmektedir ve r değeri 0,8 olarak verilmektedir. Bunlara rağmen bu sonuç spermatozoaların ROS oluşturamadıkları anlamına gelmemelidir.

Her ne kadar birçok yayında oluşan kemolüminesans sinyallerinin yıkanmış sperm solüsyonları ile kullanıldığında spermatozoa ya da kontamine eden lökositlerden kaynaklandığı belirtilmiş olsa da aslında her iki ROS kaynağı da aktif olarak çalışmaktadır. PMA'nın oluşturduğu kemolüminesansa karşın lökosit sayıları şekil 17.3'de verilmektedir. Ve burada redoks aktivitesinin fark edilebilir lökosit kontaminasyonu olmaksızın büyüklükte değişkenlik gösterebileceğini belirtmektedir. Ancak lökositlerin varlığında kemolüminesans aktivitesi oldukça yüksektir. Ejekülata da spermatozoaların katılımını oksidatif stres bağlamında ortadan kaldırmak için tüm lökosit kontaminasyonu örnekleri sperm süspansiyonundan uzaklaştırılması büyük önem taşımaktadır. Etkili lökosit tespiti ile ilgili protokoller bulunmakta bu hücrelerin selektif olarak para magnetik partiküllerin anti CD45 ile kaplanması metodu ile ayrıştırılabilmektedir. Bu da ortak lökosit antijenidir. Ancak bu kurallara uyan çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

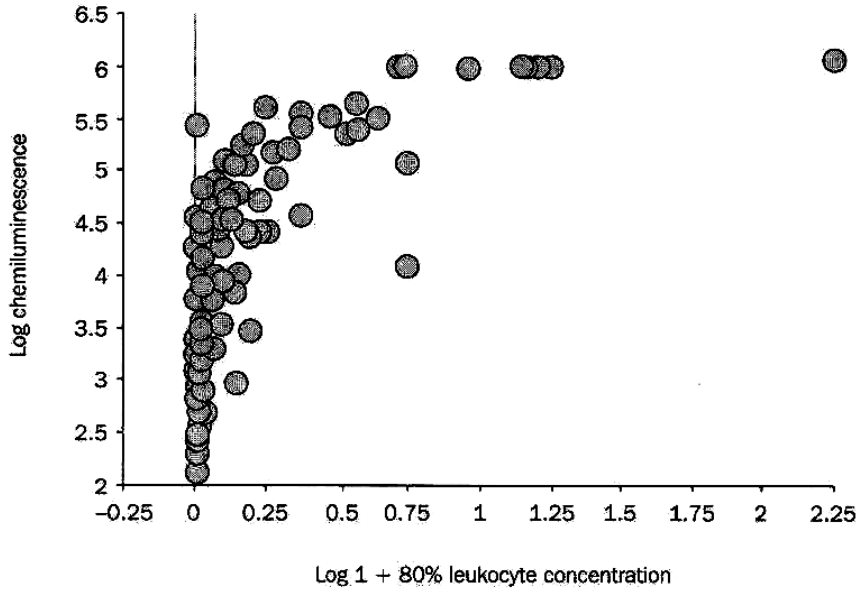
Ancak bu kurallar sağlandığı zaman redoks aktivitesinin defektif spermatozoaya bağlı olarak ortaya çıktığı bulunmuştur[49]. Yakın zamanda ki bir çalışma da lökosit içermeyen sperm solüsyonları güçlü protein kinaz C agonisti olan 12 myristat, 13 asetat forbol esteri (PMA) tabi tutulmuşlardır. Sonuç olarak güçlü bir biçimde spermatozoa kalitesi ile kaydedilen kemolüminesans sinyali arasında ters ilişki olduğu bulunmuştur. Özellikle de motilite ile ilgili olarak[32]. Bundan daha önemlisi bu ölçerler ile sperm morfoloji bağlamında orijinal sperm morfoloji, sayı ve hareketliliği örneği ile sıkı ilişkiler olduğu gösterilmiştir (şekil 17,4)[32]. Diğer bir deyişle spermatozoanın oluşturduğu ROS kantitivitesinin ölçülmesi sadece bu hücrelerin kalitesini göstermez

aynı zamanda altta yatan spermatogenik proçesin kalitesini de yansıtır

Neden spermatozoanın başlangıçtaki ROS oluşturma kapasitesi bilinmemektedir. Bir olasılık spermlerdeki mitokondrial defektlerden oksidatif stres oluşmakta olmasından dolayı olabilir. mitokondrialar elektron transport zinciri sayesinde elektron transportunu yönlendiren çok gelişmiş organellerdir ve böylelikle ATP enerjisi oluştururlar. Bu elektron transport aktivitesi ile ilgili problem elektronların ETC'den dışarı çıkmaya meyilli olması ve böylelikle oksijenle birleşerek 02- oluşturma eğilimi olmasıdır. Mitokondri yanında bu nedenle fazla miktarda ROS oluşturuyor olabilir ve bu da infertil erkeklerdeki oksidatif stresin kaynağı olabilir. Ancak bu iddiayı kanıtlamaya çalışan çalışmalarda ETC inhibitörlerinin defektif spermatozoa solüsyonlarına eklenmesi ile oluşan kemolüminesans sinyalleri üzerinde etkili olmaması ile başarısız olmuştur[22]. Ancak oluşan ROS un kontamine eden lökositlerce oluşturabileceğini ekarte edemediklerinden bu iddia hali hazırda dikkatli bir araştırma gerektirmektedir.

Diğer bir olasılık ROS oluşturan defektif sperma tozoa'nın morfolojik defektlere neden olduğudur özellikle de hücrenin orta kısmında hasara neden olduğu şeklinde. Normal spermiogenezis boyunca sertoli hücreleri sperm sitoplazmasını bu hücreler germinal epitelden salgılanmadan hemen önce aktif olarak uzaklaştırır. Birçok memelide rezidüel sitoplâzma olması spermiyogenezis boyunca yeniden modellenerek epididimal transport boyunca kuyrağa doğru bir damlacık şeklinde ve sferik ve yarım şekilli olarak migrate olur. İlgi çekici şekilde spermatozoa stoplazmik damlacığı oluşturma ve saçma özelliğini kaybeder. Bu hücrelerde rezidüel stoplasma spermiyasyondan sonra tekrar spermatozoanın boyun bölgesine ilerler ve orada kalır. Bu yoğun rezidüel sitoplâzmanın bulunması ROS oluşumu ile korele olduğu birçok çalışma yapan grup tarafından gösterilmiştir[69,70]. Bu rezidüel sitoplâzmanın ROS oluşturması ile ilgili bir olası mekanizma sperm yüzeyindeki fazla substratın farz edilen NADPH oksidaza dönüşmesinden olabilir.

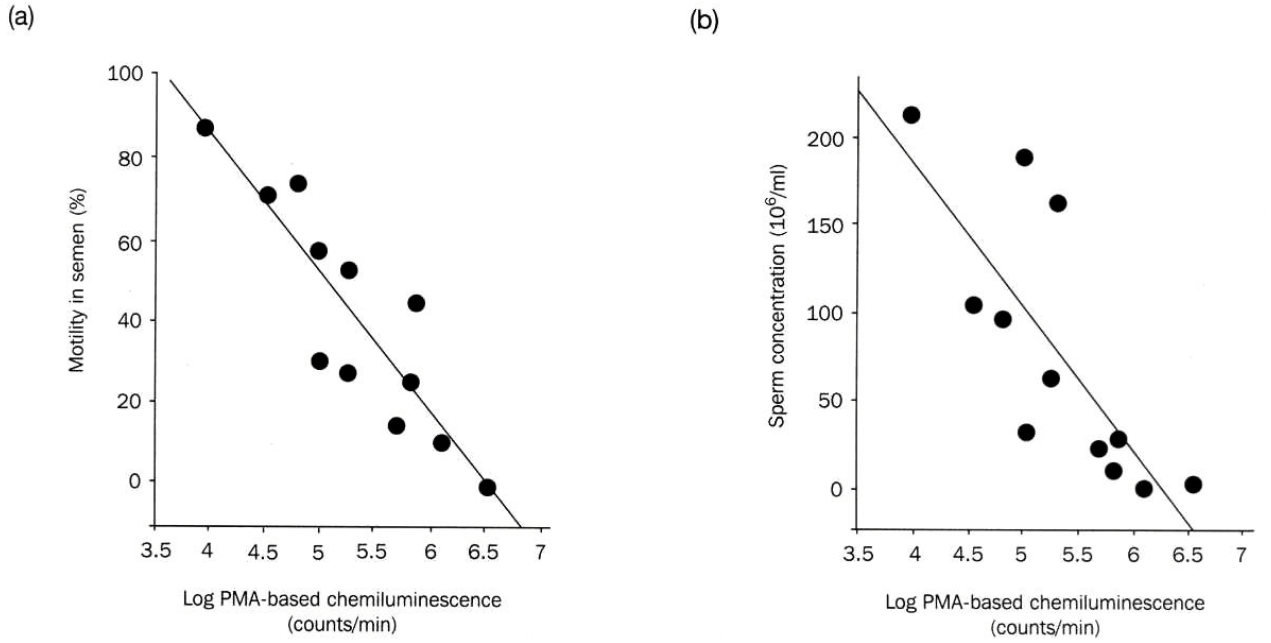
Pürifiye sperm solüsyonlarında ROS üretimi SOD kreatinin kinaz glikoz 6 fosfat dehidrogenaz gibi sellüler içerik enzimleri olan enzimler ile hayli yüksek korelasyon gösterir. Birçok enzim sitoplazma içinde bulunduğundan sperm popülasyonundaki fazla rezidüel sitoplazma yüksek düzeylerde ROS oluşturur[67,68]. Ancak bir hipoteze göre patoloji anlamında anahtar enzimin glikoz 6 fosfat dehidrogenaz olduğu düşünülmektedir[5,67,71]. Bu



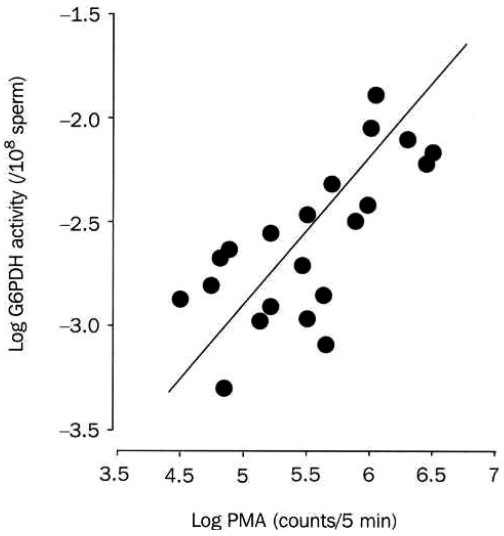
Şekil 17.3: *12-myristat, 13 asetat forbol esteri (PMA) ile indüklenmiş, Luminal peroksidaz ile yönlendirilmiş kemolüminesansa karşın lökosit yoğunlaşması. Burada lökosit kontaminasyonu olmadığı zaman örneklemelerde oluşan kemolüminesansın değişimine dikkat ediniz.*

enzim hekzos monofosfat şantı yardımı ile glikozun oksidasyonunu sağlar. Bu da NADPH oluşturarak ROS oluşumu için gerekli yakıt olan NADPH oksidaz için gereklidir. Örneğin nox 5 gibi bir enzim erkek germ hücresinde yakın zamanda bulunmuş olan serbest radikal oluşturucu oksidaz enzimdir[72]. Bu NADPH ile ROS oluşumu arasındaki ilişki Pürifiye insan sperm konsantrasyonlarında ki yüksek düzeyli glikoz 6 fosfat varlığı ile de desteklenmektedir.

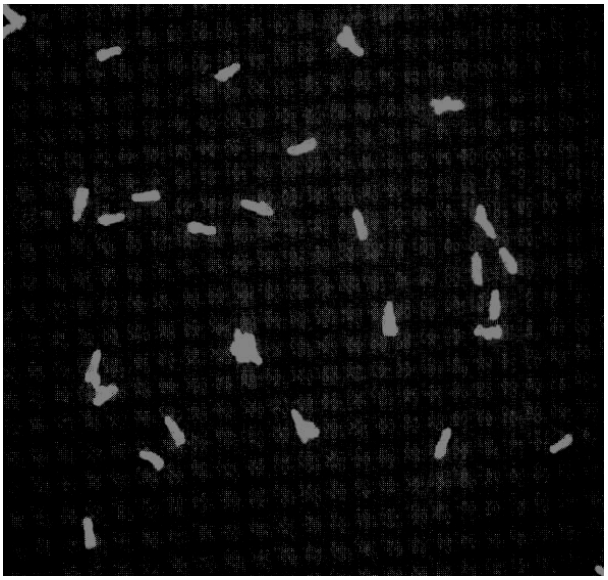
Şekil 17.5; Spermiyogenezis boyunca sperm sitoplâzmaların çoğunun atılması, testlerde bu hücrelerin sınırlı sayıda NADPH kaynağı oluşturduğunu göstermektedir. Ancak koruyucu glutatyon döngüsünün ihtiyaçlarını karşılayacak kadar ve sperm kapasitasyonunun ROS bağımlı elemanlarını desteklemeye yetecek kadarını karşılayabilmektedir[73–76]. Ancak eğer fazla rezidüel sitoplâzma spermiyogenezisteki bir hatadan dolayı ise (şekil 17,6) o zaman bu hücrelerin fonksiyonel işlevselliğini bozacak potansiyelde ek ROS oluşumu olabilir.



Şekil 17.4: *12 myristat, 13 asetat forbol esteri (PMA) ne karşın Pürifiye lökositsiz örneklerdeki oluşan kemolüminesans yoğunluğu ile (a)semendeki motil hücrelerin yüzdesi ve (b) semendeki sperm sayısı ile yansıtılan orijinal kaliteli semen örnekleri arasındaki ilişki.*



Şekil 17.5: *Kemolüminesans ve glikoz 6 fosfat dehidrogenazın hücresel içeriği. fazla rezidüel sitoplazmanın bulunması stoplazmik enzimlerin hücresel içeriğini arttırır, bunların varlığı redoks aktivitesi ile korelasyon gösterir ve 12 myristat ve 13 asetat forbol esterine cevaben gösterilir*



Şekil 17.6: *Diaforaz aktivitesi sonrasında sitoplazmanın gösterdiği boyanma her bir spermatozoa, spermiyasyon sonrasında rezidüel sitoplazma varlığında anlamlı varyasyon gösterir.*

OKSİDATİF STRESİN ÖNEMİ VE SONUÇLARI

Yukarıdakilerin ışığında ejekülata iki oksidatif stres kaynağı olduğu sonucuna varılabilir: lökosit ve defektif spermatozoa. Seminal lökositlerin etkisi bulunan lökosit tipine, giriş yerine ve aktivasyon durumuna bağlıdır. Mevcut veriler ile majör lökosit tipi nötrofildir ve bu hücreler spermde aktive halde bulunmaktadırlar[61,62]. Bunların buraya nasıl girdikleri belli değildir. Ancak çoğunlukla lökosit infiltrasyonunun bir sonucu olabilir. Sekonder seks glandı enfeksiyonuna bağlı olarak eğer lökositlerde vaz deferens yakınından girmişlerse sperm fonksiyonu üzerine etkisi sınırlı olacaktır. Çünkü bu aşamada spermatozoa seminal plazmadaki güçlü anti oksidanlar ile korunuyor olmalıdır[61]. Tersine nötrofiller rete testis ya da epididim tarafından girmişlerse bu durumda spermatozoa da oksidatif stres oluşturacaklardır.

Serbest radikal oluşturan lökositler yıkanmış preparasyonlarda spermatozoa ya saldırabilirler. Gerçekten albümin ve fenol kırmızısından başka in vitro fertilizasyon medyaları protektif antioksidanlardan yoksundur. Bazı medyalar geçiş metalleri ile desteklendiğinden örneğin demir ve bakır gibi bunlarda peroksidatif spermatozoaya neden olabilirler. Yıkanmış sperm solüsyonların da aktive lökositlerin varlığında spermatozoanın fertilizasyon kapasitesi süprese olur[62]. Bu nedenle yardımcı üreme tekniklerin de nötrofillerin negatif etki yaratması olağandır[65.66].

İnsan ejekülatında bir diğer ROS kaynağı spermatozoanın kendisidir[49.68.69]. Bu intrasellüler serbest radikal oluşumu tüm sperm fonksiyonlarının etkilenmesi ile birliktedir. Motilite akrozomal ekzositoz için kapasite, oosit ile füzyon için membran birlikteliği ve DNA birleşimi gibi aşamalarda hasar oluşabilir[6,27]. Yukarıda vurgulandığı şekilde fazla serbest radikal oluşumu normal olarak spermiyogenezisdeki defektler ile ilişkilidir. Ve bu da fazla rezidüel sitoplâzmanın hücre ortasında kalmasına sebep olur. Yine spermatozoa tarafından fazla ROS oluşumu çevrede bulunan ksenobiotiklerin redoks tepkimesine girmesi ile ya da mitokondrial ETC'deki defektlere bağlı olarak ortaya çıkabilir[6]. Eğer defektif spermatozoa aktif olarak testisleri terk ettiği andan itibaren serbest radikal oluşturursa bu durumda aynı sperm popülasyonundaki diğer spermlere de hasar verebilir.

SONUÇ

Özet olarak oksidatif stres defektif sperm oluşumu ile ilgili en önemli etmendir. Bu hücrelerde serbest radikal saldırıları sperm nükleusundaki DNA'yı hasara uğratır ve sperm plazma membranındaki lipid peroksidasyonunu indükler. Bu değişimlerin bir sonucu olarak spermatozoa fertilizasyon kapasitesini ve normal embriyonik gelişim desteğini kaybeder[6]. Oksidatif stresin orijini de lökosit infiltrasyonu, spermatozoa tarafından oluşan fazla serbest radikal ve bu hücreler erkek genital sistemindeki seyahatleri boyunca uygulanan antioksidan korumadaki defektler olarak sayılabilir. Bu alanda daha ileri boyutlarda yapılacak çalışmalar sayesinde erkek reprodüktif sistemindeki oksidatif stresin etkilerini anlamamızı daha fazla yardımcı olacaktır. Ve böylelikle de bu duruma karşı koruyucu önlemleri alma konusunda da rasyonel yaklaşımların geliştirilmesine neden olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Palermo G, ec al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17
2. Irvine DS, et al. DNA Integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl 2000; 21:33
3. Sawyer DE, et al. Analysis of gene-specific DNA damage and single-strand DNA breaks induced by pro-oxidant treatment of human spermatozoa in vitro. Mutat Res 2003; 529: 21
4. Lewis SEM, Aitken RJ. Sperm DNA damage, fertilization and pregnancy. Cell Tissue Res 2005; in press
5. Aitken RJ. The human spermatozoon - a cell in crisis? The Amoroso Lecture. J Reprod Fertil 1999; 115:1
6. Aitken RJ. Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. Reprod Fertil Dev 2004; 16:655
7. Aitken RJ, Krausz CG. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122; 497
8. Sakkas D, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998; 13: 11
9. Duran EH, et al. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. Hum Reprod 2002; 17: 3122
10. Morris ID, et al. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophore-sis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Hum Reprod 2002; 17: 990
11. Carrell DT, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. Obstet Gynecol 2003; 101: 1229
12. Loft S, et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. Hum Reprod 2003; 18: 1265
13. Saleh RA, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. Fertil Steril 2003; 79 (Suppl 3): 1597
14. Bungum M, et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. Hum Reprod 2004; 19: 1401
15. Vlrro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril 2004; 81: 1289
16. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnotmal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the fas-mediated pathway. Exp Cell Res 1999; 251: 350
17. Sakkas D, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev Reprod 1999; 4: 31
18. Sakkas D, et al. Natute of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. Biol Reprod 2002; 66: 1061
19. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phospharidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15: 1338
20. Sakkas D, et al. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. Biol Reprod 1995; 52: 1149
21. Manicardi GC, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A(3) accessibility. Biol Reprod 1995; 52: 864
22. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. The Walpole Lecture. J Reprod Fertil 1987; 83; 459
23. Aitken RJ, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa, the balance of benefit and risk. Bioessays 1994; 16: 259
24. Aitken RJ, Krausz CG. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122: 497
25. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. Nature 2004; 432: 48
26. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 1996; 48: 835
27. Henkel R, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertil Steril 2005; 83: 635
28. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press, 1999
29. Jones R, Mann T, Sherins RJ. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. Fertil Steril 1979; 31: 531
30. Kwenang A, et al. Iron, ferririn and copper in seminal plasma. Hum Reprod 1987; 2: 387
31. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. Mol Reprod Dev 1993; 35: 302
32. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spcctro photo metric assay for the measurement of malon-dialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. Int J Androl 1998; 21: 81

33. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod 1989; 40: 183
34. Suleiman SA, et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. J Androl 1996; 17: 530
35. Rhemrev JP, et al. Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a postaddition assay in human seminal plasma and the antioxidant contributions of various seminal compounds. J Androl 2000; 21:913
36. van Overveld FW, et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. Chem Biol Interact 2000; 127; 151
37. Afvarez JG, et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. J Androl 1987; 8: 338
38. Aitken RJ, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998; 59: 1037
39. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase oxidant generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. J Reprod Fertil 1992; 97: 441
40. Storey BT, Alvarez JG, Thompson KA. Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. Mol Reprod Dev 1998; 49: 400
41. Vernet P, et al. In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. Biochem Cell Biol 1996; 74: 125
42. Mennella MRF, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation reactions in semen. Biochem J 1980; 191: 289
43. Jones R, Mann T, Sherins RJ. Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. Proc R Soc LondB 1978; 201: 413
44. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. J Reprod Fertil 1993; 98: 257
45. Kodama H, et al. Increased deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril 1997; 65: 519
46. Henkel R, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. Reprod Biomed Online 2003; 7: 477
47. Aitken RJ, et al. Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. Mol Hum Reprod 2003; 9: 645
48. Aitken RJ, et al. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. J Reprod Fertil 1992; 94: 451
49. De Lamirande E, et al. Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. Fertil Steril 1995; 63: 637
50. Hendin BN, et al. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. J Urol 1999; 161: 1831
51. Pasquaiotto FF, et al. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. J Androl 2001; 22: 316
52. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 542
53. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Int J Androl 2003; 26: 279
54. Aitken RJ, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. Mol Reprod Dev 1997; 47: 468
55. Said TM, et al. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Fertil Steril 2005; 83: 95
56. Baker MA, et al. Identification of cytochrome P450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations. Biol Reprod 2004; 71: 307
57. Afanasiev IB, Ostrachovich EA, Korkina LG. Lucigenin is a mediator of cytochrome C reduction but not of superoxide anion production. Arch Biochem Biophys 1999; 366: 267
58. Aitken RJ, Baker MA, O'Bryan MK. Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. J Androl 2004; 25: 455
59. Aitken RJ, West K. Relationship between reactive oxygen species generation and leucocyte infiltration in fractions isolated from the human ejaculate on Percoll gradients. Int J Androl 1990; 13: 433
60. Aitken RJ, et al. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. HumReprod 1995; 10:2061
61. Aitken RJ, West K, Buckingham D. Leukocyte infiltration into the human ejaculate and its association widi semen quality, oxidative stress and sperm function. J Androl 1994; 15:343
62. Allamaneni SS, et al. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species

levels in whole semen and isolated spermatozoa. Fertil Steril 2005; 83: 800
63. Williams AC, Ford WC. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. Fertil Steril 2005; 83: 929
64. Aitken RJ, et al. On the use of paramagnetic beads and ferrolluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. Am J Reprod Immunol 1996; 35: 541
65. Krausz C, et al. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization in vitro. Fertil Steril 1994; 62: 599
66. Krausz C, et al. Analysis of the interaction between N-formylmethionyl-Ieucyl phenylalanine and human sperm suspensions, development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leucocytes. Fertil Steril 1992; 57: 1317
67. Gomez E, et al. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress and sperm function. J Androl 1996; 17: 276
68. Gil-Guzman E, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod 2001; 16: 1922
69. Ollero M, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. Hum Reprod 2001; 16: 1912
70. Zini A, et al. Human sperm NADH and NADPH diaphorase cytochemistry: correlation with sperm motility. Urology 1998; 51: 464
71. Aitken RJ. A free radical theory of male infertility. Reprod Fertil Dev 1994; 6: 19
72. Banfi B, et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. J Biol Chem 2001; 276: 37594
73. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. Free Radic Biol Med 1993; 14: 157
74. de Lamirande E, Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. Free Radic Biol Med 1995; 18: 487
75. Aitken RJ, et al. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. J Cell Sci 1998; 111: 645
76. Aitken RJ, et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. J Cell Sci 1995; 108:2017
77. Gomez E, Aitken J. Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa. Fertil Steril 1992; 65: 880

18

Erkek Subinfertilitesinin Tanımlanması ve Genel Populasyondaki Oranı

T. Igno Siebert, F. Haynes van der Merwe, Thinus F. Kruger, Willem Ombelet

Çeviri: *Murat Yıldız*[*]

GİRİŞ

Fertil erkek ile subfertil erkek ayırımında birçok semen parametresi kullanılmıştır. En sık kullanılanlar sperm konsantrasyonu, hareketliliği, ileri hareketliliği ve sperm morfolojisidir. Bu parametrelerden sperm morfolojisi literatürde üzerinde en çok tartışma olandır. Normal ve anormal spermatozon kararı verebilmek için birçok klasifikasyon sistemi tanımlanmıştır. Sperm morfolojisi için en yaygın kullanılan sistem WHO Dünya Sağlık Örgütünün 1987 ve 1992'deki klasifikasyonu[1,2] ve Tygerberg strik kriterleri olup, bu 1999'dan beri WHO tarafından kullanılmaktadır[3-6].

Semen parametreleri ile erkek fertilite potansiyeli arasında doğru orantılı bir ilişki olmasına rağmen; WHO kriterlerine göre fertil ve subfertil erkek ayırımının yapılmasında, fertilite/ subfertilite sınır değerlerinin klinik değeri azdır[7-11]. Eğer bu kriterler göz önüne alınarak değerlendirilme yapılırsa (spermiogram testi zamanında, kısa zaman öncesinde veya sonrasında eşi gebe olmasına rağmen) birçok fertil erkek, subfertil olarak sınıflandırılır. Strik kriterleri kullanılarak yapılan sperm morfolojisinin invitro fertilizasyonda (IVF) ve intrauterin inseminasyondaki (IUI) tanısal değeri gözden geçirilmiş ve yararlı olduğu ispatlanmıştır[12,13]. Bu kriterlerin invivo fertilizasyonda kullanımı hakkında basılmış yayınlar daha azdır.

Bu bölümde semen parametrelerinin klasifikasyon sistemleri ve invivo fertilite potansiyelleri hakkındaki İngilizce literatürü ele alacağız. Aynı zamanda WHO 1999 yön gösteriminde yer alan kriterlerin fertilite / subfertilite eşik değerlerini yayınlar eşliğinde ele alacağız[3-6]. Bu eşik değerler erkeğin başarı şansının önemli derecede düşük olmasından ziyade, klinik ve invivo durumlarında erkeğin fertilite potansiyelini belirlerken anlamlı değerleri işaret etmeli.

ERKEK FERTİLİTE POTANSİYELİ VE WHO 1987 VE 1992 KRİTERLERİ

Klinik pratikte semen analizi erkeğin fertilite potansiyelini belirlemede kullanılır. Klinik değerinden dolayı metot standardize edilmiş ve fertilite/ subfertilite tanımlaması için standart semen analizinde kullanılan çeşitli parametreler hesaplanmıştır.

Semen değerlendirilmesinde birçok değişik metot olması nedeniyle, analizde kullanılacak standardize metodu bulmak zor olmuştur. Bu uygulama özellikle sperm morfolojisi hakkında karar vermede kullanılır. İki klasifikasyon sitemi yaygın olarak kabul görmüştür. Bunlar WHO[1,2] ve

[*] Özel Lokman Hekim Hastanesi, Üroloji Servisi, Etlik, Ankara.

Tygerberg strik kriterleridir[3-6]. Sperm morfolojisi hakkında değişik metodolojik problemler tanımlanmıştır. Ombelet ve ark.[14-16] ve bazı yazarlar[17,18] tarafından morfolojik değerlendirmede, değişik metotlar arasında uyumsuzluklar belirlenmiş ve semen analiz metotlarının standartlaştırılmasını önermişlerdir. Bazı otörler WHO tarafından önerilen gibi kabul edilmiş standartlara uygun laboratuarları önermişler[17,18]. Diğer problem sperm morfoloji değerlendirilmesinde laboratuarlar arasında, tetkikler arasında ve tetkikin kendi içinde olan uyumsuzluklardır[18,19]. Bu problem Tygerberg strik kriterlerinin kullanılması ile belirmiş olup Menkveld ve ark.'ları muellliflerin bu method kullanarak yapılan incelemelerindeki sonuçların, daha güvenilir ve karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir[19]. Franken ve arkadaşları kesin sperm morfolojisinin değerleri hakkında devamlı kalite kontrol programı üzerine çalışmışlar meydana getirdikleri çalışmaları göstermişler ve androloji laboratuarları arasında global bir kalite kontrol programı gibi standartların oluşturulması için yoğunlaşmışlardır[20,21]. Cooper ve ark.[18] da bu tip kalite programlarının standardizasyonunun ve kalite kontrol merkezlerinin birbiriyle görüş birliğine ulaşmalarının aciliyetine belirtmiştir.

Daha önceki WHO sperm morfolojisi değerlerinin %50 ve %30'u deneyimsel tecrübeye dayanıyor olup herhangi bir klinik veriye dayanmamaktaydı. Birçok otör bu değerlerin klinik anlamının olmadığını veya çok az olduğunu buldu[7,9,10]. Bunun yanında çalışmalar göstermiştir ki, yüksek orandaki normal morfolojisi olan spermlerle fertilite veya gebelik artışı arasında doğru orantı vardır[22-25].

Van Zyl ve ark.[25] ilk kez normal sperm oranının %4'den az olduğunda fertilite hızının aniden düştüğünü göstermişlerdir. Eggert-Kruse ve ark.[23] strik morfoloji değerlendirme kriterleri kullanarak yaptıkları çalışmada, normal sperm oranlarındaki sınır değerlerinin %4, 7 ve %14 olduğunda invivo gebelik oranlarının daha da yüksek olduğunu bulmuştur. Zinaman ve ark.[26] sperm morfolojisinin (strik kriterlerinin) değerinin invivo gebelik oranında bariz düşüş olmasını, normal sperm oranı %8'in altına düştüğünde ve sperm sayısı 30 milyon/ml altına düştüğünde göstererek teyit etmişlerdir. Slama ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada[27] semen parametreleri ve gebelik için geçen zaman arasındaki ilişkiyi ölçmüşler, onlara göre gebelik zamanını etkileyecek normal sperm oran sınır değerinin %19 olduğunu göstermişlerdir. Bu değer diğer çalışmalarda bulunanlardan daha yüksektir.

SPERM PARAMETRELERİNİN IVF VE IUI PROGRAMLARINDA KULLLANIMI

Normal sperm morfoloji oranı (strik kriter) IVF ve IUI programlarında pozitif tahmin değerine sahiptir. Normal sperm morfolojisi sınır değeri %5 ve %14 olarak ele alındığında; IVF için pozitif tahmin değerini oluşturmuş olup tüm fertilizasyon oranı ve genel gebelik oranı ele alındığında; normal morfoloji oranı %5'den küçük olanlar ile %5'den büyük veya eşit olan gruplar arasında önemli artış mevcuttur[12]. IUI programları arasında yapılan metaanalizde normal sperm morfolojisi %5'den büyük veya eşit olan grupta her siklus başına gebelik oranının yüksek olduğu gösterilmiştir. Normal sperm morfolojisi %5'den küçük olan grupta diğer semen parametreleri IUI başarısını belirler[13]. IUI metaanalizinde, motilite[28], total motil sperm sayısı[29] ve konsantrasyonu[30] değerlendirilen bazı çalışmalarda rol oynamakta olup, diğerleri[31] sperm morfolojisinin prognoz için tek başına yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Yardımcı üreme tekniklerinin yüksek maliyeti nedeniyle erkeğin invivo koşullarda iyi veya kabul edilebilir fertilite potansiyeline sahip olması temel semen kalitesi ile belirlenmelidir. Buna karşın kötü fertilite potansiyeli olanlar belirlenmeli ve yardımcı üreme programları tanıtılmalıdır.

SPERM MORFOLOJİSİNDE TYGERBERG STRİK KRİTERİ, SPERM KONSANTRASYONU VE SPERM MOTİLİTESİ / İLERLEYİCİ MOTİLİTESİ KULLANILARAK BELİRLENEN FERTİLİTE VE SUBFERTİLİTE SINIR DEĞERLERİ

Daha önce bahsedilen parametrelere göre fertilite/subfertilite sınır değerlerini tespit etmek için yayınlanmış dört literatürü inceledik. Bunların invivo fertilite(/subfertilite kararı vermek için sperm morfolojisi, sperm konsantrasyonu ve motilite/ ilerleyici motilite yönünden tahmin eğeri olan yayınlanmış çalışmaları temsilen ele alınmış örnekler olması, bizim fikrimizdi. Bu yayınlar fertil ve subfertil grupları çeşitli semen parametreleri yönünden karşılaştırmışlardı. Aynı değişik semen parametreleri için sınır değerlerin hesaplanmasında zamanda, ya klasifikasyon ve geriye dönük algoritmik inceleme (CART) yada alıcı çalışma karakterleri (ROC) eğrisi incelemesi kullanılmıştır. ROC eğrisi

aynı zamanda çeşitli parametrelerin tanısal değerinin tanımlanmasında ve onların fertil ve subfertil gruplara sınıflandırılmasında kullanıldı.

ROC eğrisi analizini kullanarak Ombeler ve ark.[32] aşağıdaki sınır değerleri tespit etmişler. Normal morfoloji oranı %10, normal motilite oranı %45 ve normal sperm konsantrasyonu 34 milyon/ml. Sperm morfolojisi en yüksek tanısal güce sahip olup eğrinin altındaki alan (AUC) %78'dir. Fertil popülasyonun %10'luk grubu ele alınırsa daha düşük sınır değerler elde edilmiş. Normal morfoloji %5, hareketlilik %28, sperm konsantrasyonu 14 milyon/ml. (Tablo 18.1 ve 18.2).

Günalp ve ark.[33] ROC eğrisi analizi kullanarak sınır değerleri hesaplamıştır. Bunlar; morfoloji için %10, ilerleyici hareket için %42 ve sperm yoğunluğu 34 milyon/ml. İlerleyici hareket için en iyi iki parametre uygulanmış (AUC %70.7) ve morfoloji (%69.7). Toplumda subfertilite oranı %50 oranında olup otörler pozitif tanısal değerlendirmede her parametrenin alt sınır değerlerini ele alarak hesaplama yapmışlardır. Normal morfolojinin %5 oranı, normal motilite oranı için %30 ileri hızlı hareketli için %14 oranı ve sperm konsantrasyonu için 9 milyon/ml hesaplamışlardır (tablo 18.1 ve 18.2).

Son yayınlardan dördünde, Menkveld ve ark.[34] diğer araştırmalardan daha düşük sınır değerler bulmuşlardır. ROC eğrisi kullanılarak yapılan analizde; normal morfoloji için %4 ve normal motilite için %45 sınır değerleri hesaplanmıştır. AUC'deki %78.2 değeri morfoloji için anlamlı değerlendirme oranıdır. Sperm konsantrasyonu için sınır değer hesaplanmamış olmasına rağmen (sperm konsantrasyonunun 20 milyon/ml'den az olması dışlanma kriteri olarak ele alınmış) Otörler 20 milyon /ml değerini kırılma değeri olarak kabul edilme düşüncesinde olup fertil toplumların yüzde 10nu bu sonuçlara sahiptir. Tablo 18.1 ve 18.2'de olduğu gibi 34 morfoloji oranı %3 motilite oranı %20 olarak kırılma değeri kabul edilirse erkek subfertilite oranı %50 hesaplanır.

Guizck ve ark nın olan dördüncü yayında 35 otör CART analizini kullanarak üç grup için her semen parametresi için iki sınır değer hesaplamış ve normal(fertil), sınırda ve anormal (subfertil) gruplarını oluşturmuş. Normal (fertil) grup morfolojide %12'den fazla, motilitede %63'den fazlalığı ve sperm konsantrasyonunda 48 milyon/ml'dan fazlalığı temsil etmekte. Anormal (subfertil) grup morfolojide %9'dan düşük motilitede %32'den düşüklüğü ve sperm konsantrasyonunda 13.5 milyon/ml'den düşüklüğü belirtmektedir.

Dört yayında da çeşitli parametrelerin tahmin değerleri ROC eğrisi kullanılarak AUC olarak hesaplanmıştır. AUC'nin sperm morfolojisi için değerleri %66 dan %78.2 arasında olup bu değerlerin yüksek ön tanı gücü doğrulanmıştır. Yinede iki yayında değişik semen parametreleri arasında en iyi performansa sahiptir[32,35]. Bu iki çalışmada sınır değerler sırasıyla %10 ve %9 olarak hesaplanmış olup, Günal ve ark[33] veri incelerken sensitivite ve spesifite yönünden kendi bulgularını incelediklerinde,

Tablo 18.1: *Fertil ve subfertil popülasyon çalışmalarının eşik değerleri*

Otörler	Normal morfoloji (%)	Motilite (%)	Progressiv motilite (%)	Konsantrasyon ($x10^6$/ml)
Guzick[35] ve ark. (2001)	9	32	-	13.5
Menkveld[34] ve ark. (2001)	4	45	-	20
Günalp[33] ve ark. (2001)	10	52	42	34
Ombelet[32] ve ark. (1997)	10	45	-	34

Tablo 18.2: *Populasyonlarındaki subfertil erkeklerin tahmin edilen insidansları temel alınarak fertil ve subfertil erkekler arasındaki ayırım için genel popülasyonun eşik değerlerinin alt sınırı*

Otörler	Normal morfoloji (%)	Motilite (%)	Progressiv motilite (%)	Konsantrasyon ($x10^6$/ml)
Menkveld[34] ve ark. (2001)	3	20	-	20
Günalp[33] ve ark. (2001)	5	30	14	9
Ombelet[32] ve ark. (1997)	5	28	-	14.3

sınır değeri %12 olarak hesaplamışlardır. Dördüncü çalışma ise kesişim değerini %4 olarak hesaplamıştır. Sensitivite ve spesifite değerleri oldukça yüksek olmasına rağmen pozitif tahmin değeri o kadar yüksek değildir. Bu yüzden fertil erkekler subfertil olarak sınıflandırılabilir ve insanlarda değişik derecelerde psikolojik gerilime sebep olarak gereksiz pahalı tedavilere sebep olabilir. Bu dört çalışmadan üçünde ikinci ve daha düşük sınır değerler hesaplanmıştır. Ombelet ve ark.[32] bu düşük değeri fertil toplumun %10'luk grubunu ele alarak, Günalp ve ark.[33] pozitif tahmin değerini göz önüne alarak popülasyonu incelemiş, Menkveld ve ark. çalışma gruplarındaki subfertillerin %50'lik oranını ele almıştır. Daha düşük sınır değerler %3 ile %5 arasındadır (Tablo 18.2). Bu düşük sınır değerler, yüksek sınır değerlerinde daha yüksek pozitif tahmin değerine sahip olup, negatif tahmin değerleri daha düşük değildir.

Bize göre daha düşük sınır değerler invivo koşullarda, daha düşük gebelik potansiyeli olan erkeklerin tanımlanmasında kullanılmalıdır. Daha düşük sınır değerlerin üzerindeki değerlere sahip olanlar normal olarak değerlendirilmelidir. Bu bulgular daha önce yayınlanmış olan Coetzee ve ark.[12] (IVF verileri) ve Van Waart ve ark.[13] (IUI verileri) ile uyumlu olup normal morfoloji değeri, sınır değerlerin altında hesaplanan erkeklerde başarılı gebelik şansı önemli derecede düşüktür.

Dört yayında da motil sperm oranı için yüksek sınır değerler hesaplanmış olup (ROC eğrisi ve CART analizi yapılarak) %32 ile %52 sınırlarındadır. Düşük sınır değerler ise %20 ile %30 arasındadır. Motilitenin yüksek tahmin değeri olmasına karşın Günalp ve ark. AUC ile ileri hareketin sınır değerini %59 ile %79 arasında hesaplamışlar[33]. Pozitif tahmin değeri için ROC eğrisi kullanılarak yüksek sınır değerini %42, düşük sınır değeri %14 hesaplamışlardır. Bu çalışmada AUC değerleri olarak sırasıyla %70.7 ve %69.7 ile ileri hareketlilik subfertilite ayırımı için sperm morfolojisinden daha belirgin tahmin değeri sağlamıştır[33]. Montanaro Gauci ve ark.[28] motilite oranının IUI sonuçları için daha önemli tahmin değeri olduğunu tespit etmiştir.

Gebelik oranı motilitesi %50'den yüksek olanlarda, bu değerden az olanlara göre üç kat fazla hesaplanmıştır.

Yüksek sperm konsantrasyon sınır değerleri Ombelet ve ark, Günalp ve ark. ve Guzick ve ark tarafından hesaplanmış olup 13.5 ile 34 milyon/ml arasındadır. Daha düşük olan sınır değerleri ise 9 ile 14.3 milyon/ml arasındadır. Bu değerler için AUC değerleri %55.5 ve %69.4 arasında teyit edilmiştir. Menkveld ve ark sperm konsantrasyonu sınır değerlerini hesaplamamış (çünkü 20 milyon/ml altındaki değerleri incelememişler) onların kendilerine göre sınır değerı 20 milyon /ml bu değer diğer fertil grupların sonuçlarını etkilememiştir[7,8,11,22-24].

Birçok parametrenin tahmin değerlendirmesindeki değerinin iyi olmasına rağmen her biri diğerinden bağımsız olup, bu parametrelerin kombine kullanılması ile semen analizinin klinik önemi artmaktadır. Ombelet ve arkadaşları[32], fertil ve subfertil topluluklar arasındaki farkın, iki ve tüm üç sperm parametreleri birleştirildiğinde önemli olmaktadır. Bartoov ve arkadaşları fertilite potansiyelinin farklı semen karakterlerinin birleştirilmesine bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Eggert Kruse ve ark.[23] çalışmalarında ele aldıkları üç kriterin arasında önemli korelasyon olduğunu bulmuşlar. Farklı semen parametrelerinin her birinin kendi başına iyi tahmin gücü olmasına rağmen bu kriterlerin kombine edilmesi semen analizinin klinik değerini arttırmaktadır. Bu yüzden biz erkek fertilite potansiyeli tahmininde parametreleri tek başına ele almamayı öneriyoruz. Bu bölümde tartışılan alt sınır değerleri daha yüksek pozitif tahmin değerine sahip ve yüksek negatif tahmin değerlerine sahiptir. Bu yüzden bu alt sınır değerlerinin subfertil erkeklerin tanımlanmasında kullanılmasını öneriyoruz.

1999 da WHO tarafından belirtildiği gibi her grup kendi çalıştığı popülasyon grubunu temel alarak kendi sınır değerlerini oluşturmalı. Sperm morfolojisi ele alındığında %0-4 normal form sınır değeri subfertilite için yüksek tahmin değerine sahiptir ve önceki IVF ve IUI verileri ile desteklenmiştir[12,13]. yukarda tartışılan dört yayında[32-35] aynı sonuçlara sahip olup yol gösterici kılavuzlarda fertil ve subfertil ayırımında kullanılmak üzere yer almıştır.

Konsantrasyon ve hareketliliğe bağımlı olarak sınır değerler net olmasa da konsantrasyonun 10 milyon/ml dan az olması ve hareketliliğinin %30 dan düşük olması genel verilerle uyuşmaktadır[32-35]. Kesinleşmiş sınır değerlerin oluşması için tercihen çok merkezli yapılmış çok sayıda çalışmalara ihtiyaç vardır.

BAYAN PARTNERİ KRONİK ANOVULASYON OLAN GENEL POPULASYONDA SEMEN PROFİLİ

Genelde bariz olan, genel popülasyondaki semen analizi profili hakkında bulgular ve anlaşılması yönünden, düşük seviyeli bir yaklaşımın varlığıdır. Birçok erkek grubunun semen analizi yönünden genel popülasyonu yansıttığı belirtilmiştir. Semen bağışlama programındaki birçok vericinin normalleri, bu grubun fertilite için semen veren gönüllü grubtan oluşması nedeniyle elbette iyi bir fikir oluşturmamaktadır. Ordudan elde edilenler ise belli yaş grubu olması nedeniyle taraf oluşturmaktadır. Pozitif infeksiyon hikayesi olan tubal faktörlü (tubal faktörü pelvik enfeksiyon nedeniyle oluşmuş) olan hastaların, veya iyi fertilite geçmişi olan (tubal sterilizasyon uygulanmış kadın) eşlerinde taraf oluşturmaktadır. Bize göre genel populasyondaki semen analizi çalışması yapmak için en uygun grup eşlerinde kronik anovulasyon/PCOS (polikistik over sendromu) (yılda en fazla 3 menstural period geçiren) olan erkek grubudur. Subfertilite olan hastalarda alt sınır değerlerini oluşturmak amacıyla gönüllü anovulatuar kadınlardan elde ettiğimiz sonuçların genel popülasyonun semen profilini yansıtacağını düşündük.

Anovulasyonu olan kadınların eşlerindeki semen analizlerini değerlendiren biri retrospektif, diğeri prospektif olarak iki farklı çalışma seçildi.

Tygerberg Fertilitte Kliniğindeki kronik anovulasyonu olan (35 günden fazla) kadınların eşlerindeki retrospektif çalışma

Bu çalışmada ki erkeklerin hepsi Tygerberg Fertilite Kliniğinde anovulatuar siklus tanısı almış bayanların partnerleridir. Semenler WHO yol göstericilerine göre[6] incelenmiş ve sperm morfolojisi için Tygerberg srik kriterleri kullanılmıştır[3,4,6]. Laboratuar çalışanları tüm preparatları başlangıçta değerlendirdi ve sonra her preparat (TFK) stik kriterlerine göre tek bir gözlemci tarafından değerlendirildi. Altmış iki örnek seçilerek çalışmaya dahil edildi (Tablo 18.3).

Tygerberg Fertilitte Kliniğinde PCOS tanısı almış bayanların eşlerindeki prospektif çalışma

Tygerberg Fertilite Kliniğinde PCOS olan hastalar üzerinde yürütülmüş bir çalışmadır. Hastalar son belirlenen Rotterdam kararlarına uygun PCOS tanısı almışlardır[37]. Bu çalışmanın hedefi, bu grupta ovulasyon induksiyonunu etkileyen faktörleri ortaya çıkarmak.

Bu bayanların eşlerinin hepsinin semenleri incelendi. İnceleme metodu WHO yol göstericilerine göre belirlendi 6 ve sperm morfolojisi değerlendirilmesinde Tygerberg strik kriterleri kullanılmıştır[3,4,6]. Laboratuar çalışanları tüm preparatları başlangıçta değerlendirdi ve P-patern morfoloji görüntüleri tek bir gözlemci tarafından yeniden değerlendirildi (TFK) (Tablo 18-4). Subfertilite için kullanılan sınır değer Van der Merwe ve arknın son değerlendirmelerinde belirtilen[38] normal form için %0-4, motilite için %30 nililitrede 10 milyondan az sperm olması kriterleri olup bu kısmın ilk bölümünde belirtilmiştir.

TARTIŞMA

Her iki çalışmada (Tablo 18.3 retrospektif; tablo 18.4 prospektif) hastaların +-%50'si normal semen analizine sahiptir. En sık rastlanan tek başına olan anormal bulgu teratozoospermi (%25.8 retrospektif, %27.8 prospektif) azospermi hastaların %1.4-4.8'inde vardı. Üçlü test sonucu hatalı olanlar ise olguların %1.4-3.2'sidir (tablo 18.3-18.4).

Sınır değerler anovulatuvar bayanların grubundan daha yüksek hesaplandı. Bu sınır değerler genel popülasyonda erkek faktörüne bağlı infertilite oranını yansıtmaktadır. Bu sonuç retropspektif ve prospektif çalışma olmalarına bağlı olmayıp, teratozoospermi oranı (%4'den düşük normal morfoloji oranı) %25.8-%27.8 olup, bu gruptaki en sık olan hasardır. Her iki çalışmadaki semenler yukarıda bahis edilen dört çalışmanın kriterlerine göre değerlendirildiğinde tüm erkeklerin %50'si normal semen parametrelerine sahiptirler[32-35,38].

Tablo 18.3: *Tygerberg Fertilite Kliniğinde kronik anovülasyon gösteren kadınların partnerlerinin retrospektif olarak incelenmesi (>35 gün) (<10^6/ml cut-off)*

	Hasta Sayısı (n)	Hasta Yüzdesi (%)
Normozoospermi	29	46,7
Sperm Anormalliği		
Tek Parametre Defekti		
Azospermi	3	4,8
Oligozoospermi (O)	3	4,8
Astenozoospermi (A)	-	0
Teratozoospermi (T)	16	25,8
Polizoospermi (P)	2	3.2
İmmünolojik Faktör (I)	1	1.6
Çift Parametre Defekti		
OA	-	0
OT	4	6,5
AT	-	0
TP	1	1,6
TI	1	1,6
Üç Parametre Defekti		
OAT	2	3,2
Kullanılan eşik değerleri: Konsantrasyon < 10^6/ml, Motilite < %30, Morfoloji < %4		

Tablo 18.4: *Tygerberg Fertilite Kliniğinde polikistik over sendromlu (PCOS) kadınların partnerlerinin retrospektif olarak incelenmesi (>35 gün) (<10^6/ml cut-off)*

	Hasta Sayısı (n)	Hasta Yüzdesi (%)
Normozoospermi	41	56,9
Sperm Anormalliği		
Tek Parametre Defekti		
Azospermi	1	1,4
Oligozoospermi (O)	1	1,4
Astenozoospermi (A)	-	0
Teratozoospermi (T)	20	27,8
Polizoospermi (P)	3	4.2
İmmünolojik Faktör (I)	-	0
Çift Parametre Defekti		
OA	-	0
OT	1	1,4
AT	-	0
TP	3	4,2
TI	1	1,4
OP	-	0
Üç Parametre Defekti		
OAT	1	1,4

PCOS olan hastalar değerlendirilirken bunların eşlerinde %50'ye varan oranda erkeğe bağlı faktörler nedeniyle problem olduğu akla getirilmeli ve bu çiftlerde başarılı sonuçlar elde etmek için bu durumlar için gerekli yardımlar yapılmalı. Bu düşük sınır değerler mutlak değerler olmayıp klinisyene semen analizini takipte yol göstericidir. Doğrucu bir yaklaşımda bulunmak için altın kural ilk anormal sperm değerlendirilmesinden dört hafta sonra tekrar semen analizini tekrarlamaktır. Eğer sonuçlar tekrar anormal olursa tedavi seçeneklerini belirlemek için fizik muayene yapılmalıdır. PCOS olgularında anovulatuvar bayan faktörü varlığı doğrulanmalı ve ilk tedavi yaklaşımına başlanmalı bayanların kilo vermesi sağlanarak vücut kitle indeksi 25 in üzerine çıkarılmalıdır. Bu hastaların %50 sinde erkek faktörü belirlenmiş olmasına rağmen bunların %5 kadar ciddi olup (azospermi ve üçlü test parametre hasarı) bunlarda %7-9.7 oranında çift hasar mevcuttur.

Bizim bilgilerimize göre bu çalışma genel popülasyonda subfertile erkek oranının belirlemede alt sınır değerlerini tespit etmek için anovulatuar bayan grubunun kullanıldığı ilk çalışmadır. Bu alt sınır değerleri klinisyene daha uygun ve gerektiğinde daha etkili olması için yönlendirici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1987
2. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1992
3. Krugcr TF, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in virro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 112
4. Kruger TF, ct al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118
5. Menkveld R, et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 5: 586
6. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999
7. Barratt CL, et al. Clinical value of sperm morphology for in-vivo fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992. Hum Reprod 1995; 10: 587
8. Ayala C, Steinberger E, Smith DP The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples. J Androl 1996; 17: 718
9. Blonde JP, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. Lancet 1998; 352: 1172
10. Chia SE, Tay SK, Lim ST. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. Hum Reprod 1998; 13: 3394
11. Chia SE, Lim ST, Tay SK, et al. Factors associated with male fertility: a case-control study of 218 infertile and 240 fertile men. Br J Obstet Gynaecol 2000; 107: 55
12. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. Hum Reprod Update 1998; 4: 73
13. Van Waart J, et al. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine i nsemination (IUI): a structured literature review. Hum Reprod Update 2001; 7: 495
14. Ombelet W, et al. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. Hum Reprod 1997; 12: 1015
15. Ombelet W, Wouters E, Boels L. Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a sub-fertile population. Int J Androl 1997; 20: 367
16. Ombelet W, et al. Multicenter study on reproducibiliry of sperm morphology assessments. Arch Androl 1998; 41: 103
17. Keel BA, et al. Lack of standardization in performance of the semen analysis among laboratories in the United States. Fertil Steril 2002; 78: 603
18. Cooper TG, et al. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. Int J Androl 2002; 25: 306
19. Menkveld R, et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 5: 586
20. Franken DR, et al. The development of a continuous quality control programme for strict sperm morphology among sub-Saharan African laboratories. Hum Reprod 2000; 15:667
21. Franken DR, Barendsen R, Kruger TF. A continuous quality control program for strict sperm morphology. Fertil Steril 2000; 74: 721
22. Holland-Moritz H, Krause W. Semen analysis and fertility prognosis in andrological patients. Int J Androl 1992; 15:473
23. Eggert-Kruse W, et al. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. Hum Reprod 1996; 11: 139
24. Dunphy BC, Neal LM, Cooke ID. The clinical value of conventional semen analysis. Fertil Steril 1989; 51: 324
25. Van Zyl JA, Kotzc TJ, Menkveld R. Predictive value of spermatozoa morphology in natural fertilization. In Acosta AA, et al., eds. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990: 319
26. Zinaman MJ, et al. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J Androl 2000; 21: 145
27. Slama R, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. Hum Reprod 2002; 17: 503
28. Montanaro Gauci M, et al. Stcpwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme. Andrologia2001;33: 135
29. Cohlen BJ, et al. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treating male subfer-tility: a controlled study. Hum Reprod 1998; 13: 1153
30. Ombelet W, et al. Intrauterine insemination after ovarian stimulation with clomiphene citrate: predictive potential of inseminating motile count and sperm morphology. Hum Reprod 1997; 12: 1458

31. Lindheim S, et al. Abnormal sperm morphology is highly predictive of pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. J Assist Reprod Genet 1996; 13: 569
32. Ombelet W, et al. Semen parameters in a fertile versus sub-fertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. Hum Reprod 1997; 12: 987
33. Giinalp S, et al. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. Hum Reprod 2001; 16: 110
34. Menkveld R, et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and infertile population: an effort towards standardization of in vivo thresholds. Hum Reprod 2001; 16: 1165
35. Guzick DS, ct al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med 2001; 345: 1388
36. Bartoov B, et al. Estimating fertility potential via semen analysis data. Hum Reprod 1993; 8: 65
37. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop gtoup. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 2004; 19: 41
38. Van der Merwe FH, et al. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. Gynccol Obstet Invest 2005; 59: 86

19

DNA Fragmantasyonu, Fertilizasyon ve Gebelik Üzerine Etkisi

Ralf Henkel

Çeviri: *Oğuz Güven*[*]

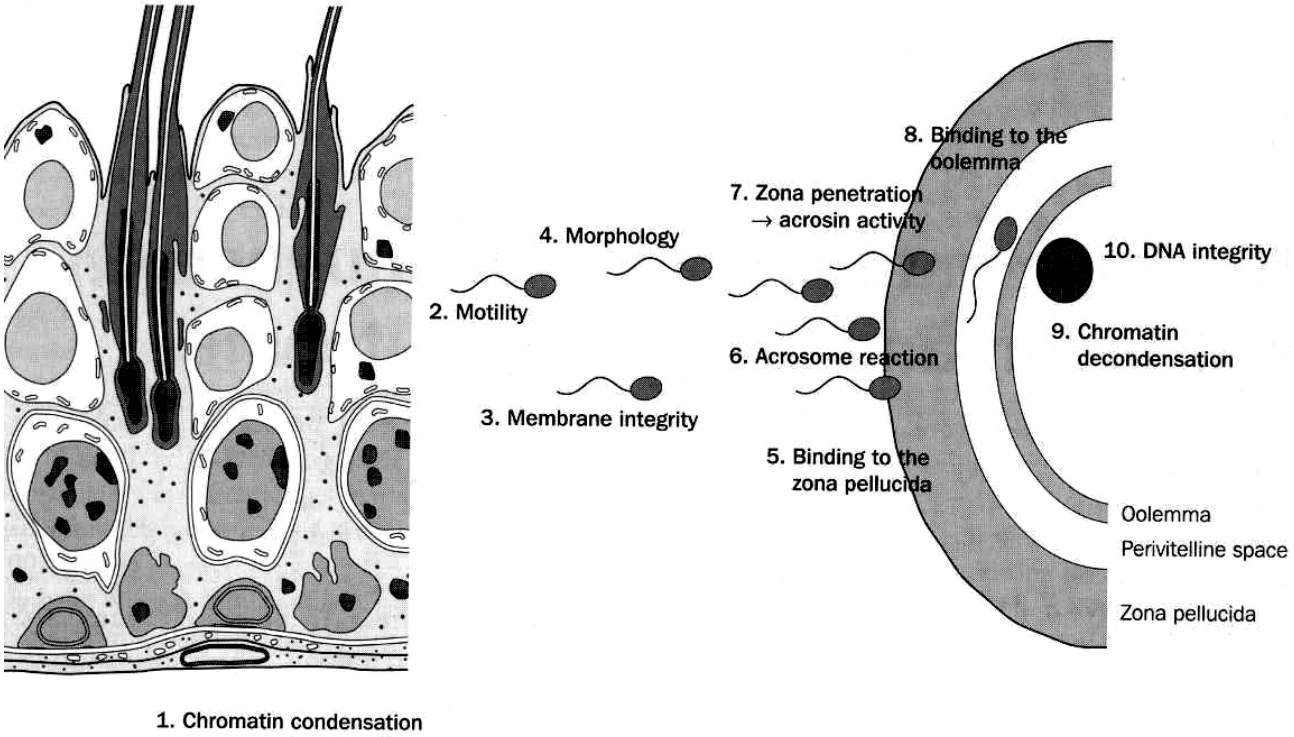
GİRİŞ

Çocuk sahibi olmak isteyip de olamayan çiftlerin %50'sinden erkek subfertilitesi sorumludur. Sadece Almanya'da çocuksuz çiftlerin sayısı 1,5-2 milyon kadar olup her yıl bu çiftlerden 200.000'i (%10-13) yardımcı üreme teknikleriyle (YÜT) çocuk sahibi olmayı denemektedirler. 2002 yılında YÜT ile yaklaşık 40.000 bebek dünyaya gelmiştir. Bunların 12.000 tanesi (tüm doğumların %1.6'sı) IVF sonrası doğmuştur. Erkek infertilitesinin sıklığının fazla olması çocuk istemiyle başvuran çiftlerde erkeğin detaylı bir androlojik incelemeden geçirmesini zorunlu kılmaktadır. Işık mikroskobuyla sperm sayısı ve morfolojisinin değerlendirilmesi dışında, sperm parametrelerinin de incelenmesi androloji laboratuarlarında gereklilik haline gelmiştir. Bu analiz yöntemlerinden bazıları ά-glukosidaz[1,2] veya polimorfonüklear granülosit (PMN) elastase[3,4] gibi sperm fonksiyonu için değerli biyokimyasal değerleri inceler. Ancak, çoğunlukla motilite, membran bütünlüğü, morfoloji, zona bağlanması, akrozom reaksiyonu, akrosin aktivitesi, oolemma bağlanması, kromatin yoğunluğu veya DNA bütünlüğü gibi spermatozoa'nın biyolojik fonksiyonlarını belirleyen (resim-19.1) ve dolayısıyla sperm hücresinin oositi fertilize etme yeteneğini gösteren değerleri incelenmektedir. Tüm bu parametrelerin in-vivo ve in-vitro olarak fertilizasyon ve gebelikle önemli bağlantısı olduğu tekrar tekrar gösterilmiştir.

Son yıllarda bilim adamlarının ilgisi sperm DNA fragmantasyonunun fertilideki rolune yoğunlaşmıştır. Bu parametre fertilizasyon ve gebelik üzerinde etkilidir. Normalde sevikal mukus, uterus içi ortam, kumulus ooforus, zona pellucida veya oolemma isimli doğal fizyolojik bariyerlerden geçemeyecek spermatozoa YÜT ile oosite girmesi sağlanmaktadır. Bu özellikle ICSI de önemli bir durumdur. ICSI tüm doğal bariyerleri atladığı için bebeğin sağlığı üzerinde etkili olabilecek şekilde genetik bozukluğu olan spermatozoa oositi fertilize edebilir[5-8]. DNA hasrının seviyesine göre değişmekle birlikte ağır hasarlı durumlarda embiryonun kaybıyla sonuçlanabilir[9-11]. Hasar bebeğe transfer edilip hastalığa bile sebep olunabilir. Bu açıdan ele alındığında artmış kromozomal anormallikler, minor ya da major doğum defektleri veya artmış çocukluk çağı kanserleri ICSI ile doğan bebeklerde artmış riske işaret etmektedir[6,8,12-15].

Sperm DNA hasarı çok çeşitli faktörlerle gelişebilir: 1- apopitozis[16,17] 2- spermatogenez ve sperm maturasyonu sırasında uygunsuz DNA paketlenmesi ve bağlanması[18] 3- oksidatif stres[19-21]. DNA hasarı YÜT de çok önemli bir etkendir. Bu kısım sperm DNA'sı ve fertilizasyon ve gebelik üzerine etkileri konuları anlatılacaktır.

[*] Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Hatay.



Şekil 19.1: *Spermatozoanın fonksiyonel parametrelerinin şematizasyonu: Kapasitasyon mevcudiyeti hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu için sperm kabiliyetini yansıttığına dikkat ediniz. İlaveten kromatin dekondenzasyonu spermatogenez ve epididimde sperm maturasyonunun oluşması süresince sperm DNA'sının uygun kondenzasyonunu takip etmelidir.*

APOPİTOZ

Apopitoz hücrelerin kontrollü olarak içlerinden yıkılmalarıdır[22]. Kromatinin yoğunlaşması ve fragmantasyonu, sitoplazmik organellerin sıkışması, mitokondrial transmembran potansiyelinde azalma[23], sitokrom c'nin mitokondrial mitokondriadan salınması[24], reaktif oksijen parçacıklarının (ROP) oluşumu[25], endoplazmik retikulumda şişme ve hücre hacminde azalma[26] ile karakterizedir. Apopitoz aynı zamanda programlanmış hücre ölümü olarak da anılır ve nekrozdan çok farklıdır. Apopitotik cisimcikler olarak adlandırılan apopitozun nihai ürünlerinin fagositozu sırasında inflamatuar reaksiyon oluşmaz[27]. Apopitoz kelimesi Yunanca dan gelir ve bir hedeften uzağa düşmek anlamına gelip son baharda ağaçlardan düşen yaprakları tarif için kullanılır[22]. Canlı hücreler bu mekanizmayı hayat ve ölüm arasındaki hasas dengeyi kurmak için kullanırlar. Apopitozdan kaçan hücreler -bazı otoimmün hastalılarda veya kanserlerde olduğu gibi- kontrolden çıkar ve sonuçta organizma için zararlı etkileri olur. Bu mekanizmanın fetal gelişimde ve erişkin organizmasında çok önemli görevleri vardır. Spermatogenzin homeostazında apopitozun rolü çok önemli olup bu mekanizmadaki hasarlar fertiliteyi bozabilmektedir. Apopitozda moleküler mekanizmaları plazma zarının iç yaprağında yerleşik fosfotidiletanolamin ve negatif yüklü fosfolipid fosfatidilserin (FS) ile dış yaprakta yerleşik sfingomyelin ve fosfotitidil kolin in normalde asimetrik kurguya sahip yerleşimine sahip plazma membranında detaylı değişiklikler olur. FS normalde aminofosfolipid translokaz (flippaz) ile dış membrandan iç membrane transfer olur. Bu transferin tersine dönmesi apopitozun erken işaretlerindendir. FS nin bu şekilde dış membrana ters translokasyonu FS nin dış membran yüzeyinde açığa çıkmasına sebep olur[28,29]. Ca varlığında FS[35] kDa ağırlığında bir fosfolipid bağlayan protein olan anneksin-V[30] ye yüksek afinite gösterir.

Apopitozla yakın ilişkisi olan bir diğer sinyal mekanizması ise Fas/Fas bağı (FasL; CD95L) sistemidir[31]. Fas (CD95 APO-1) tümor nekrotizan faktör/sinir büyüme faktörü (nevre growth factor) ailesine ait olan tip I transmembran proteinidir ve apopitotik sinyalleri taşır[32-34]. Bu molekül hücre içi ölüm bölgesi taşır. Bu bölge birçok intraselüler sin-

yal yolunun FasL nin Fas a bağlanması sonrası harekete geçirilmesinden sorumludur[35]. FasL tip II TNF-ilişkili transmembran proteinidir[36]. Fas sistemi hücresel sitotoksisite[38], periferik T ve B hücre toleransını da içeren immün regülasyonu[37] ve immun öncelikli bölgelerin kontrolünden[39] sorumludur. Fas/FasL sisteminden Fas'ın doku dağılımı memelide oldukça yaygındır. Timus, dalak ve karaciğer gibi non-lenfoid dokularda özellikle yaygındır[40]. Buna karşılık FasL m RNA ekspresyonu daha çok lenfoid organlar ve testisle sınırlı olup, testiste sertoli hücrelerinde bulunur[36].

Hücrelerin apopitotik cicismcikler denilen forma dönüşmesinden sitozolik aspartat-spesifik proteazlar (kaspazlar)[41] sorumludur. Bugüne kadar insanda 14 değişik kaspaz saptanmıştır[42]. İlk olarak 30-50 kDa ağırlığında inaktif proenzimler olarak yapılırlar. Proteolitik bir prosesden geçip 20 kDa ve 10 kDa lık iki alt üniteye ayrılırlar ve aktive olurlar. Fonksiyonel olarak kaspazlar iki alt uniteye ayrılırlar. Başlatıcı (initiating) kaspazlar (kaspaz -6, -8, -9, -10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-2, -3, -7). Bunlar hücrelerin yıkımından ve dolayısıyla apopitotik hücre ölümünden sorumludurlar. Kaspaz -3 DNA yı yıkan spesifik DNase ları[43] geri dönüşümsüz olarak aktive edip DNA'nın fragmentasyonunyonunu[44] başlattığı için apopitoz da merkezi bir role sahiptir. Ayrıca birçok farklı patolojide de kuvvetli rolü olduğu düşünülmektedir[45].

Apopitotik kaspaz aktivasyonu ve hücre ölümü için birçok yol tarih edildiği halde bu yollardan sadece iki tanesi için anlamlı kanıt bulunabilmiştir[46,47]. Omurgalılarda bu yollar 1) ölüm reseptörü yolu (ekstrinsik yol) ve 2) mitokondrial yol (intrinsik yol). Ekstrinsik yolda TNF ailesinin ölüm reseptörleri, Fas da dahil olmak üzere, sinyali Fas-ilişkili ölüm bölgesi (Fas-associated death domain) taşırlar ve kaspaz-8'in (reaksiyonu başlatan kaspaz) aktivasyonunu tetiklerler ki bu yok edici etkiye sahip kaspaz-3 ü aktive eder. Buna karşılık intrinsik yolda kaspaz-3 kaspaz-9 (başlangıç kaspazı) tarafından aktive edilir. Kaspaz-9 yaşayan hücrelerin sitozolünde bulunan apopitotik proteaz-aktive edici faktör-1 (APAF-1) tarafından aktive edilir. APAF-1 sitokrom c tarafından aktive edilir. Bu apopitotik sinyalleri takiben mitokondriden mitokondrial dış zarının geçirgenliği ile sağlanır. Bcl-2 ailesine bağlı çeşitli proapopitotik (BH1, BH2, BH3, Bax; Bak, Bok) ve apopitotik düzenleyici proteinler (Bcl-2, Bcl-xL, A1, Bcl-w, Mcl-1) tüm sistemi yönetir[48,49].

Fertilizasyon ve gebelikte apopitozun erken işaretçilerinin yeri

Spermatogenez çok dinamik bir süreçtir. Spermiasyon denilen süreçte andiferansiye diploid spermatogonial kök hücreler mitotik ve mayotik bölünmeler boyunca gelişip diferansiye olup spermatozoa ya dönüşürler. Spermatozoa germinal epitelden seminifer tübüllerin içine bırakılır. Spermatogenez 2 faza bölünebilir. 1. aşama gonositlerin spermatogonia ya dönüşmesiyle karakterize olup doğumdan hemen sonra başlar (insanda doğumdan sonraki ilk 6 ay boyunca devam eder)[50]. Spermatogenezin bu ilk dalgası testiste çok yoğun germ hücresi apopitozu akını görülür[51]. Sertoli hüceleri sadece belli sayıda germ hücresini destekleyebileceği için[52], fazla miktardaki germ hücresinin apopitozla makul seviyeye düşürülmesi aşaması erişkinde normal spermatogenezin gelişmesi için önemli bir basamaktır[53].

Spermatogenezin 2. fazı puberte ile başlar. Bu dönemde gonadotropin ve androjen seviyelerinde artış, spermatosit gelişiminde süreklilik gösteren bir ilerleme, haploid spermatidlerle sonuçlanan mayotik bölünmeler ve en sonunda da tam olarak olgunlaşmış spermatozoa gelişimi görülür. Sertoli hücreleri ve pre- ve post- mayotik germ hücreleri arasında sabit oranı sağlamak ve diğer taraftan germ hücre gelişimini sağlamak ve genel olarak spermatogenezin kalitesini korumak[54] için bu safha apopitozun ayarlayıcı mekanizma olarak çalıştığı çok hassas bir dengeye sahiptir. İnsanda günlük germ hücresi üretimi 200 milyon olup bunun %75'i fonksiyonel, olgun ve dışarı atılmaya uygun spermatozoa ya dönüşmeden spontan olarak ölür[55,56]. Spermatozoa ve yuvarlak spermatidler apopitozun klasik morfolojik ve biyokimyasal gösterirlerken, uzun spermatidler DNA fragmentasyonu gösterilebilse de ve fosfotidilserin'in translokasyonu bazı hücrelerde oluşsa da klasik apopitoz belirtileri göstermezler. Bunun sebebi spesifik kromatin yoğunlaşmasının ve spermatozoa morfogenezi dolayısıyla olabilir. En sonunda spermiasyon sırasında spermatozoa seminifer tübüllerin içine salınır ve artık sitoplazma nüklear bağımsız apopitozla sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir[57].

Sertoli hücreleri FasL salgıladıkları ve Fas'da olgun spermatozoa üzerinde yerleşik olduğu için[17,58-61], Fas/FasL sistemi spermatogenezin sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayılarda olacak şekilde ayarlanması ve dengelenmesinde görevli olduğu düşünülmektedir[31,51]. Bu yüzden işaretlenmiş

germ hücreleri sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler. Pentikainen ve ark. spermatositler ve spermatidler için Fas tarafından düzenlenen kaspaz-regüle apopitozun varlığını göstermişlerdir[62]. Fas-pozitif spermatozoa hala ejakulatta bulunabilmektedir ve bunun oluşumu soru işaretidir. Bu gözleme dayanarak Sakkas ve ark.[58] bunu 2 muhtemel mekanizma ile açıklamışlardır: 1) non-fonksiyone Fas veya 2) Sertoli hücrelerinin fagositoz kapasitesinden daha fazla FasL işaretli spermatozoa varlığı. Bu hipoteze abotif-hipotez denmektedir. Fas-positif spermin fagositoz mekanizmasından kaçışının moleküler mekanizması hala anlaşılamamıştır. Ek olarak ejaküle edilmiş insan sperminde Fas reseptörlerinin veya Fas tarafından düzenlenen yanıt mekanizmasının varlığına dair kanıtlar mevcut durumda birbirleriyle çelişmektedir. Bu durum yukarıda bahsedilen hipotezi daha tartışmalı hale getirmektedir[60,63].

Şu anda insan ejakulatındaki Fas-pozitif sperm oranı hakkında fikir birliği yoktur. Castro ve ark.[63] normozoospermik ve non-normozoospermik insanların ejaküle spermlerinde dikkate değer miktarda Fas-pozitif sperm bulmadıklarını söylemektedirler. Taylor ve ark. Kaspaz aktivasyonu veya DNA fragmantasyonu adına Fas ligandına atfedilecek bir görev rapor edememişlerdir[60]. Sakkas ve ark.[17] ve Henkel ve ark.[59] sırasıyla ortalama olarak %9.7 ve %19.8 oranında Fas-positif sperm bulduklarını ve bunun yine yazarlara gore sırasıyla maksimum %47.3 ve %78'e kadar çıkabildiğini rapor etmişlerdir. Sakkas ve ark.[17] sperm parametreleri bozuk olan erkeklerde Fas pozitifliği insidansının daha fazla olduğunu söylemişlerdir. McVicar ve ark.[61] Fas'ı sadece infertil erkeklerin spermlerinde saptayabilmişlerdir. Diğer taraftan spermdeki Fas pozitifliği ne gebelik ve fertilizasyon ne de "comet analizi" ile saptanan DNA hasarı ile ilişkili gözükmektedir[59,61]. Bu yüzden insan ejakulatı sperminde saptana Fas' ın erkek fertilitesine katkısı yok gibi gözükmektedir. Ek olarak TUNEL (terminal deoxyribonükleotide transferase-aracılı dUDP çentik-sonlu (nick-end) işaretleme) analizi ile saptanan DNA fragmantasyonu ve Fas gibi apopitotik işaretçiler daima birlikte bulunmazlar[17] ve ne FasL, ne de hidrojen peroksit, insan spermatozoasındaki kaspaz aktivitesini belirgin olarak artırmaz[60]. Diğer taraftan yukarıda da belirtildiği gibi Castro ve ark.[63] normozoospermik ve non-normozoospermik ejakulatlarda anlamlı sayılabilecek ölçülerde Fas saptmadığı için "abortif apopitoz hipotezi"ni desteklemektedir. Rachaud ve ark.[64] ejakule edilen insan spermatozoasında apopitoz yeteneğinin dahi olmadığını iddia etmektedir.

Apopitozun başka bir erken işaretçisi olan ve anneksin V bağlanması yöntemiyle tespit edilen "PS nin dışarı sunulması" ve programlanmış hücre ölümünün geç işaretçisi olan DNA fragmantasyonu hemen her ejakulatın spermlerinde tespit edilebilir olması[59,65-68]. Spermin ölümünün klasik kapsaz içeren apopitotik makenaizmaları takip etmediğini düşündürmektedir[69]. Diğer taraftan apopitozun ana yollarında görevli kaspazlar (kaspaz-1,-3,-8,-9) insan sperminde bulunur ve aktive edilebilirler[68,70] ki bu da apopitoz teorisini destekleyen diğer bir bulgudur. İmmatür spermatozoa' nın hayatta kalmasındaki bu çelişkili durumu açıklamak için Cayli ve ark[71] işaretli sadece spermatozoalarda kaspaz-3 ün aktive olduğunu öne sürmüşlerdir. Tüm bunlara rağmen apopitotik hücre ölümü regülasyonu bir ısı-şok proteini HspA2 den türetilen Bcl-xL apopitoz proteini tarafından yapılmakta olup bu protein aynı zamanda apopitozun inhibitörü olarak da bilinmektedir[72].

İnsan ejakulatına bağlanan annaeksin V hakkındaki datalar bu yapı hakkında kesin bilgi verici değildir. Oosterhuis ve ark[67]'nin pilot çalışmasında infetilite kliniğine başvuran 102 hastanın %20'sinde anneksin V bağlama yöntemiyle spermlerin apopitotik olduğunu göstermişlerdir. PS eksternalizasyonu ile sperm konsantrasyonu ve motilitesi arasında ters orantı vardır. Yazarlar bu testin insan spermatozoası fonksiyonel canlılığını araştırmak için güvenilir bir test olacağını düşünmüşlerdir. Diğer taraftan Henkel ve ark.[59] anneksin V bağlanma testi ile in vitro fertilizasyon ve gebelik arasında bir bağlantı bulamamışlardır buna karşılık Fas ekspresyonu ve PS eksternalizasyonu ile kuvvetli bağlantı saptamışlardır. Henkel ve ark.[59] ejaküle edilen spermatozoa nın 1/5'i fosfotidilserin eksternalize etmekte olduğunu saptamışlardır. Bu noktada işaretlenmiş spermlerin kaynağının neresi olduğu ve PS eksternalizasyonuna neyin sebep olduğu soruları ortaya çıkmaktadır.

Daha önce tartışıldığı gibi bazı yazarlar Fas ekspresyonu veya Ps'nin eksternalizasyonu gibi apopitozun erken işaretlerinin testis içinde "abortif apopitoza" sebep olduğunu savunmakta ve bu süreçten kurtulabilen spermlerin sadece tesadüfen bu mekanizmadan kaçabildiklerini savunmak-tadırlar. Mamafih, yeni çalışmalar PS'nin sperm plazma zarının iç yaprağından dış yaprağına translokasyonunun kapasitasyon ortamında inkubasyondan sonra meydana geldiğini göstermiş-

lerdir. Bu bilgiler ışığında PS eksternalizasyonunun ejaküle edilmiş spermin kapasitasyonunda apopitozla alakasız bir şekilde önemli fizyolojik rolü olduğu düşünülmektedir[73,74]. Dahası bikarbonat ile uyarılmış insan spermatozoasında PS translokasyonunun kaspazdan bağımsız olduğu gösterilmiştir. Benzer olarak, mitokondrial dejenerasyon veya DNA fragmantasyonu saptanamamıştır[75]. Muratori ve ark.[76] bu görüşe karşı olup "abortif apopitoz" teorisini savunmaktadırlar.

Plazma zarı asimetrisinin kaybolması bağlamında, kriyopreservasyonun oldukça hassas sperm plazma membranı üzerindeki etkisini vurgulamakta yarar vardır. Kriyoprezervasyonunun sperm motilite ve fertilizasyon yeteneği üzerindeki negatif etkisi bilinmektedir. Zar asimetrisinin kaybolması ve PS eksternalizasyonu dondurma-çözme işleminin canlı hücreler üzerindeki çeşitli etkilerinden sadece bir kısmıdır[66]. Son çalışmalar dondurma-çözme işleminden sonra anneksin V-positif spermatozoa'nın artmasının artmış DNA fragmantasyonuyla sonuçlanmadığını göstermiştir[77,78]. Bununla birlikte kriyoprezervasyon kaspazlardan 3, -8, -9'da belirgin aktivasyona yol açtığı gibi mitokondrial membran potansiyelinde bozulmaya yol açmaktadır[78]. Bundan yola çıkarak anneksin V bağlama testi kriyopreserve edilmiş insan sperminin kalitesini tahmin etmede değerli bir parametre olarak kabul edilebilir[79].

DNA fragmanatasyonunun fertilizasyon ve gebelik üzerine etkisi

Apopitozun erken işaretlerinin özellikle ejaküle edilmiş sperm başta olmak üzere insan spermatozoa'sı ve erkek ferilitesi üzerindeki etkileri tartışmalı olmasına rağmen apopitozun geç işaretlerinden olan DNA fragmantasyonunun etkileri oldukça kesin görünmektedir. Günümüzde sperm DNA hasarının sadece fertilizasyon ve gebeliğin sağlanması değil fötüsün üzerinde de olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir[5-8,12-15].

Bu hasar tipinin olumsuz etkileri intrauterin inseminasyon (İUİ)[80] ve invitro fertilizasyon (IVF)[59,65,81,82] üzerlerinde de gösterilmiştir. Twigg ve ark.[5] ile Henkel ve ark.[20,59] tarafından elde dilen veriler fragmante DNA'lı spermin hala fertilizasyon yeteneğini koruduğunu, ancak fertilizasyon sonrası paternal genom fonksiyonel hale geldiği anda gelişmenin durduğu ve başarısız gebelikle sonlandığı öne sürmektedirler. Doğal gebelikte bile sperm DNA'sı üzerindeki oksidatif stresin fertilizasyon ve gebelik üzerinde olumsuz etkisi olmaktadır[83,84]. Mamafih, ICSI'de birbiriyle çelişen sonuçlar verilmektedir. Yazarların bir kısmı hasarlı DNA'nın fetilizasyon ve gebelik üzerinde olumsuz etkileri olduğunu savunurken[20,85-87], bir diğer grup ise bir etkisinin olmadığını savunmaktadırlar[88-90].

Eğer DNA hasarının fertilizasyon üzerinde etkisi varsa fragmante DNA'nın kötü embryo kalitesi, kötü blastosist gelişmesi ve erken embryo ölümüne bile yol açmakta olduğunu düşünmek mantıklıdır[11,91,92]. Janny ve Menezo[93] klivaj ve blastosist oluşumu ile kuvvetli bir bağlantı bulmuşlardır. Shakuri ve ark[94] IVF ile kıyaslandığında ICSI da daha düşük blastosist oluşum oranları saptamışlardır. Greco ve ark[95] ejakule edilmiş spermde testiküler sperme göre çok daha fazla DNA hasarı saptamışlardır ve bu ulgudan yola çıkarak ICSI için testiküler spermlerin kullanılmasının DNA hasarının olumsuz etkilerinden korunmak içi daha iyi olacağını öne sürmektedirler. Fertilizasyon ve gebelik oranları üzerine yapılan bir çalışmada testiküler spermlerle ICSI da çok daha fazla gebelik sağlandığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada ejakulat spermleriyle sadece tek gebelik sağlanmış olup bu da abortusla sonlanmıştır. Bu yüzden yazarlar ejakulat spermatozoasında yaygın DNA hasarı olan hastalarda ICSI için testiküler spermatozoanın kullanılmasını önermektedirler.

Sperm DNA fragmantasyonunun asiste üreme yöntemleri üzerindeki olumsuz etkileri bilinmekle birlikte erkek genomunun oksidatif hasarının sebebi bilinmemektedir. Apopitoz özellikle gelişimin erken safhaları göz önüne alındığında bir etken gibi görünmektedir. Abortif apopitoz hipotezi bu noktada yetersi kalmaktadır ve DNA framantasyonunu açıklamaya yönelik alternatif hipotezler bu bölümünde açıklanacaktır.

SPERMATOGENEZ ve SPERM MATURASYONU SIRASINDA HATALI DNA PAKETLENMESİ ve LİGASYONU

Fragmante DNA'nın kaynağını bulmaya yönelik ikinci hipotez endojen çentiklerin fareler ve ratlarda spermatogenezin geç safhalarında (step-12-13 spermatidler) normal olarak bulunduğunu göstermiştir. Bu çentiklerin sayısının spermatidlerin yuvarlak formdan uzunlamasına forma geçiş sırasına en fazla olduğu görülmüştür. Kromatin paketlenmesi tamamlandığında bu çentikler tamamen kaybolmaktadır[18,96-99]. Bu noktadan yola çıkarak bu çen-

tiklerin sperm kromatin kondensasyonu sırasında fizyolojik ve fonksiyonel görevleri olduğu düşünülmektedir. McPherson ve Longo[18] spermatogenez sırasında kromatin paketlenmesi sırasında protaminasyonun kolaylaştırılması için çentiklerin oluşturulması ve bağlanması sırasında endojen nükleaz topoizomeraz II a ihtiyaç olduğunu öne sürmüşlerdir. Topoizomeraz II DNA replikasyonunun kromozom kondensasyanuna bağlanması sırasında önemli görevi vardır ve mitotik kromozomun toplanma işlemi sırasında hayati önemi olan ve büyük bir protein kompleksi olan kondensinle etkileşmektedir[100,101]. Bu enzim insan seminifer tübüllerinde de saptamıştır[102]. Spermiogenz sırasındaki muhtemel görevinin double-heliks in içinden geçebileceği geçici DNA çift sarmal kırıkları yaratmak ve daha sonra bunları tekrar kapatmak olduğu düşünülmektir[103]. Bu DNA üzerindeki kendi etrafında dönmeye bağlı gerimin azaltılmasına ve histaminleri protaminlerle yer değiştirmeleri sırasında kromatin yeniden yapılanmasını sağlamaktadır[18,100,104]. Bu yüzden, ejakule spermdeki endojen çentikler (DNA fragmantasyonu) spermatozoa'nın spermiogenezis sırasında yetersiz protaminasyon nedeniyle bozuk kromatin kondensasyonu ile sonuçlanan inkomplet maturasyonunu göstermektedir[105-107].

OKSİDATİF STRES

Sperm DNA fragmantasyonu hakkındaki 3. hipotez sperm DNA hasarı sebebi olarak oksidatif stresi öne sürmektedir. Oksidatif stres üremede merkezi rol oynuyormuş gibi gözükmektedir[108,109]. Bu sadece dişi de[110-112] geçerli olmayıp erkek üreme fizyolojisi ve patolojisi[113-117] de etkilidir. Bu son 20 yıldır giderek artan şekilde araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Ejakulat içinde ROP lökositler veya spermatozoa'nın doğrudan kendisi tarafından üretilebilmektedir.

Lökosit kaynaklı ROP'un sperm DNA fragmantasyonu üzerine etkisi

Üreme organlarının tekrarlayan inflamasyonu ve ejakulatta artmış lökosit sayısının erkek subfertilitesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir[114,118-120]. Bu infertil erkeklerin %10-20'sinde görülen bir durumdur[3]. Seminal plazmada lökositlerin bulunmasının invitro olarak sperm fertilizasyon kapasitesini etkilemediği hatta olumlu etkisi olduğu yönünde raporlar olsa da araştırma gruplarının çoğu lökositlerin erkek fertilitesi üzerindeki olumsuz etkileri konusunda hemfikirdir. Lökositospermi için halihazırda kullanılmakta olan sınır değeri (>1000.000 lökosit/ml)[3] değeri sadece ampirik bir değerdir[124] ve sadece yaklaşık bir sınıflamaya izin vermektedir. Bu yüzden lökosperminin saptanması asemptomatik urogenital enfeksiyon için güvenilir bir bulgu değildir[125]. Ek olarak lökositlerin araştırılması gerekliliği konusunda ortak bir kanı mevcut değildir.

World Health Organisation (WHO)[3] peroksidaz metodu ve monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan immünfloreans yöntemlerini önermektedir. Aslına bakılırsa bu iki yöntem birbirlerinden farklı sonuçlar vermektedirler. Villegas ve ark.[126] WHO tarafından önerilen peroksidaz metodunu hem yuvarlak hüce sayımı hem de CD15-pozitifliği (granülosit), CD45-pozitifliği (tüm lokositler) ve CD68-pozitifliği (makrofajlar)'nin immünfloresans yöntemle saptanmasıyla karşılaştırmışlardır. Metodlar farklı seviyelerde olmakla birlikte belirgin ölçüde uyumlu sonuçlar vermişlerdir. Ayrıca histokimyasal metodlarla kıyaslandıklarında farklı immünfloresan yöntemlerin kendi içlerinde daha uyumlu sonuçlar verdiği de ortaya çıkmıştır. Özellikle, immunfloresans yöntemlere göre diğer yöntemde saptanan peroksidaz-pozitif hücreler belirgin olarak daha azdır. Bu bariz farklılıklar semendeki lökositlerin tam sayısının saptanmasındaki zorluğu ve özellikle asiste üreme tekniklerinin başarısını önceden öngörmek için kullanılabilecek bir sınır değerin oluşturulmasındaki zorluğu gözler önüne sermektedir.

Lökositler fertilite[127], semen kalitesi[128] üzerine olumsuz etkileri bilinen sitokinleri salgıladıktan başka, PMN elastaz[129] ve ROP[130] da salgılamaktadırlar. Hüce yıkımını uyardığı bilinen PMN elastaz dışında[131], ROP da lipid peroksidasyonu ile biyolojik membranlara doğrudan zarar verebilmektedir. Plazma zarındaki sıra dışı denebilecek kadar fazla poliansatüre yağ asidi bulundurduğu için sperm hücresi ROP hasarına çok yatkındır[132]. ROP plazma zarı fonksiyonunu bozarak motilite kaybına ve sperm motilite analizlerinde azalmış penetrasyon oranlarına[115,133] ve hatta sperm ölümüne sebep olabilmektedir.

Lopes ve ark[134] ve Irvine ve ark[135] sperm DNA fragmantasyonu ROP tarafından indüklenebilmektedir. Alvarez ve ark[136] sperm DNA bütünlüğünün lökositospermik semen örneklerinde bile bozuldu-

ğunu göstermişlerdir. IUI, IVF ve ICSI da DNA hasarı oluşmasının fertilizasyon başarısızlığı ile sonuçlandığı düşünüldüğünde bu bulgunun önemi anlaşılmaktadır. Rop un nereden geldiği ayrımı mutlaka yapılmalıdır. Normalde ejakulatta buluna ve sperm den 1000 kat daha fazla ROP üreten lökositlerden mi[118,137] yoksa, oksijenasyon sırasında tüm hücrelerde üretildiği gibi spermin kendisi tarafından mı üretilmektedir[138].

ROP'un hem somatik hücrelerde[139,140] ve olgunlaşmakta olan spermatozoa[105] apopitozu uyardığı gösterilmiştir. Bu ROP tarafından başlatılan farklı ve doğrusal olmayan bir DNA hasar mekanizmasına işaret etmektedir. Ayrıca doğrusal bir mekanizmaya işaret eden kanıtlar da bulunmaktadır[21,141,142]. Bu teoriyi destekleyen veriler 8-hidroksideoksigunozin gibi oksidatif hasarın özel formlarının sperm DNA'sında arttığını[134,143] gösteren çalışmalardan gelmektedir. İlginç olarak infertil erkeklerin spermatozoalarının hidrojen peroksit (H_2O_2) ile DNA fragmantasyonuna[144,145] daha hassas olduğu ve DNA hasarına karşı koruyucu etkinin vitamin C, vitamin E, glutatyon veya hipotaurin gibi antioksidanlarla sağlanabileceği öne sürülmüştür[146,147]. Buna ek olarak ROP'un bu doğrudan etkisi lökositlerin ürettiği ROP'ların ileri derecede yüksek oksidatif potansiyele sahip olmaları ve yarı ömürlerinin nanosaniyeler (OH; hidroksil radikalleri) ve milisaniyelerle (O_2; süperoksit anyonu) ölçülmesiyle açıklanabilir. Ayrıca O_2 ve OH plazma zarını geçemezken H_2O_2 kalıcı ve inatçı olup plazma zarını geçebilmektedir. Spermatozoa invitro olarak ayrıştırıldığında ve seminal plazma ROP antidotlarından temizlendiği noktada lökosit tarafından yaratılan sperm hasarı daha fazla önem kazanmaktadır[148].

Pasqualotto ve ark.[149] infertil hastaların sadece artmış ROP seviyelerine sahip olmakla kalmayıp ROP'u nötralize eden mekanizmalarında da azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bu saptama ROP oluşumu ve antioksidan kapasitenin arasındaki dengenin üreme organları inflamasyonunda ve bunun sperm fonksiyonu ve fertilizasyon/gebelik oranlarında çok önemli rolü olduğunu desteklemektedir [50]. Benzer olarak daha yeni çalışmalarda lökospermi normal sınırı kabul edilen <1000.000 lök/ml eğerinin çok yüksek olabileceği söylenmektedir[21,120]. Bu sınır değerin çok altındaki lökosit değerlerinin ile sperm DNA bütünlüğüne zarar verebildiği gözönüne alındığında ejakulattaki lökositlerle DNA fragmantasyonu arasındaki ilişki reddedilemez görünmektedir[21,151].

Sperm kaynaklı ROP'un etkisi

Sperm DNA fragmantasyonu üzerine lökosit kaynaklı ROP' un etkisi yanında spermin kendisinden kaynaklı ROP'un etkisini de göz ardı etmemek gerekmektedir. Spermatogenez sırasında sertoli hücre fonksiyonundaki değişiklikler kötü morfogenezde sperm oluşumuna yol açabilir. Özellikle artmış sitoplazma başta olmak üzere morfogenetik bozuklukların fertilizasyonu etkilediği bilinmektedir[152]. Bu şekilde fazla sitoplazmik artık bulunduran spermler glukoz-6-fosfat dehidrogenaz[138] gibi spermatozoa içinde ROP oluşumunu uyaran sitoplazmik enzimlerden fazla miktarda bulundurmaktadırlar[138,153]. Henkel ve ark.[20] DNA fragmantasyonu için ROP üreten spermlerin miktarındaki oranının ejakulattaki lökosit oranından daha önemli olduğunu öne sürmektedirler. Bu Muratori ve ark.[154] endojen üretilen ROP'un DNA fragmantasyonunda rolü olduğuna dair yazısını desteklemektedir.

SONUÇLAR

Son yıllarda WHO standartları ile güvenilir şekilde tespit edilemeyen DNA fragmantasyonunun erkek infertilitesi üzerinde önemli etkisi olduğu saptanmıştır. DNA hasarı fertilizasyon ve gebelik başarısızlığında hatta erken embiryo kaybı yada doğan bebekte çocukluk çağı kanserleri gibi bir çok olumsuzluğun altında yatan önemli bir sebep olduğu için bu parametre androloji laboratuarlarının rutinine eklenmelidir. DNA hasarı etyolojisi multifaktöriyel gibi görünmektedir ve kesin bir etyolojik etkene bağlamak şu anda mümkün görünmemektedir. Bu konuda mevcut 3 adet hipotez vardır: 1) abortif apopitoz 2) spermatogenez sırasında uygunsuz DNA paketlenmesi ve bağlanması 3) oksidatif stres. Bu 3 hipotez bu bölümde tartışılmış olup her birini desteklemek için ayrı ayrı güçlü kanıtlar bulunmaktadır. 3. hipotez için ROP kaynağı olarak lökositler ve spermler öne çıkmaktadır. Günümüzde bu faktörlerden birden fazlasının DNA hasarında rolü olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden gebelik oranlarını artırmak ve erken çocukluk hastalıklarını engellemek için bu önemli fonksiyonel sperm parametresi konusunda daha fazla araştırma yapmak gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jochum M, Pabst W, Schill W-B. Granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of silent male genital tract inflammation. Andrologia 1986; 18: 413
2. Viljoen MH, et al. Alpha-glucosidase activity and sperm motiliry. Andrologia 1990; 22: 205
3. World Health Organizarion. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999
4. Zorn B, et al. Semen polymorphonuclear ncu-trophil leukocyte elasrase as a diagnostic and prognostic marker of genital tract inflammation - a review. Clin Chem Lab Med 2003; 41:2
5. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidarive damage of DNA In human spermatozoa does nor preclude pronucleus formation at intracyroplasmic sperm injecrion. Hum Reprod 1998; 13: 1864
6. Airken RJ, Kraus?, C. Oxidarive stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122:497
7. Alvarez JG. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. Minerva Ginecol 2003; 55: 233
8. Airken RJ, Sawyer D. The human spermarozoon — not waving but drowning. Adv Exp Med Biol 2003; 518:85
9. Qiu J, Hales BF, Robaire B. Damage to rac spermatozoa! DNA after chronic cyclophosphamide exposure. Biol Reprod 1995; 53: 1465
10. Qiu J, Hales BF, Robaire B. Effects of chronic low-dose cyclophosphamide exposure on the nuclei of rat spermatozoa. Biol Reprod 1995; 52: 33
11. Seli E, et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. Fertil Steril 2004; 82: 378
12. In't Veld P, et al. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. Lancet 1995; 346:773
13. KurinczukJJ, Bower C. Birch defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. Br Med J 1997; 315: 1260
14. Ji BT, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of non-smoking mothers. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 238
15. Aitken RJ, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1 998; 59: 1037
16. Sakkas D, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev Reprod 1999; 4: 31
17. Sakkas D, et al. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. Biol Reprod 2002; 66: 1061
18. McPherson SMG, Longo FJ. Localization of DNAse I-hypersensitive regions during rat sper-matogenesis: stage dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. Mol Reprod Dev 1992; 31: 268
19. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. Urol Clin North Am 2002; 29: 817
20. Henkel R, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and ART. Reprod Biomed Online 2003; 7: 477
21. Henkel R, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertil Steril 2005; 83: 635
22. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239
23. Luo X, et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell 1998; 94: 481
24. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. EMBO J 1998; 17: 37
25. Whittington K, et al. Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. Int J Androl 1999; 22: 236
26. Arends M, Wyllie A. Apoptosis: mechanism and roles in pathology. Int Rev Exp Pathol 1991; 32: 223
27. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 1980; 284: 555
28. Martin SJ, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserinc is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med 1995; 182: 1545
29. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic ceils using fluorescence labelled annexin V. J Immunol Meth 1995; 180: 39
30. Van Hcerde WL, Degroot PG, Reutelingsperger CPM. The complexity of the phospholipid binding protein annexin V. Thromb Haemost 1995; 73: 172
31. Lee J, et al. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. Endocrinology 1997; 138:2081
32. Watanabe-Fukunaga R, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. J Immunol 1992; 148: 1274
33. Krammer PH, et al. Regulation of apoptosis in the immune system. Curr Opin Immunol 1994; 6: 279

34. Schulze-Osthoff K, et al. Celt nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. J Cell Biol 1994; 127: 15
35. Nagata S, Golstein P The Fas death factor. Science 1995; 267: 1449
36. Suda T, et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 1993; 75: 1169
37. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: Ipr and gld mutations. Tmmunol Today 1995; 16: 39
38. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca (2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity.JExpMed 1993; 177: 195
39. Griffith TS, et al. Fas ligand-induced apoprosis as a mechanism of immune privilege. Science 1995; 270: 1189
40. French LE, et al. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. J Cell Biol 1996; 133:335
41. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998; 281: 1312
42. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ 1999; 6: 1028
43. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem 1999; 68: 383
44. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995; 267: 1445
45. Reed JC. Apoptosis-reguktiiig proteins as targets for drug discovery. Trends Mol Med 2001; 7: 314
46. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol 2000; 157: 1415
47. Green DR. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. Immunol Rev 2003; 193: 5
48. Wei MC, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science 2001; 292: 727
49. Kuwana T, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. Cell 2002; 111: 331
50. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. BioEssays 2000; 22: 423
51. Rodriguez I, et al. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. EMBO J 1997; 16: 2262
52. Russell LD, Peterson RN. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. J Reprod Fertil 1984; 70: 635
53. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that sper-matid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. Endocrinol 1988; 122: 787
54. Braun RE. Every sperm is sacred - or is it? Nat Genet 1998; 18:202
55. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rat: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. Anat Rec 1978; 190: 905
56. Blanco-Rodriguez J. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. Int J Androl 1998; 21: 236
57. Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C. Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. Biol Reprod 1999; 61: 1541
58. Sakkas D, Mariethoz E, Sr. John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. Exp Cell Res 1999; 251: 350
59. Henkel R, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. Fertil Steril 2004; 81: 965
60. Taylor SL, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. Mol Hum Reprod 2004; 10:825
61. McVicar CM, et al. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. Fertil Steril 2004; 81 (Suppl 1): 767
62. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human tesris in vitro. Am J Physiol Endocrinol Metab 1999; 276: E310
63. Castro A, et al. Absence of Fas protein detection by flow cytometry in human spermatozoa. Fertil Steril 2004; 81: 1019
64. Lachaud C, et al. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. Hum Reprod 2004; 19: 607
65. Sun JG, Jurisicova A, Casper RE Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biol Reprod 1997; 56: 602
66. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. Mol Hum Reprod 1999; 5: 109
67. Oosterhuis GJ, et al. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? Fertil Steril 2000; 74: 245
68. Weng SL, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. Mol Hum Reprod 2002; 8: 984

69. Weil M, Jacobson MD, Raff MC. Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. J CellSci 1998; 111:2707
70. Paasch U, et al. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. Fertil Steril 2004; 81: 802
71. Cayli S, et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bel-XL levels in mature and diminished maturity sperm. Mol Hum Reprod 2004; 10: 365
72. Li CY, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. J Biol Chem 2000; 275: 25665
73. Gadella BM, Harrison RAP. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophos-pholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. Bio! Reprod 2002; 67: 340
74. Kotwicka M, Jendraszak M, Warchol JB. Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. Folia Histochem Cytobiol 2002; 40: 111
75. de Vries KJ, et al. Caspase-independenr exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive. Biol Reprod 2003; 68: 2122
76. Muratori M, ct al. AnnexinV binding and merocyanine staining fail to derect human sperm capacita-tion. J Androl 2004; 25: 797
77. Duru NK, et al. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. J Androl 2001; 22: 646
78. Paasch U, et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of human spermatozoa. Biol Reprod 2004; 71: 1828
79. Sion B, et al. Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryoprescrved spermatozoa. Int] Androl 2004; 27: 108
80. Duran EH, et al. Sperm DNA quality predicts imrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. Hum Reprod 2002; 17: 3122
81. Host E, Eindenberg S, Smidt-Jensen S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. Acta Obstet Gynecol Scand 2000; 79: 189
82. Morris ID, et al. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Hum Reprod 2002; 17: 990
83. Spano M, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. Fertil Steril 2000; 73: 43
84. Loft S, et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. Hum Reprod 2003; 18: 1265
85. Lopes S, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with foiled fertilization in intracyroplasmic sperm injection. Fertil Steril 1998; 69: 528
86. Lewis SEM, et al. An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. Hum Reprod 2004; 19: 1385
87. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. Hum Reprod 2004; 19: 611
88. Host E, Lindenbcrg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. Acta Obstet Gynecol Scand 2000; 79: 559
89. Bungum M, et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. Hum Reprod 2004; 19: 1401
90. Candini L, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. Hum Reprod 2004; 19: 1409
91. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. Mol Hum Reprod 1996; 2: 93
92. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm corner assay parameters. Hum Reprod 2002; 17: 1856
93. Janny L, Menezo YJR. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. Mol Reprod Dev 1994; 38: 36
94. Shoukir Y, et al. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? Hum Reprod 1998; 13: 1632
95- Greco E, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2005; 20: 226
96. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod 1991; 44: 569
97. McPherson SMG, Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. Dev Biol 1993; 158: 122
98. McPherson SMG, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. EurJ Histochem 1993; 37: 109
99. Sakkas D, et al. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packing in

maturing and fertilizing mouse spermatozoa. Biol Reprod 1995; 52: 1149

100. Hirano T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. Genes Dev 2002; 16: 399
101. Cuvicr O, Hirano T. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. J Cell Biol 2003; 160: 645
102. Sakkas D, et al. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. Reprod Biomed Online 2003; 7: 428
103. Wang JC, Caron PR, Kirn RA. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? Cell 1990; 62: 403
104. Chcn JL, Longo FJ. Expression and localization of DNA topoisomerase II during rat spermatogenesis. Mol Reprod Dev 1996; 45: 61
105. Gorczyca W, et al. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoprosis of somatic cells. Exp Cell Res 1993; 207: 202
106. Manicardi GC, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromornycin A3 accessibility. Biol Reprod 1995:52:864
107. Sailer BL, Jost EK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl trans-ferase assay. J Androl 1995; 16: 80
108. Riley JCM, Behrman HR. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. Proc Soc Exp Biol Med 1991; 198: 781
109. AgarwalA, Saleh RA, BedaiwyMA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Sterii 2003; 79: 829
110. Oyawoye O, et al. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. Hum Reprod 2003; 18: 2270
111. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. Reprod Med Biol 2004; 3: 177
112. Glamoclija V, et al. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. Fertil Sterii 2005; 83: 426
113. Aitken RJ, Clarkson 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
114. Plante M, de Eamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. Fertil Sterii 1994; 62: 387
115. Vigil P, et al. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. Andrologia 1994; 26: 55
116. Whittington K, et al. Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. Int J Androl 1999; 22: 236
117. Koksal IT, et al. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. Asian J Androl 2003; 2: 95
118. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. Fertil Sterii 1995; 63: 1143
119. Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. Hum Reprod Update 1999; 5: 399
120. Sharma RK, et al. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. J Androl 2001; 22: 575
121. Tomlinson MJ, et al. Round cells and sperm fertilizing capacity: the presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization. Fertil Sterii 1992; 58:1257
122. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. Fertil Sterii 1993; 60: 1069
123. Kaleli S, et al. Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility?: The tole of different seminal leukocyte concentrations. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 89: 185
124. Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans? Hum Reprod 1995; 10: 1736
125. Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and the female reproductive tract. Hum Reprod 1990; 5: 639
126. Villegas J, et al. Indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies lor the detection of leukocytospermia: comparison with peroxidase staining. Andrologia 2002; 34: 69
127. Hill JA, Cohen J, Anderson DJ. The effects of lymphokines and monokines on sperm fertilizing ability in the zona-free hamster egg penetration test. Am J Obstet Gynecol 1989; 160: 1154
128. Eggert-Kruse W, et al. Relationship of seminal plasma interleukin (IL}-8 and IL-6 with semen quality. Hum Reprod 2001; 16: 517
129. Schill W-B, et al. Biochemical aspects of semen analysis. In Hedon B, Bringer J, Mares P, eds. Fertility and Sterility. A Current Overview. New York: Parthenon Publishing, 1995, 303
130. Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. Int J Androl 1990; 13:433

131. Hautamaki RD, et al. Requirement for macrophage clastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science 1997; 277: 2002
132. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel *S.* Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Rcprod 1989; 40: 183
133. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl 1988; 9: 367
134. Lopes S, et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 896
135. Irvine DS, et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl 2000; 21: 33
136. Alvarez JG, et al. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril 2002; 78:319
137. de Lamirande E, Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. Free Radic Biol Med 1995; 18:487
138. Gomez E, et ai. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. J Androl 1996; 17: 276
139. Ratan RR, Murphy TH, Baraban JM. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. J Neurochem 1994; 62: 376
140. Huang C, et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human hepatoma cells is mediated by CD95{APO-l/Fas) receptor/ligand system and may involve activation of wild-type p53. Mol Biol Rep 2000; 27: 1
141. Saleh RA, et al. Lcukocytospermia *is* associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertil Steril 2002; 78: 1215
142. Moustafa MH, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Hum Reprod 2004; 19: 129
143. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. Free Radic Biol Mcd 2000; 28: 529
144. Hughes CM, et al. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. Mol Hum Reprod 1996; 2: 613
145. Hughes CM, et al. The effects of antioxidant supplementation during Percoil preparation on human sperm DNA integrity. Hum Reprod 1998; 13: 1240
146. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. Mutagenesis 1999; 14: 505
147. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. Mutagenesis 2000; 15: 61
148. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril 1992; 57: 409
149. Pasqualotto FF, et al. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil Steril 2000; 73: 459
150. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr Med Chem 2001; 8:851
151. Zorn B, Virant-Klun I, Mcden-Vrtovec H. Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. Hum Reprod 2000; 15: 1978
152. Keating J, et al. Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. J Reprod Fertil 1997; 110:71
153. Aitken RJ, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. Mol Reprod Dev 1997; 47: 468
154. Mtiratori M, et al. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spetmatozoa during long term incubation. J Andtol 2003; 24: 253

20

Embriyolog Bakış Açısıyla Paternal Faktörün Embriyo Kalitesi ve Gelişmesi Üzerine Etkisi

Marie-Lena Windt

Çeviri: *E.Oğuz Güven*[*]

GİRİŞ

Yardımcı üreme tekniklerinin amacı gebeliğin sağlanması, devam ettirilmesi ve sağlıklı bir bebek dünyaya gelmesidir. İmplantasyon şansı en yüksek olan embriyonun karakterize edilemesi gere- ği açıktır. Embriyo gelişmesinin invitro safhalarında embiryo kalitesini ölçmek için birçok marker kullanılmaktadır. İmplantasyon için en uygun embriyoların belirlenmesi başarı şansını artırdığı gibi aynı zamanda daha az embriyonun anneye transfer edilmesiyle çoğul gebelik riskini de azaltmaktadır[1,2].

Embiryo seçimi kılavuzlarda tariflendiği gibi geleneksel olarak embriyo morfolojisi ve klivaj sayısına bakılarak yapılır[2,3,4].

Pronüklear morfoloji[5-14], oosit ve pronükleus polaritesi ve klivaj simetrisi[1,5,6-9,12,15], 2 hücre safhasına erken klivaj[16-29] ve genişletilmiş blastosist kültürü[9,15,30-36] emryo seçme metodlarıdır. Birçok çalışma yukarıda bahsedilen metodların kombinasyonun[37] kademeli embriyo skoru (graduated embriyo score/GES)[38], toplam embriyo skoru (cumulative embriyo score/CES) veya transfer edilen embriyoların ortalama skoru (mean score of transferred embriyos/MSTE)[39] için gerekli olduğunu savunmaktadır.

Alternatif olarak, embriyo kültüründe bazı metabolitlerin tespit edilmesi de son yıllarda dikkati üzerine toplamıştır. Bunların içinde en umut verici olanları seviyeleri artmış olan trombosit aktivasyon faktörü (platelet activation factor (PAF))[40] ve çözünebilir insan lökosit antijen-G (soluble human leukocyste antigen-G (sHLA-G))[42-49]dır. Bu moleküllerin varlığı artmış gebelik oranlarıyla birliktedir, ancak bunların gerçek önemini vurgulamak için konuyu daha derinlemesine inceleyen çalışmalara gerek vardır.

Kötü kültür şartlarının embriyo implantasyon potansiyelini kötü yönde etkileyebilse de, embriyo canlılılığı ve gebeliğe bağlı faktörler asıl olarak oositle bağlantılıdır. Üzerinde daha az durulmuş olmasına karşın fertilian spermatozoon da implantasyon potansiyeline mutlak etki etmektedir.

[*] Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Hatay.

Tesarik[43] tarafından yapılan bir derlemede insan preimplantasyon embriyosunun hücre bölünmesi üzerindeki paternal etkiler tartışılmıştır.

SPERMATOZOA, EMBRİYO MORFOLOJİSİ ve EMBRİYO SEÇME METODLARI

Embriyo Kültürü Metabolitleri

Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF)

Roudebush ve ark.[40] yaptığı bir çalışmada Embriyo kültürü ortamında (3. gün embriyoları) PAF konsantrasyonlarının gebelik sağlanmasıyla belirgin olarak bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Gebeliğin belirteci cut off değeri olarak 45 pmol/l/per embriyo saptanmıştır. Yazarlar PAF'ın embriyo gelişiminin otokrine uyarıcısı olarak çalıştığını öne sürmüşler ve PAF'ın embriyo kültür ortamına konulmasının farede embriyo gelişimini desteklediğini göstermişlerdir[44-45].

Paternal açıdan bakıldığında, PAF insan spermatozoa sında da bulunur[40] ve seminal parametreler ve gebelik sonuçlarıyla doğrusal ilişkisi vardır. Bazı primatlarda üreme sezonunda spermatozoal PAF seviyesi belirgin derecede artar. Oositler PAF ile muamele edilmiş spermatozoalarla döllendiklerinde embriyo gelişiminde artış olduğu rapor edilmiştir[46]. PAF'ın sperm fonksiyonu, embriyo gelişimi ve gebelikteki yeri kesin olmamasına karşın üremede önemli rolü var gibi görünmektedir.

Çözünebilir İnsan Lökosit Antijeni-G (sHLA-G)

HLA-G embriyo bölünme hızı ve implantasyon potansiyeliyle alakalı olan klasilk olmayan tip-1 HLA dır. Sher et al. In bir çalışmasında[42], en az 1 tane HLA-G pozitif embriyonun tranferiyle gebelik için %71 pozitif prediktif deger saptanmışken, HLA-G negatif embriyoların tranferiyle %85 negatif prediktif değer saptanmıştır.

Noci ve ark.'ın benzer bir çalışmasında HLA-G nin varlığının saptanmasının embriyo morfolojisi (blastomer sayısı, blastomer düzensizliği ve embriyo fragmentasyonu) ile bağlantılı olmadığı, fakat transfer edilen embriyoların supernatantlarında HLA-G saptanmadığı zaman gebeliğin oluşmadığını saptamışlardır. Embriyo kültür ortamında HLA-G olduğunda gebeliğin oluştuğu sonucunu çıkartmışlardır.

Paternal etki Sperm hücresinin HLA-G üretimindeki rolü kesin değildir ve paternal faktörün bu embriyo canlılık faktörüyle bağlantılı olduğuna dair hiçbir kanıt yoktur.

Pre-embriyo ve embriyo karakteristikleri

Pronüklear safha morfolojisi

Pronukleat (PN, pronükleus, pronüklei anlamlarına da gelir) embriyo morfolojisi (inseminasyondan 18 saat sonra) incelenmesi için kriter Tesarik ve Greco[5] tarafından tariflenmiştir ve 0-model PN zigotlar olarak adlandırılan zigotların daha iyi embriyo morfolojisiyle, daha az multinükleasyonla ve daha yüksek implantasyon ihtimaliyle alakalı olduğunu saptamışlardır. 0-model PN zigotlar şu şekilde özetlenebilir: Nüklear öncü şekiller üçten daha fazla çeşitlenmezler; nüklear öncü şekillerin sayısı asla üçten az olmaz; nüklear öncü şekiller en az bir pronükleusda yediden az oldukları zaman polarize olurlar ama yediden fazla olduklarında asla polarize olmazlar; her iki pronükleide nüklear öncü şekillerin dağılımı polarize olmuş yada olmamış şekildedir[2].

PN skorlamasıyla ilgili birçok çalışma erken bölünme (klivaj), embriyo morfolojisi, blastosist hızıve implantasyon hızı ile iyi korele olduğunu göstermiştir.

Paternal etki Demirel ve ark[49] tarafından iyi kalite pronükleat embriyo oluşmasında sperm hücresinin muhtemel rolü araştırımıştır. İki sperm hücresi kaynağı kullanmışladır: intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sikluslarında (ICSI) ejakulasyondan elde edilen sperm (ES) hücreleri testiküler sperm (TS) hücrelerini kullanmışlardır. DNA paketlenmesindeki, oosit-aktive eden sperm faktörleri ve TS ve ES arasında sperm hücresi gelişmesi fertilizasyonu ve PN morfolojisini etkileyebilir. ES ve TS arasında PN morfolojisi açısından fark olmadığını göstermişlerdir.

Rossi-Ferragut ve ark.[50] bir çalışmasında nonmale-faktör hastaların ES lerinden yapılan ICSI da oligozoospermi ve TS hastalarından yapılan ICSI ya göre belirgin olarak fazla 0-model PN oluşmuştur. TS hastaları kendi içlerinde de epididimal ve testiküler olarak 2 gruba bölünmüşlerdir. Epididimal grupta belirgin olarak daha fazla 0-paterni saptanmıştır. Sonuçlar sperm kalitesinin PN morfolojisini etkileyebileceğini ve bazı paternal bağlantılı faktörlerin embriyonun kromozomal kalitesinde rol oynayabileceğini göstermiştir.

Tesarik ve ark[51] çalışmasında, kardeş oositler farklı semen örnekleriyle etkileştirilmişlerdir. Bazı örnekler diğerleriyle karşılaştırıldıklarında belirgin olarak daha kötü PN morfolojisi göstermişlerdir. Ve yazarlar bu bozulmuş gelişme potansiyelinin özellikle fertilizan spermatozoona atfedilebileceğini ancak oositin suçlanamayacağını söylemişlerdir. Fertilizasyon oranlarının sperm donörleri arasında değişiklik göstermesi ilginçtir. Farklı sperm donörlerinde üretilen embriyolarda kötü PN morfolojisi 2 ve 3. gün embriyolarının morfolojilerinde de devam etmektedir. Yazarlar altta yatan mekanizma için, erkek PN'sinin erken transkripsiyonal başarısızlığı paternal kaynaklı gelişimsel bozukluğun sebebi olabilir hipotezini ortaya atmışlardır. Ancak, oosit aktivasyonundan sorumlu epijenik sperm faktörlerinin etkisiyle veya sperm sentrozomunun yetersiz aster-birleştirici etkisiyle de oluşuyor olabilir. Sonuç olarak yazarlar kötü PN morfolojisine sebep olan sperm faktörlerinin diğer semen parametreleriyle ilgisi olmadığı gibi ICSI de spermin fertilizan kapasitesiyle de ilgili olmadığını söylemişlerdir.

Tesarik ve ark[43,52] yaptığı bir çalışmada donor oositler ICSI de farklı meni örnekleriyle muamele edilmişlerdir. Spesifik meni örnekleriyle yapılan inseminasyon 0-model PN ye sahip kontrol hastalarıyla (kardeş oositlerle yapılan) karşılaştırıldığında belirgin olarak daha kötü PN morfolojileriyle (%66.2 ye %10) ve daha kötü implantasyon oranları (%36.7 ye %3.3) sonuçlanmıştır. Her iki grupta da DNA fragmentasyon oranları benzerdir (%8.9 karşılık %8.7). Bu hastalarda embriyonik genom ekspresyonundan da önce embriyo kalitesini ve implantasyon oranını etkileyen erken paternal faktörün olduğu düşünülmektedir. Erkan paternal etki sperm sentriolü anomalileri veya sperm kaynaklı oosit aktive edici faktördeki anormalikler sebebiyle olabildiği düşünülmektedir.

Aynı çalışmadaki diğer bir hasta grubunda ise bir geç paternal faktör ortaya çıkarılmıştır. Kardeş oositlerden elde edilen kontrol grubuyla kıyaslandığında, 0-model PN sıklığı aynıdır ancak her iki gruptaki DNA fragmantasyonu (%27.6 ya %8.3) olup implantasyon oranı da %0'a karşılık %37.5'dir. Bu sonuçlar tekrarlayan yardımcı üreme tekniklerinin zigot ve embriyo morfolojisinde belirgin bir bozukluk olmadığı hallerde başarısız olduğu hallerde genellikle fragmante DNA miktarı fazla olan spermatozoa varlığında geliştiğini göstermektedir.

Yazarlar[43,52] iki ayrı patolojinin aynı anda olabileceği sonucuna varmışlardır (geç olduğu kadar erken paternal etki de yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarını etkilemektedir).

Erken bölünen embriyolar

Bu yaklaşım (inseminasyondan 25-27 st sonra 2-hücre safhasına erken bölünme) ilk olarak Shoukir ve ark[16] ve Sakkas ve ark[17] tarafından tarif edilmiştir. Tarif edildiği günden beri birçok çalışma tarafından sonuçları doğrulanmıştır ve diğer tüm çalışmalar erken bölünmeyi embriyo canlılığı için bir işaretçi olarak kullanmışlardır[18-29].

Çiray ve ark[27] çalışması dışında yukarıda bahsedilen tüm çalışmalar erken bölünen embriyo işaretçisi artmış gebelik oranlarıyla pozitif koreledir fakat implatasyon oranları belirgin derecede artmıştır. Erken bölünen embriyo 0-model PN zigotları[21,49], iyi kalite klivaj-evresi embriyoları[17,20,22,24,26-29], mononükleasyon[24] ve blastosist oranları[22,28,29] gibi diğer embriyo canlılık işaretçileri ile pozitif koreledir.

Van Montfoort ve ark[28] erken klivaj evresinin gebelik başarısı ve blastosist gelişmesi için bağımsız bir belirteç olduğunu göstermişlerdir. Lundin ve ark çalışması da bunun ICSI hastaları içinde geçerli olduğunu göstermişlerdir.

Kendi programımızdan elde ettiğimiz sonuçlarda[29] üstte belirtilen çalışmalarla benzerdir. Klinik ve devam eden gebelik oranları erken bölünen embriyo transfer edilen vakalarda sadece geç bölünen embriyo transfer edilmiş vakalara göre belirigin olarak iyidir. Erken bölünen embriyo vakalarının gebelik sonuçları istatistiki analizi de belirgin olarak iyidir.

Paternal etki Shoukir ve ark.[16]ya göre erken klivajın nedeni belli değildir ve oosit ve embriyoya ait intrinsik faktörlerden kaynaklanıyor olabilir. Sakkas ve ark.[17]na göre HLA-G etkenlerden biri olabilir. Ayrıca farklı erkeklerden elde edilen farklı değerlere sahip semenlerin erken klivaj oranları birbirlerinden farklı değildir[17].

Lundin ve ark[20] bir çalışmasında erken-klivaj embriyolar uygun sitoplazmik ve nüklear olgunluğa erişmiş oositlerden geliştiğini öne sürmğşlerdir, fakat aynı zamanda paternal faktörün (spermatazoa) muhtemel önemi olabileceğini de öne sürmüşlerdir. Spermatazoa oositin embriyoya dönüşümündeki mitotik bölünmeyi kontrol sentriolleri içerir ve bu yüzden erken klivajda rolü olabilir[20,27].

Fertilizan spermatozoa'nın erken klivajdaki rolü Fenwick ve ark[22] ve Wharf ve ark.[26] tarafından da tartışılmıştır. Her iki grupta fertilize oositin 2 hücreli embriyoya geçişinin sperm tarafından uyarılan serbest kalsiyum konsantrasyonu ile olduğundan yola çıkarak oositlerin ilk klivaja girme potansiyellerinin spermatozoanın kalsiyum transientlerini uyarma yeteneğine bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bunun yanında oosit maturasyonu da önemli bir etken olabilir ve daha az matür oositler sperm tarafından indüklenen stimulusa cevap veremiyor olabilirler.

Sonuç olarak kromozom anomalileri fertilizan spermatozoon da yada oositten birinde veya her ikisinde de olabilir ve bu faktörler birlikte yada ayrı ayrı erken klivajı etkiliyor olabilir[26].

Klivaj-evresi embriyo kalitesi

Embriyo klivaj hızının (birim zamanda gelişen blastomer sayısı) implantasyon etkinliği ile belirgin derecede bağlantılı olduğu gösterilmiştir[3,4]. +-5 hücre evresindeki 2. gün embriyosunun ve en az 7 hücre evresindeki 3. gün embriyosu transferi belirgin olarak daha yüksek implantasyon oranları göstermektedir. Ancak, çok hızlı bölünen embriyoların (3. günde 8 hücreden fazla) %70'inin kromozomal anomalisi olduğu gösterilmiştir[53,54].

Transfer için embriyo seçimindeki en sık kullanılan metod klivaj-evresi embriyo morfolojisidir[2,55]. Blastomer fragmantasyonu, blastomer büyüklüğü ve simetrisi ebryo mofolojisi incelenirken dikkate alınan faktörlerdir. Blastomerlerin multinükleasyonu (özellikle 2- ve 4-hücre safhasında) embriyo canlılığında çok önemli faktörler olarak kabul edilmektedirler[56]. Multinükleasyon genellikle kötü kalite blastosisti olan embriyolar ve asimetrik blastomerlerle[56,57] alakalıdır ve aynı ölçülere sahip embriyolar, simetrik blastomerler daha yüksek canlılığa sahip oldukları gösterilmiştir[2,58]. Alikani ve ark.[59]göre fragmantasyon derecesi (%15) ve şekli (blastomerlerle bağlantılı büyük parçalar) gebelik oranları ve blastosist oluşumu üzerinde belirgin derecede negatif etkisi vardır.

Bir çok invitro fertilizasyon merkezi daha iyi embriyo seçimi ve dolayısıyla daha az çoğul gebelik için 5., 6. günde uzamış blastosist evresi kültürü kullanmaktadır. Bu evrede embriyonik genom eksprese edilir ve embriyo canlılığı üzerinde etkisi olduğuna inanılan paternal genetik faktörler etkilerini göstermiş olabilirler. Genetik olarak normal embriyoların seçimi uzamış blastosist kültürü ile kolaylaştırılır ve bu sayede gebelik oranlarında artış olur. Ancak blastosist kültürünün faydalar konusunda tartışma halen sürmektedir. Çalışmaların çoğu 3-gün embriyo transferi ile arasında fark olmadığını göstermektedir[2,35]. Blastosist hızı ve PN morfolojisi, erken bölünme ve kaliteli klivaj-evresi[60] arasında iyi bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Ancak, Rubio ve ark.[61] blastosist kültürünün embriyolardaki kromozomal anomalileri engellendiğini göstermişlerdir.

Her şeye rağmen blastosist transferinin artmış implantasyon oranları ve azalmış çoğul gebeliklerle sonlandığı gösterilmiş olup[2] birçok merkez için tercih edilen seçme metodu olarak kullanılmaktadır.

Paternal etki

Klivaj hızı Salumets ve ark.[62] tarafından sperm morfolojisinin embriyo klivajı üzerine belirgin etkisi saptanmıştır. Diğer semen parametreleri klivaj hızı üzerinde etkileri yoktur. Aynı çalışmada[62] oositin embriyo klivaj hızı ve morfolojisi üzerinde belirgn etkisi olduğu gösterilmiştir[63].

Bazı çalışmalar sprm hücresi morfolojisi ve DNA hasarı veya sperm elde etme yöntemlerinin kötülüğü[64] arasında bağlantı saptadıkları için yazarlar bunun kötü sperm morfolojisi ve embriyo klivaj hızı arasındaki bağlantıdan sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca morfolojik olarak anormal psermatozoa'daki sentrizom defeklerinin de muhtemelen sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir[62].

Çok düşük sperm hücresi konsantrasyonunun (cryptozoospermia) klivaj hızı üzerindeki etkisi Strassburger ve ark tarafından gösterilmiştir[65]. Daha yüksek sperm konsantrasyonuna bağlı vakalarla karşılaştırıldıklarında bu vakaların embriyolarının çok azı 2. günde 4-hücre sevitesine ulaşabilmiştir.

Embriyo morfolojisi Embriyo gelişimde paternal faktörün yerini araştıran çalışmaların çoğu ölçüm aracı olarak embriyo morfolojisini kullanmışlardır. Bu çalışmalar semen parametrelerinin (özellikle sperm hücresi morfolojisi) ve spermatzoa nın DNA durumunun embriyo morfolojisi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir.

Cohen ve ark.[66] ve Parinaud ve ark.[67] yetersiz sperm kalitesinin kötü embriyo kalitesiyle sonuçlandığını iddia etmişlerdir. Embriyo kalitesi sperm kalitesinden özellikle de sperm baş kısım anomalilerinden etkilenmektedir. Bu erkek gametin

embriyogenezin erken safhalarında öenmli rolü olduğunu düşündürmektedir[67]. Grow ve Oehninger in bir derlemesinde[68] baş anomalilerinin artmasının gebelik oranlarını düşürdüğü öne sürülmüştür.

Çalışmaların büyük çoğunluğu ise normal sperm hücresinin embriyo morfolojisi üzerine etkisi olmadığını savunmaktadır. Salumets ve ark.[62] çalışmasında sperm morfolojisinin Tygerberg strikt kriterleri ile incelenmesi sonucunda embriyo morfolojisinde hiçbir etkiye rastlanmamıştır (klivaj hızının anlamlı oranda etkilenmesine rağmen). Hots ve ark[69] da world Health Organisation (WHO) kriterlerini kullanarak sperm morfolojisi ile embriyo morfolojisi arasında bağlantı yoktur sonucuna varmışlardır. De Vos ve ark.[70] ICSI esnasında tespit edilen sperm morfolojisinin fertilizasyon ile anlamlı derecede bağlantılı olduğunu ancak embriyo gelişimini etkilemediği sonucuna varmışlardır. Kellerman ve Windt in (2004) yayınlanmamış sonuçlarına göre hem ICSI hem de IVF yöntemlerinde 2. ve 3. gün embriyo kalitesi ile sperm morfolojisi arasında bağlantı saptanamamıştır.

Diğer sonuçlara benzer olarak Moilen ve ark.[71] ve Miller ve Smith[72] tarafından da ICSI grup hastaları kötü kalite sperm grubu ve IVF grubunu iyi kalite sperm grubu olarak kullandıkları bir çalışmada embriyo morfolojinsin semen parametrelerinden etkilenmedikleri sonucuna varmışlardır. Bu sonuç Sakkas ve ark[73] çalışmasından da elde edilmiştir. Bu çalışmada oosit-paylaşımlı bir modelde ICSI ile kıyaslandığında IVF nin embriyo kalitesinin değişik olmadığını göstermişlerdir. Ancak yazarlar bazı hastalarda kötü kalite embriyo oluşumun daimi olduğunu ve bunun oosit faktörüyle açıklanamayacağını da öne sürmüşlerdir. Bu vakalarda semen parametreleri dışında bir paternal faktörün varlığı düşünülmektedir. Bu vakalarda nüklear anomaliler, defektif sentrizomlar ve oksidatif stresin rolü olabileceğini ortaya atmışlardır. Virant-Klun ve ark.[74] klasik semen parametrelerinin embriyo kalitesi ve embriyo gelişiminin durması ile bağlantısı olmadığını ne sürmüşlerdir.

Katsoff ve ark[75] hipoosmotik şişme testinde (sperm hücre membranının bütünlüğünü kontrol eden bir test) düşük puan almış spermatzoalar ile yapılan IVF lerde gebelik oranlarının belirgin olarak düşük olduğunu ancak bunun fertilizasyon hızını veya embriyo morfolojisini etkilemediğini göstermişlerdir. Embriyo canlılığının oosite de geçip oositin de hücre zarının zayıflatan sperm hücre zarı paternal faktöründen etkilendiği düşünülmektedir.

Sperm hücresinden kaynaklanan reaktif oksijen parçacıklarının (ROP) 20 saatlik uzun ve 2 saatlik kısa inkubasyonlardaki etkisi Kattera ve ark[76] tarafından araştırılmıştır. Kısa inkubasyon süresi embriyo kalitesi üzerinde ve devam eden gebelik oranları üzerinde belirgin pozitif etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu kısa süreli inkubasyon grubunda defektif spermatozoaya ile daha kısa süreli maruz kalma ile açıklanabilir. Bozuk spermatozoalar ROP üretirler ve artmış ROP seviyelerinin gebelik sonuçlarında belirgin negatif etkileri olduğu bilinmektedir. Kısa süreli inkubasyon grunu 1. günde kültür ortamında daha az estradiol (E2) ve progesteron (P4) saptanmıştır. Bu hormonlar uzun süreli inkubasyon grubunda negatif toksik etki yaratıyor olabilirler. Şu ana kadar embriyo kalitesi üzerinde kesin bir paternal etki gösterilmemiştir.

Strassburger ve ark[65] çalışmasında kriptozoospermi'nin embriyo kalitesi üzerinde belirgin negatif etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Kötü kaliteli sperm örneklerinde aynı zaman da yüksek oranda DNA fragmentasyonu da olduğundan dolayı bu durumdan genetik etyolojinin ya da hasarlanmış DNA'nın sorumlu olacağını öne sürmüşlerdir.

Embriyonun sentrozomu paternal kaynaklıdır ve fertilizasyon sırasında mikrotübül organizasyon merkezi olarak görev yapar. Aynı zamanda sper asterin oluşumunda ve dişi ve erkek pronükleilerinin birbirlerine doğru eş zamanlı hareketinden sorumludur. Tüm bu görevleri dolayısıyla oosit fertilizasyonu ve embriyo oluşumunda kritik role sahiptir.

Sperm sentriolleri Obasaju ve ark[77] tarafından kötü kalite embriyoların oluşumu ve implantasyon başarısızlıklarından sorumlu tutulmuşlardır. Kötü kalite spermatozoalarla yapılan çok sayıda IVF siklusları sonrası oluşan embriyolarda yapılan preimplantasyon genetik inceleme embriyoların çoğunda kaotik mozaizim göstermiştir. Bu embriyoların tranferi erken abortuslar ve birçok başarısız gebeliklerle sonuçlanmıştır. Takiben sağlıklı spermatozoa ile yapılan yeni bir siklus sadece normal embriyolar oluşturmamış aynı zamanda başarılı gebelikle sonuçlanmıştır. Kaotik mozaizm tanısı nedeniyle bu vakalarda kromozomal anomaliden ziyade anormal sentriol fonksiyonu etyolojide suçlanmıştır. Sperm hücresi sentriolünün fertilizasyondaki yeri üzerine yapılan bir başka çalışmada da[78] sadece sperm baş kısımlarıyla yapılan ICSI de embriyo morfolojisi değişmemekte ancak

bütün spermatozoalar ile yapılanlara göre fertilizasyon oranları düşmektedir.

Sperm hücrelerindeki genetik yahut kromozomal anomaliler ve bunarlın embriyo kalitesi üzerine etkileri bir çok yayında tartışılmıştır. Bazı yayınlarda kromozomal olarak anormal sperm hücrelerinin fertilizasyondaki muhtemel negatif etkileri olabileceği varsayılmıştır.

Stalf ve ark.[79] çalışmasında IVF embriyoları ile kıyaslandığında ICSI embriyolarının belirgin deecede düşük skora sahip olmalarını genetik veya kromozomal anormallikler tarafından oluşturulan androlojik faktörlere bağlı olduğunu düşünmüşlerdir. Bu aynı zamanda Aoki ve ark.[80]nın çalışmasında ICSI da taze embriyo kullanılmasının dondurulmuş testiküler spermatozoadan neden daha başarılı olduğunu açıklamada da öne sürülen bir açıklamadır. Yazarlar dondurulmuş spermatozoadaki düşük embriyo kalitesinin dondurma sırasında DNA da oluşan hasar nedeniyle ortaya çıktığını öne sürmektedirler. Vernaeve ve ark.[81] obstrüktife non-obstrüktif testiküler spermatozoaları kullanarak yapılan ICSI sonuçları arasında embriyo kalitesi açısından fark olmadığını saptamışlardır. Ancak non-obstrüktif grupta fertilizasyon ve implantasyon oranları daha yüksektir. Bu sonuç non-obstrüktif azospermideki artmış kromozomal anöploidi ile açıklanabilir.

Bir çok çalışmada genetik ve kromozomal sperm hücresi anomalileri araştırılmış ve bazı vakalarda düşük sperm kalitesi ile alakalı bulunmuştur. Van Golde ve ark.[82] Y kromozomunun azospermik faktör bölgesinde mikrodelesyon olan ve olmayan hastaları karşılaştırmışlardır. Mikrodelesyonlu grupta embriyo kalitesinde ve fertilizasyon hızında belirgin azalma saptamışlardır. Azalmış sperm kalite ve fonksiyonunun delesyon varlığına bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Gebelik sağlanması ve doğuma ulaşılması oranları her iki grupta farklı değildir ve kız bebekler mikrodelesyonlu gruptan doğmuştur.

Saleh ve ark.[83] anormal kromatin içerikli veya hasarlı DNA (DAN fagmantasyon indexi ile ifade edilir)'lı spermatozoanın artması ICSI ve IVF fertilizasyon oranları, gebelik oranları ve embriyo kalitesi ile negatif koreledir. Aynı çalışmada seminal ROP seviyeleri de fertilizasyon oranları ve embriyo kalitesi ile negatif koreledir. Bundan yola çıkarak yazarlar sperm nüklear DNA hasarının ROP'dan kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Viran-Klun ve ark. tarafından da benzer sonuçlar öne sürülmüştür. Spermatozoalar içindeki Single-stranded anormal DNA'yı göstermek için akridin turuncusu kullanmışlardır. ICSI hastalarında bu türden DNA hasarı olan spermatozoaların çoğalmasıyla ağır derecede fragmante ve gelişimi duraklamamış embriyoların oranı belirgin olarak artmaktadır. Fertilizasyon oranlarıda negatif yönde etkilenmesine karşın bu tür DNA hasrıyla gebelik oranları ve doğum oranları arasında bağlantı saptanamamıştır. Ağır derecede single-stranded DNA hasarlı grupta 2-6-hücre aşamasında duraklamış embriyoların sayılarındaki artış maternal den embriyonik genoma geçişle alakalı olarak düşünülmüştür. Bu DNA bozukluğu aynı zamanda artmış gebelik kaybının habercisidir ve bu grup hastadaki azalmış embriyo kalitesini açıklayabilir.

Tomsu ve ark[84] çalışması DNA hasarının açıklanamayan ve tekrarlayan düşük embriyo kalitesi ve başarısız gebelik denemeleri için açıklayıcı olduğunu öne sürmektedirler. Comet analizi yöntemi ile (bu analiz yönteminde yüksek ortalama baş bölgesi dansitesinin normal çift sarmal DNA ile iyi koreledir) iyi kalite embriyo elde edilen çiftler daha kötü kalite embriyo elde dilen çiftlerle kıyaslandıkları zaman iyi kalite embriyo grubunda ortalama baş bölgesi dansitesi diğer gruba göre belirgin derecede daha iydir (açıklanamayan subfertil grupta). Bu sonuç embriyo kalitesini düşüren gizli bir etken olduğunu düşündürmektedir.

Diğer yandan Benchaib ve ark.[85], Gandini ve ark.[86] ve Greco ve ark.[87] embriyo kalitesi ve sperm DNA anomalileri arasında bir bağlantı saptayamamışlardır.

Benchaib ve ark.[85] çalışmasında sperm DNA fragmantasyonun embriyo kalitesi (2 ve 3. günler) üzerinde etkisi olmadığını öne sürmektedirler. Hem ICSI hem de IVF deki fertilizasyon oranları DNA fragmantasyonundan etkilenmiştir fakat ICSI sonrası gebelik sağlanan hastalarda sperm DNA fragmantasyonu belirgin oranda azalmıştır. Yazarlara göre DNA fragmantasyonu sadece 6-8-hücre embriyo seviyesinde etkilidir. Bu özellikle sperm hücrelerinin doğal seleksiyona uğramadığı ICSI için geçerlidir. Gandini ve ark.[86] sperm kromatin yapısı analizi yöntemi ve DNA fragmantasyon indeksi kullanarak IVF ve ICSI hastaları üzerinde yaptıkları bir araştırmada gebe ve gebe olmayan grupta 2. günde hasarlı sperm DNA'sı ve ambryo kalitesi arasında bir ilişki saptayamamışlardır. Yazarlar DNA fragmantasyon indeksinin ICSI fertilizasyon oranlarında, embriyo kalitesinde ve gebelik sağlanmasında belirgin bir prediktiktif değeri olmadığı sonucuna varmışlardır.

Greco ve ark.[87] ICSI hastalarında sperm DNA fragmantasyonu, embriyo morfolojisi ve fertilizasyon arasında bağlantı saptamamışlardır. Bu çalışmada aynı hastalardan alınan testiküler ve ejakülat spermatozoaları DNA fragmantasyonu için analiz edip ICSI için birbirini takip eden sikluslarda kullanmışlardır. Aynı hastadan alınan testiküler spermatozoa da ejakülat spermatozoasına göre belirgin derecede az DNA fragmantasyonu olduğunu saptamışlardır. ICSI sonrası embriyo morfolojisi ve fertilizasyon oranları değişmese de testiküler spermatozoanın kullanımının gebelik oranlarını belirgin derecede artırdığını göstermişlerdir. Artmış ejakulat spermatozoası DNAsında hasar olan erkek hastalarda testisteki DNA hasarının çok daha az olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç aynı zamanda DNA hasarlı spermatozoaların oositleri fertilize edebileceğini ve iyi morfolojide embriyolar sağlayabileceği ancak bu embriyoların implantasyonda başarısız olabileceğini yada canlı bir gebeliğe dönüşemeyeceğini göstermiştir.

Multinükleasyon Van Royal ve ark.[56] paternal faktörün multinükleasyon üzerine etkisini önemsiz bulmuşlardır. Yazarla multinükleasyonun belli bazı stimulasyon protokolleri (kısa stimulasyon, yüksek follikül stimüle edici hormon dozu, fazla sayıda oosit toplanması) ile pozitif korelasyon gösterdiğini saptamışlar ve bundan dolayı oositin gelişimsel bozukluğuyla alakalı olabileceğini öne sürmüşlerdir[56].

Blastosist gelişimi Paternal faktörün blastosist gelişimindeki potansiyel rolü ilk olarak Janny ve Menezo[88] tarafından ortaya atılmıştır. İyi semen parametrelerinin iyi blastosist gelişimiyle bağlantılı olduğunu saptamışlardır.

Ardışık ortam tekniğinin gelişmesiyle birlikte blastosist kültürü ve transferi popüler hale gelmiştir. Sakkas ve ark.[89] muhtemel paternal etki nedeniyle oluşan anormal embriyoların non-invaziv eliminasyonu için bu yöntemin işe yarayabileceğini öne sürmüşlerdir. Banerjee ve ark.[90] fertilize oositten blastosist gelişiminin genellikle paternal genotipten bağımsız olduğu ve asıl olarak oositin makromoleküler ve enzimatik yeterliliğini gösterdiği için blastosist transferinin anormal kromozomların kalıtımını engellemeyeceğini öne sürmüşledir. Buna rağmen bazı durumlarda anormal paternal kromozomlar blastosistin normal gelişimini etkilebilmektedirler.

Shoukir ve ark.[91] sadece sperm motilitesinin blastosistle ilişkilendirilebileceğini öne sürmüşlerdir. Diğer semen parametreleri (morfoloji ve konsantrasyon) blastosist gelişmesini etkilemezler. Yazarlar, ICSI de IVF ye göre daha düşük blastosist gelişme oranı saptamışlardır. Bu sonucu ICSI grubundaki zayıf sperm parametrelerine dolayısıyla paternal faktörlere bağlamışlardır. Yazarlara göre sperm motilitesinin blastosist üzerindeki muhtemel etkisi sperm sentrizom defekti ile açıklanabilir. Zayıf motilitesi olan semen örnekleri genellikle artmış sentriolaer defektlerle birliktedir ve eğer bozuk sperm sentriolü oosite yerleşirse anormal gelişim oluşabilir. Bundan yola çıkarak zayıf blastosist gelişiminin mitotik iğsi evrenin bozukluğu motilite bozukluğu olan bir spermatozoa tarafından oosite sokulduktan sonra olmaktadır. Yazarlar, fertilizasyon yeteneğine sahip spermatozoa normal blastosist gelişimine katılamıyor olabilir sonucunu öne sürmüşlerdir.

Miller ve Smith[72] benzer sonuçlar rapor etmişlerdir. IVF ye kıyasla ICSI da embriyoların belirgin olarak daha fazla 5-8-hücre safhasında blastosiste doğru gelişimde bozukluk ve blastosist kalitesinde zayıflık saptamışlardır. Zayıf semen özelliklerinin (özellikle sperm morfolojisi ve motilitesi) de azalmış blastosist gelişimi ve kalitesi ile bağlantılı olduğunu saptamışlardır. 5-8-hücre safhasında duraksama paternal genomun aktivasyonuyla aynı zamana denk gelir ve paternal faktöre işaret eder. Yazarlar tüm bu yorumlarına ek olarak iyi sperm motilitesinin yeterli metabolik canlılık ve daha düşük oranda sentrioler bozukluğa işaret ettiğini söylemişledir.

Zorn ve ark.[92] tarafında ROP un 4. gün morulası ve blastosist formasyonu üzerine etkisini çalışmışlardır. ICSI hastalarında ROP seviyeleri ile blastosist gelişimi arasında negatif bağlantı saptanmış ancak bu gebelik oranlarını etkilememiştir.

Seli ve ark.[93] çalışmasında yüksek oranda nüklear DNA hasarlı spermatozoa IVF ve ICSI'deki blastosist gelişimi ile ters orantılıdır ancak gebelik oranları anlamlı derecede değişmemiştir. Yazarlar bu etkinin blastosist evresinde embriyojenik genomun aktive olmasına ve transkripsiyon aktivitesinin başlamasına ve bundan dolayı paternal genomun embriyo blastosist gelişimde önemli rolü olabileceği varsayımına dayandırmışlardır.

SONUÇLAR

Bu derleme birçok vakada paternal etkinin gelişimin değişik safhalarında paternal etkinin embriyo kalitesi üzerindeki etkisinin halen bilinmediğini vurgulamaktadır. Konu ile ilgili çalışmaların sonuçları birbirleriyle çelişmektedir. Bu analiz metodlarının farklılığından kaynaklanıyor olabilir ama bundan daha önemlisi embriyo kalitesi birçok faktör tarafından belirlenir ve spermatozoa muhtemelen bunlardan sadece birisidir.

Elde edilebilen literatüre dayanarak sperm hücresinin embriyonun kalitesi ve yardımcı üreme tekniklerinin sonucu üzerinde önemli etkisi olduğu açıktır.

Çalışmaların çoğunun embriyo seçme metodları üzerine olmasına rağmen özellikle erken dönemde sadece tek bir embriyonun transferinin birçok ülkede zorunluluk haline gelmesiyle, genetik olarak normal ve normal embriyo gelişimine ve implantasyonuna katkısı olacak spermatozoonun seçilmesi hala araştırma konusudur.

KAYNAKLAR

1. Boiso I. Fundamentals of human embriyonic growth in virro and the selection of high quality embriyos. Reprod Biomed Online 2002; 5: 328
2. Balaban B, Urman B. Embriyo culture as a diagnostic tool. Reprod Biomed Online 2003; 6: 671
3. Gerris J, et al. Prevention of twin pregnancy after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embriyo criteria: a prospective randomized trail. Hum Reprod 1999; 14: 2581
4. Van Royen E, et al. Characterization of a top quality embriyo, a step towards single-embriyo transfer. Hum Reprod 1999; 14: 2345
5. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. Hum Reprod 1999; 14: 1318
6. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuctear embriyo transfers the day following oocyte retrieval. Hum Reprod 1998; 13: 1003
7. Payne D, et al. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. Hum Reprod 1997; 12: 532
8. Edwards RG, Beard HK. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embriyos. Mol Hum Reprod 1997; 3: 863
9. Edwards RG, Beard HK. Blastocyst stage ttansfer: pitfalls and benefits. Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts? Hum Reprod 1999; 14: 1
10. Scott L, et al. The morphology of human pronuclear embriyos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod 2000; 15: 2394
11. Tesarik J, et al. Embriyos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple non-invasive examination of pronuclear morphology. Hum Reprod 2000; 15: 1396
12. Ludwig M, et al. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy races under the conditions of the German embriyo protection law. Hum Reprod 2000; 15:325
13. Salumets A, et al. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embriyo quality. Hum Reprod 2002; 16: 2177
14. Scott L. Pronuciear scoring as a predictor of embriyo development. Reprod Biomed Online 2003; 6: 201
15. Behr B. Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. Blastocyst culture and transfer. Hum Reptod 1999; 14:5
16. Shoukir Y, et al. Early cleavage of in vitro fertilized human embriyos to the 2-cell stage: a novel indicator

of embriyo quality and viability. Hum Reprod 1997; 12: 1531

17. Sakkas D, et al. Early cleavage of human embriyos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injecrion as an indicator of embriyo viability. Hum Reprod 1998; 13: 182
18. Sakkas D, et al. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embriyos at the 2-cell stage before transfer improves embriyo selection. Fertil Stenl 2001; 76: 1150
19. Bos-Mikich A, Mattos ALG, Ferrari AN. Early cleavage of human embriyos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. Hum Reprod 2001; 16: 2658
20. Lundin K, Bergh K. Hardarson T. Early embriyo cleavage is a strong indicator of embriyo quality in human IVF. Hum Reprod 2001; 16: 2652
21. Petersen CG, et al. Embriyo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI. J Assist Reprod Genet 2001; 18: 209
22. Fenwick J, et al. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embriyos in vitro. Hum Reprod 2002; 17:407
23. Isiklar A, et al. Early cleavage of human embriyos to the two-cell stage. A simple effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection. J Reprod Med 2002; 47: 540
24. Salumets A, et al. Early cleavage predicts the viability of human embriyos in elective single transfer procedures. Hum Reprod 2003; 18: 821
25. Tsai YC, et al. Clinical value of early cleavage embriyo. Int J Gynecol Obstet 2002; 76: 293
26. Wharf E, et al. Early embriyo development is an indicator of implantation potential. Reprod Biomed Online 2003; 8: 212
27. Ciray N, Ulug U, Bahceci M. Transfer of early-cleaved embriyos increases implantation rate in patients undergoing ovarian stimulation and ICSI-embriyo transfer. Reprod Biomed Online 2004; 8: 219
28. Van Montfoort APA, et al. Early cleavage is a valuable addition to existing embriyo selection parameters: a study using single embriyo transfers. Hum Reprod 2004; 19:2103
29. Windt M-L, et al. Comparative analysis of pregnancy rates after the transfer of early dividing embriyos versus slower dividing embriyos. Hum Reprod 2004; 19: 1155
30. Gardner DK, et al. A prospective randomised trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. Hum Reprod 1998; 13: 3434
31. Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. J Reprod Immunol 2002; 55: 85
32. Tsirigotis M. Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. Too soon to abandon current practice? Hum Reprod 1998; 13:3285
33. Jones GM, Trounson AO. Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. The benefit of extended culture. Hum Reprod 1999; 14: 1405
34. Sakkas D. Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnotmal paternal genome after ICSI. Hum Reprod 1999; 14: 4
35. Kolibianakis EM, Devroey P. Blastocyst culture: facts and fiction. Reprod Biomed Online 2002; 5: 285
36. Blake D, et al. Cleavage stage versus blastocyst stage transfer in assisted conception (Cochrane Review). In The Cochrane Library, Issue 2. Oxford: Update Software, 2003
37. De Placido G, et al. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embriyo morphology and growth rate. Hum Reprod 2001; 9:2402
38. Fisch JD, et al. The graduated embriyo score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage stage embriyos. Hum Reprod 2001; 9: 1970
39. Terriou P, et al. Embriyo score is a better predictor of ptegnancy than the number of transferred embriyos or female age. Fertil Steril 2001; 75: 525
40. Roudebush WE, et al. Embriyonic platelet-activating factor: an indicatot of embriyo viability. Hum Reprod 2002; 17: 1306
41. Noci I, et al. Embriyonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embriyos. Hum Reprod 2005; 20: 138
42. Sher G, et al. Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embriyos: a potentially valuable indicator of 'embriyo competency and IVF outcome. Reprod Biomed Online 2004; 9: 74
43. Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embriyo. Reprod Biomed Online 2005; 10: 370
44. Roudebush WE, Duralia DR, Butler WJ. Effect of platelet activating factor (PAF) on preimplantation mouse B6D2F1/J embriyo formation. Am J Reprod Immunol 1996; 35: 272
45. Roudebush WE, et al. Exposure of preimplantation embriyos to platelet activating factor increases birth rate. J Assist Reptod Genet 2004; 21: 297
46. Roudebush WE, et al. The significance of platelet-activating factor and fertility in the male primate: a review. J Med Primatol 2005; 24: 20
47. Balaban B, et al. The effect of pronuclear morphology on embriyo quality and blastocyst transfer outcome. Hum Reprod 2001; 16: 2357
48. Scott L. Embriyological *strategies* for overcoming recurrent assisted reproductive technology treatment failure. Hum Fertil (Camb) 2002; 5: 206

49. Demirel LC, et al. *The* impact of the source of spermatozoa used for ICSI on pronuclear morphology. Hum Reprod 2001; 16: 2327
50. Rossi-Ferragut LM, era!. Pronuclear and morphological features as a cumulative score to select embriyos in ICSI (inrracytoplasmic sperm injection) cycles according to sperm origin. J Assist Reprod Gener 2003; 20: 1
51. Tesarik J, Greco *E,* Mendoza C. Paternal effects during the first cell cycle of human preimplanration development after ICSI. Hum Reprod 2002; 17: 184
52. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embriyo development is related to sperm DNA fragmentation. Hum Reprod 2004; 19:611
53. Harper J, et al. Detection of fertilization in embriyos with accelerated cleavage by fluorescence in situ hybridization. Hum Reprod 1994; 9: 1733
54. Magli M, et al. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embriyos in poor-prognosis patients. *J* Assist Reprod Genet 1998; 15:297
55. Veeck *L.* Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991; 2
56. Van Royen E, et al. Multinucleation in cleavage stage embriyos. Hum Reprod 2003; IS: 1062
57. Harderson *T,* et al. Human embriyos with unevenly sized blasromeres have lower pregnancy and implantation rares: indications for aneuploidy and mulfinuclearion. Hum Reprod 2001; 16: 313
58. Racowsky C. Day 3 and day 5 morphological predictors of embriyo viability. Reprod Biomed Online 2003; 6: 323
59. Alikani M, et *al.* Human embriyo fragmentation in virro and its implications for pregnancy and implantation. Fertil Steril 1999; 71: 836
60. Balaban B, et al. Blastocyst quality affects the success of blastocyst srage embriyo transfer. Fertil Steril 2000; 74: 282
61. Rubio C, et al. Clinical experience employing coculture of human embriyos with autologous human endometrial epithelial cells. Hum Reprod 2000; 15: 31
62. Salumets A, et al. Influence of oocytes and spermatozoa on early embriyonic development. Fertil Steril 2002; 78: 10S2
63. Loutradis D, et al. Oocyte morphology correlates with embriyo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 72: 240
64. Tomlinson MJ. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after densiry gradient centrifugadon: implications for assisted conception. Hum Reprod 2001; 16: 2160
65. Strassburger D, et al. Very low sperm count affects the result of intracyroplasmic sperm injection. *J* Assist Reprod Genet 2000; 17: 431
66. Cohen J, et a). Partial zona dissection or subzona! sperm insertion: microsurgical fertilization alternatives based on evaluation of sperrn and embriyo morphology. Fertil Sreril 1991; 56: 696
67. Parinaud J, et al. Influence of sperm parameters on embriyo quality. Fertil Steril 1993; 60: 888
68. Grow D, Oehninger S. Strict criteria for the evaluation of human sperm morphologv and its impact on assisted reproduction. Andrologia 1995; 27: 325
69. Host E, et al. Sperm morphology and IVF: embriyo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria. Acta Obstet Gynecol Scand 1999; 78: 526
70. De Vos A, et al. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embriyo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2003; 79: 42
71. MoilanenJM, etal. Fertilization, embriyo quality, and cryosurvival in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. J Assist Reprod Genet 1999; 16: 17
72. Miller *JE,* Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocysr development in virro. Hum Reprod 2001; 16: 918
73. Sakkas D, et al. Use of egg-share model to investigate the paternal influence on fertilization and embriyo development after in vitro fertilization and incytoplasmic sperrn injection. Fertil Steril 2004; 82: 74
74. Virant-KIun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embriyos. J Assist Reprod Genet 2002; 19:319
75. Katsoff D, Check ML, Check JH. Evidence that sperm wi'ch low hypoosmotic swelling scores cause embriyo implantation defects. Arcb Androl 2000; 44: 227
76. Kattera S, Cben C. Short coincubation of gametes in in virro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study, Fertil Steril 2003; 80: 1017
77. Obasaju M, et al. Sperm quality may adversely affect the chromosome constitution of embriyos that result from intracytoplasmic sperm injection. 1'ertil Steril 1999; 72: 1113
78. Johnson JE, et al. Expectations for oocyte fertilization and embriyo cleavage after whole sperm versus sperm head intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2004; 82: 1412
79. Stalf T, et al. Different cumulative pregnancy rates in patients with repeated IVF- or ICSI cycles: possible influence of a male factor. Andrologia 1999; 31: 149
80. Aoki VW, et al. Improved in vitro fertilization embriyo quality and pregnancy rates with intracytoplasmic sperm injection of sperm from fresh testicular biopsy samples. Fertil Stetil 2004; 82: 1532

81. Vernaeve V, et al. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. Fertil Steril 2003; 79: 529
82. Van Gofde RJ, et al. Decreased fertilization rate and embriyo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome. Hum Reprod 2001; 16: 289
83. Saleh RA, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male infertility. Fertil Steril 2003; 79: 1597
84. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embriyo qualiry and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. Hum Reprod 2002; 17: 1856
85. Benchaib M, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003; 18: 1023
86. Gandini L, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. Hum Rcprod 2004; 19: 1409
87. Greco E, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2005; 20: 226
88. Janny L, Menezo YJR. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embriyo development and blastocyst formation. Mol Reprod Dev 1994; 38: 36
89. Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome. Hum Reprod 1999; 14: 4
90. Banerjee S, et al. Does blastocyst culture eliminate paternal chromosome defects and select good embriyos? Hum Reprod 2000; 15: 2455
91. Shoukir Y, et al. Blastocyst development from supernumerary embriyos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? Hum Reprod 1998; 13: 1632
92. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embriyo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Int J Androl 2003; 26: 279
93. Seli E, et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. Fernl Steril 2004; 82: 378

BÖLÜM 3

Erkek İnfertilitesinde Tedavi Alternatifleri

21

Erkek İnfertilitesinin Kliniği

Murat Arslan, Sergio Oehninger, Thinus F. Kruger

Çeviri: *Koray Erten*[*]

GİRİŞ

İnfertil çiftlerin yaklaşık olarak yüzde 40–50 oranında tek başına ya da kadın faktörü ile birlikte erkek subfertilitesi olduğu tahmin edilmektedir[1,2]. Yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesi ile birlikte erkek faktörüne bağlı infertilite olgularında ilerleme kaydedilmiştir. İntra stoplazmik enjeksiyonun (ICSI) bulunması ile erkek infertilitesine bağlı çocuğu olmayan olgularda doğum için başarı oranlarında dramatik bir artış olmuştur. Erkek bozukluklarının temellerinde genetiksel devrim niteliğinde gelişmeler olmuştur. Ancak ne yazık ki şu anda sperm fonksiyonel kapasiteleri ile ilgili gelişmeler konusunda sabit bir bekleme düzenine girilmiş bulunmaktadır.

Bu nedenle daha birkaç yıl öncesine kadar erkek infertilitesi nedenlerini araştırmak oldukça karmaşık ve zor bir süreç idi. Erkek infertilitesini değerlendirirken yapılması gereken rasyonel yaklaşım da aşağıdaki konular dikkatli bir biçimde değerlendirilmelidir. Hastanın hikâyesi, tam bir fizik muayene laboratuar testleri ve semen analizleri, ürolojik endokrinolojik ve genetik konsültasyonlar uygun olduğu şekillerde alınmalıdır.

Başlangıç için temel bir tanı amacı ile semen analizi mutlaka dünya sağlık örgütü (WHO) kriterlerine göre değerlendirilmelidir. Semen analizi ve verilmesi kaliteli ve akredite olmuş bir laboratuarda alınmalıdır[4]. İlk semen analizinde aşağıdakiler mutlaka bulunmalıdır. 1) fiziksel semen karakteristiklerinin değerlendirilmesi (hacim likefaksiyon görünüm, ph aglütinasyon, kıvam gibi) 2) sperm konsantrasyonunun değerlendirilmesi motilitenin derecelendirilmesi ve morfolojik karakteristiklerin analizi (kesin kriterler kullanılarak)[5]. 3) sperm canlılığının değerlendirilmesi (viabilite). Sperm oto antikorları açısından test (miks anti globülin testi kullanılarak ya da direkt immunobead test ile), lökospermi varlığı ve immatür sperm hücrelerinin varlığı; 4) bakteriyolojik çalışmalar. motil sperm fraksiyonunun ayrıştırılması ve separasyonu ilk semen değerlendirmesinin bir parçası olmalıdır[6–8].

Klinisyenler ve bilim adamları normal fertil nüfus olarak adlandırılan topluluk için normal sperm parametrelerini belirleme çalışmalarına devam etmektedirler. Bu, fertilite, subfertilite infertilite tanımlarını daha düzgün koyabilmek için gereklidir. Hem Amerikan hem de Avrupalı çalışmalarda bu vurgulanmaktadır[9–10]. Yeni yapılan bir yayında[11], Van der Merwe ve arkadaşları fertilite/subfertilite eşik değerlerini literatürü tekrar gözden geçirerek tekrar değerlendirmişlerdir. Sonuçlar fertilite ve sub fertilite için yeni ve düşük değerler göstermiştir. Bu cut off değerleri sperm konsantrasyonu <15 milyon/ml, progresif motilite <%30 ve <5% normal morfolojidir. Bu eşik değerler aynı zamanda in vitro fertilizasyon IVF ve intrauterin inseminasyon değerlerine de uygun olarak belirtilmiştir.

[*] GATA Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Merkezi, Bilkent, Ankara.

Subfertil erkeklerde multibl sayıda yapısal ve biyokimyasal sperm değişkenlikleri bulunmaktadır. Anatomik olarak bunlar şu şekilde sınıflanabilir: membran değişiklikleri (osmotik değişiklikleri verilen cevap ile test edilebilirler, fosfotidilserin translokasyonu ya da diğerleri), nükleer değişiklikler (anormal kromatin kondensasyonu, histonların retansiyonu ve DNA parçacıklarının bulunması), stoplazmik lezyonlar (reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarda üretilmesi, mitokondrial membran potansiyellerinin kaybı ve aşırı kreatin kinaz içeriği ya da aktif kaspasların varlığında sitoplamının retansiyonu) ve flagelllarda bozukluk olması (mikrotübüllerin bozulması ve fibröz kılıf). Bu değişimlerden bazıları immatürite, apopitozis fenotipinin varlığı, infeksiyon-nekroz ve diğer bilinmeyen nedenlerin işareti olabilir[14–24].

Sperm nükleer anormalliklerini değerlendirme konusunda son zamanlarda artış olmuştur. mevcut şartlarda kromatin /DNA defektlerini değerlendirmeye yönelik bir çok test bulunmaktadır bunlar anilin mavi boyama[25], akridin turuncu[26], sperm kromatin yapısı değerlendirme (SCSA)[27], ve anöplodi için floresan in situ hibridizasyon (FISH)dur[30.]

Ancak bu anormalliklerin sperm fonksiyonunu, kısmi gamet transportunu, fertilizasyonu ve embriyogeneze katkısını nasıl bozduğu net olarak anlaşılmamıştır. Bunun ötesinde bu testlerin çoğunluğu deneysel olarak kalacak ve klinik anlamda sonuçlarını valide etmek için birçok çalışmaya ihtiyaç gösterecektir.

Diğer taraftan in vitro olarak değerlendirebilecek ve geçerliliği olan doğruluğu kanıtlanmış başka çok özel ve kritik sperm fonksiyon kapasiteleri bulunmaktadır. Bunlar: motilite kapasitasyon oluşturma başarısı, zona pellusida bağlanması ve akrozom reaksiyondur. Bu özelliklerin değerlendirilmesi tipik olarak sperm fonksiyonel testleri olarak kabul edilir.

Genişletilmiş semen analizi bu esansiyel sperm fonksiyonlarını gösteren değerlendirmeleri içermelidir. Bunlar şu şekilde kategorize edilebilir: 1) defektif sperm fonksiyonunu indirekt olarak biyokimyasal olarak değerlendiren testler (örneğin reaktif oksijen türlerin oluşmasını ölçmek ya da peroksidatif hasarın varlığını belirlemek, enzim aktivitelerinin ölçülmesi örneğin kreatin fosfokinaz ve diğerleri) 2) gamet ile ilişkili biyo değerlendirmeler (örneğin heterolog zona free ham ster oosit testi ve homolog zona pellusida bağlanma testi) 3) bilgisayar yardımlı sperm hareket analizi, sperm hareket karakteristiklerini değerlendirmek üzere sayılabilir[3,31–41].

2906 denekli 34 basılmış çalışma irdelenerek prospektif kontrollü çalışmalar seçilmiş ve 4 sperm fonksiyonel ölçüm kategorilerinin IVF başarısı açısından prediktif değerleri çalışılmıştır (Bilgisayar yardımlı sperm hareket analizi, indüklenmiş akrozom reaksiyon testi, sperm penetrasyon testi, ya da SPA ve sperm zona pellusida bağlanma testi)[42].

Bu meta analiz sonuçları in vitro koşullar altında IVF başarısı açısından en önemli prediktif belirteçlerin sperm zona pellusida bağlanma ve akrozom reaksiyon testleri olduğunu göstermiştir[42]. Diğer taraftan fertilizasyon belirteci olarak SPA nın zayıf bir belirteç olduğu ve CASA sistemlerinin gerçek bir standardizasyon ve ileri çalışmalar ile fertilizasyon açısından değerlendirme ihtiyacında olduğunu göstermiştir. Her ne kadar bu çalışma objektif kanıta dayalı bir çalışma olsa da, analizde mevcut testlerin limitasyonlarına vurgu yapılmış ve mevcut metodolojilerin standardize edilmesi gerektiği vurgulanmış ve yeni teknolojilerin gelişmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Tipik olarak erkek infertilitesi temel olarak ilk veya sonraki semen analizi ile gelir. Sperm parametrelerindeki anormallikler izole ya da farklı parametrelerin bir kombinasyonu olarak ortaya çıkabilir. Oligozoospermia ve teratozoospermia en sık görülen izole defektlerdir ancak bundan daha sıklıkla değişik derecelerde oligoastenoteratozoospermia görülebilir (OAT)[43]. Bundan sonraki amacımızda tekli ya da çoklu sperm anormalliklerinin nedenlerin ve sonuçları ve tedavi şekillerinin ne olması gerektiği vurgulanacaktır.

İZOLE SPERM ANORMALLİKLERİ

Azalmış sperm konsantrasyonu (azo-oligozoospermi)

Azalmış sperm konsantrasyonu patolojik durumu orta derecede oligospermide (15 milyon sperm /ml)[11] azospermiye kadar değişen aralıktaki bozuklukları kapsar (ejekülatta sperm olmaması) basitleştirilmiş bir temelle klinik olarak bilinen etmen durumlar pretestiküler testiküler ve post testiküler nedenler olarak sınıflanabilir.

Oligosperminin pretestiküler nedenleri değerlendirildiğinde değişik düzeyde hipotalamo hipofizo testiküler aks üzerindeki değişikliklere bağlı olarak meydana gelir. Bu anormallikler konjenital olabilir (Kallmann sendromu) ya da kazanılmış olabilir (prolaktinoma ve diğer hipotalamo pituiter tümörler ve patolojiler) ve değerlendirme için FSH, LH ve testosteron ile birlikte serum prolaktin düzeyinin de bilinmesi ile ayırıcı tanının yapılabildiği durumu oluşturur. Diğer hipofiz hormonlarının değerlendirmesi de TSH growth hormon, kortisol) ve intra kranial görüntüleme metotları (CT MRI) hipogonadotropik hipogonadizm olgularında mutlaka gereklidir.

İdoyopatik hipogonadizm olan hastalarda 6–24 aylık tedavi ile gonodotropinlerle ya da pulsatil GNRH hormonları ile olabilir, sıklıkla sperm fonksiyonları fertiliteyi sağlayacak düzeyde gelişme gösterecektir[44,45]. Prolaktinoma olan hastalarda antidopaminerjik ilaçlara çok çabuk cevap verir[46]. Prolaktinomalı hastalarda etkileyici klinik sonuçları nedeni ile bu ilaçlar aynı zamanda idiyopatik oligoastenozoospermi olgularında sperm parametrelerini geliştirmek amacı ile kullanılmaktadır. Ancak, her ne kadar bu ilaçlar serum prolaktin düzeylerin normalin altına düşürse de bir meta analiz sonucunda sperm parametrelerini değiştirmediği ve fertiliteye etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır[47].

Post testiküler etyolojiler genital traktüsün herhangi bir yerinde tıkanıklığa bağlı olarak değişik düzeylerde sperm çıkışı azalmasına neden olurlar (inflamatuar enfeksiyöz, konjenital ya da iyatrojenik vazektomi gibi) ve diğer ejekülasyon bozuklukları-dır (örneğin retrograd ejekülasyon). Retrograd ejekülasyon durumundan şüphelenmek için düşük semen volümü olmalıdır ve bu durum konjenital ya da kazanılmış olabilir (Prostat ya da mesane boynu cerrahisi diyabet, inguinal lenf nodu eksizyonu, ya da idoyopatik olarak)[48].

Testiküler nedenler germ hücrelerinin sayısındaki herhangi bir sebeple azalmaya bağlı olarak hipospermatogenez nedeni ile oluşmaktadır, (Örneğin inkomplet ya da komple maturasyon arresti[50,52] ve germinal hücre aplazisi)[52,53]. Bu antiteler spermatogenezdeki ya da mitoz esnasındaki aberran apoptotik süreçlerle karakterizedir. Bu patolojilerden bazıları viral enfeksiyonların, iyatrojenik ajanların (kemo ve radyoterapi tedavisi) ve varikoselin bir sonucu olarak oluşabilir, bunun yanında genetik kromozomal çevresel faktörlerdeki değişimlere bağlı sekonder olarak da oluşabilir[15.54.55]. Ancak bunlara rağmen bizim klinik pratik deki tecrübelerimize göre neredeyse tüm oligozoospermia olgularında orta derecede ya da şiddetli düzeyde asteno ve teratozoopermi ile birliktelik gösterir.

Azalmış sperm motilitesi (astenozoospermi)

Astenozoospermi progresif motilitenin yüzde 30'dan az olması olarak tanımlanır[11]. İyatrojenik yapısal fonksiyonel ya da çevresel nedenlere bağlı olarak oluşabilir. İzole astenozoospermi nedenleri şöyle sıralanabilir; iyatrojenik nedenler örneğin semen örnekleminin yetersiz elde edilişi, anti sperm antikorlar, infeksiyonlar, parsiyel aksonemal defektler, sperm kuyruk fibröz kılıf defektleri, orta bölümde az mitokondri olması ya da olmaması, sperm sentriole disfonksiyonu, karboksimetil transferaz enzim eksikliği ve epididimal patolojiler örneğin inflamasyon ve infeksiyon [56-62].

Otozomal resesif geçişli immotil silya sendromu[63] ve sperm mitokondrial DNA mutasyonları[64–67] izole sperm motilite bozukluğunun iki gen ile ilişkili nedeni olarak belirlenmiştir. Yakın zamanda Bacetti ve arkadaşları ciddi izole astenozoospermisi olan ve kuyrukta fibröz kılıfın olmadığı tüm sperm popülasyonunda bu durumun olduğu ve temelde genetik nedeni düşündüren bir hasta tanımlamışlardır.

Gösterilmiş astenozoospermisi olan hastalarda herhangi bir yanlışlığa mahal vermemek üzere tanı koyma aşamasında mutlaka tekrarlayan sperm analizleri yapılmalıdır. Tekrarlanan semen ve idrar tetkikleri yapılmalıdır. Sperm kuyruğunun yapısal analizi ile immotil silia sendromu tanısı elektron mikroskobu altında incelenme sonrasında ortaya konabilir.

İzole astenozoospermi hastalarında in vitro motilite güçlendiricili denenmiştir. Bu ajanlar pentoksifilin 2-deoksiadenozin, kallikrein, platelet aktive edici faktör, bazı antioksidanlar olarak sıralanabilir [69,70]. Her ne kadar bu ajanlar ile belirli bir seviyeye kadar gelişme rapor edilmiş ise de bunlardan hiçbirisi rutin klinik kullanıma girememiştir.

Azalmış normal morfoloji (teratozoospermi)

Yayınlanmış birçok raporda sperm morfolojisin fertilizasyon da çok önemli olduğu vurgulanmıştır[5.12.71–76]. Ancak normal tanımı ile ilgili olarak bir birlik yoktur. Kruger ve arkadaşları tarafından belirtilen kesin kriterlerden sonra[5] IVF sonucunu belirlemede sperm morfolojisi en önemli ölçüt haline gelmiştir[72,79]. Daha sonraları birçok çalışmalar tarafından örneğin zona pellusida bağlanma testi ve zona free hamster oosit penetrasyon testi[34,80–83] gibi sperm morfolojisi ve sperm fonksiyonları arasındaki ilişkiyi gösteren iyi korelasyonlar tanımlanmıştır. Kötü morfoloji aynı zamanda anormal akrozom reaksiyonu ve anormal sperm kalsiyum akışı ile ilişkilidir[87]. Bunun prognostik değeri yine IUI siklusları boyunca da gösterilmiştir[3,88–90].

Diğer taraftan, teratozooperminin patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır sayısal ve yapısal kromozomal defektler patogenezde suçlanmıştır. Spermatazoa'ların FISH tekniği ile mayoz boyunca normal insan da kullanmaları sonrasında yüksek düzeylerde disomi, trizomi ve tetrazomiler özellikle kromozom 1, kromozom 7, kromozom 8, kromozom 13, kromozom 18, kromozom 21 ve seks kromozomlarında gösterilmiştir[91–96]. Önemli bir vurgulanması gereken nokta da bu kombine sperm defektleri (OAT) ve infertilitesi olan popülasyonların çoğunluğunda görülmektedir. Bu çalışmanın otörlerine göre spermi etkileyen faktörler, gametogenezis boyunca spermatozaanın genetik yapısına kadar uzanım göstermektedir. Tam tersine diğer bazı otörlere göre ise sperm kromozomal anormalliği ile fertilite arasında bir ilişki bulunmamaktadır[97–99].

Harkonen ve arkadaşları[92] izole teratozoospermi üzerinde durarak normal morfolojinin yüzde 10 dan az olduğu durumlarda yüksek frekansta disomi 7, 18, YY ve XY ve diploidi olduğunu vurgulamışlardır. Calegore ve arkadaşları OAT ve izole teratozoospermisi olan olgularda yüksek insidansta disomi 8, 18, X ve Y bildirmişlerdir. Bu otörlere göre teratozoospermia anöploidi ile ilişkili olan önemli bir sperm kriteridir. Aynı zamanda OAT'li hastalarda sperm anöploidi oranlarında artış, özellikle de genişlemiş başı olan spermatazoa yüzdesinin artmış olduğu durumlarda, görüldüğünü belirtmişlerdir[100].

Diğer taraftan Gole ve arkadaşları teratozoospermialı hastalar ile karşılaştırıldığında OAT'li hastalarda daha yüksek oranlarda seks kromozomal diploidisi görülmektedir. Yakın zamanda, Burello ve arkadaşları OAT'li hastalardan elde ettikleri spermle de normal insanlardan alınan sperm örnekleri karşılaştırıldığı zaman, anormal baş şekli olan spermatazoalarda yüksek oranlarda anöploidi belirlemişlerdir. Bunların sonucuna göre OAT'li hastalarda normal morfoloji olması ICSI için seçilmiş spermler için anöploidi olmadığını göstermemektedir. Bu sonuçlar direk izole teratozoospermi ile sperm kromozomal anormalliği arasındaki direkt bağlantıyı zayıflatan bir bulgudur. Ancak literatürde, infertil erkek ve veya kötü sperm parametresi olan erkeklerde spermatazoalarında yüksek oranda anöploidi varlığı olur şeklinde bir konsensüsü bulunmaktadır. Bu nedenle farklı kromozomal aberasyonların farklı sperm parametre ve fonksiyonları üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere dahi ileri boyutlarda çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Yine literatürdeki bazı çalışmalarda çok özel genlerin de regülâsyonunun morfolojik anormallikler ile ilişkisi olabileceği belirtilmiştir. Bir fare modelinde azh mutasyonlarının (kafa şeklinde olan anormallikler) kromozom 4 üzerinde meydana gelen yapısal anormalliklerden kaynaklandığı belirtilmiştir[103–104]. Adham ve arkadaşları ise farelerde Tnp2 gen bozukluğu içerdiğinde, spermatazoanın nükleer gelişiminde rol alır, sperm baş anormallikleri olduğunu göstermişlerdir. Xu ve arkadaşları yine spermatogenesisi de düzenleyici bir protein eksikliğinde (protein kazein kinaz alfa, csnk2a), csnk2a gen bozukluğuna bağlı olarak infertil olduğu ve globozoospermi olduğu (akrozomu olmayan sperm) bildirmişlerdir. Ek olarak azı sitoskleteal proteinlerin değişmiş ekspresyon ve düzenlemesi (kalisin, protein 4,1) spermiyogenezle ilgili morfolojik anormallikler ile birliktelik göstermektedir[107–108]. Yakın zamanda Milatiner ve arkadaşları infertil erkeklerde teratozoospermisin şiddeti ile androjen reseptör geni yapısındaki değişiklikler arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir[109].

KOMBİNE SPERM ANORMALLİKLERİ: OLİGOASTENOTERATOZOOSPERMİ

Yukarıda değinildiği üzere OAT en tipik klinik erkek infertilitesi tipidir. Bu tipik olarak anormal testiküler spermiyogenezin bir yansımasıdır ancak post testiküler nedenlere de bağlı olarak görülebilir. Ancak neredeyse vakaların yarısı hâlihazırda idiyopatiktir.

OAT'ye neden olan spermiyogenezislerle ilgili birçok sayıda defekt bulunmaktadır. Bunlar: germ hücre anormallikleri, (deplesyon, anormal apoptozis, defektif diferensiyasyon), mitoz ve mayoz anormallikleri ve spermiyogenez ve sperm yapma değişiklikleridir. Aberran apoptozisin çoğunlukla primer spermatasit ve spematid düzeylerinde ve aynı zaman da sertoli hücrelerinde olduğu gözlenmiştir[117]. Herhangi bir evre de arresti ve niceleyici anormal spermatogenez oligozoospermi ile sonuçlanır. Mayoz değişiklikleri ve spermiyogenez defektleri muhtemelen teratozoospermia ile ilişkili olarak bulunmuştur.

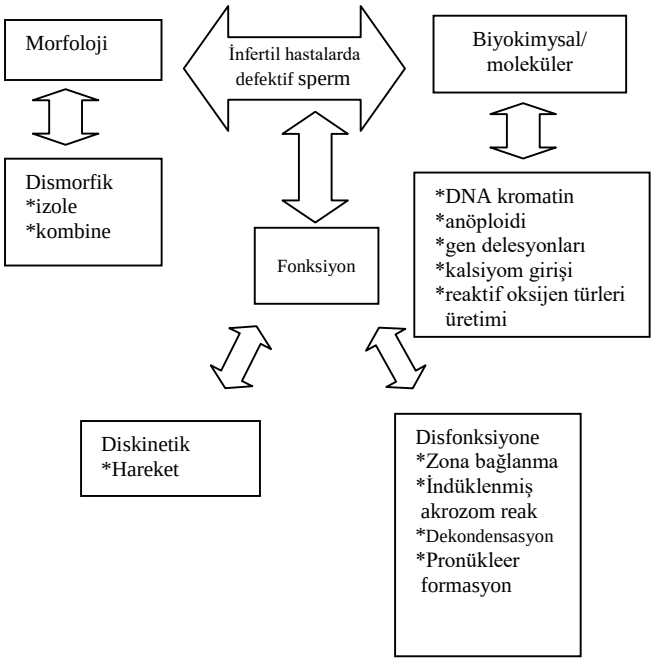
Sperm immatürite konsepti kabul görmüştür. Sitoplazma retansiyonu (organellerin metabolizmaya katılan enzimlerin, artmış apoptozis ve diğer fonksiyonlar) muhtemelen anormal sertoli hücresi-geç spermatid ilişkisinin dismorfik diskinetik disfonksiyonel spermatazoa salınımına neden olmasının bir sonucudur (şekil 21.1)[15–23.118.119]. Seminifer tübüllerden anormal spermatazoa salınması muhtemelen bazı vakalarda bulunmaktadır. Epididimal disfonksiyonlar ve patolojiler yine sperm zarını etkileyerek yapısını etkileyerek, morfolojik ve disfonksiyonel değişimler oluşmasına neden olabilirler[120].

KLİNİK YAKLAŞIM

Tedavi planı tamamı ile inceleme sonrasında erkek ve kadın faktörü değerlendirilerek yapılmalıdır (şekil 21.2). Pür erkek infertilitesi durumunda, bilinen kadın faktörü yokluğunda, tedavi; 1: medikal (endokrin örneğin hipogonadizm ve hiperprolaktinoma da olduğu gibi) 2: ürolojik; cerrahi veya cerrahi dışı tedaviler, örneğin mikrocerrahi laparoskopik veya konvansiyonel tedaviler varikoselin düzeltilmesi, epididimo vasovasostomi gibi ameliyatlar ile ejekülasyon bozukluklarına modern yaklaşımlar olabilir. 3: düşük ya da yüksek karmaşıklık da yardımcı üreme teknikleri (ART). Erkek sub fertilitesinin derecesi ve kadındaki bazı prognostik faktörler (örneğin yaş, infertilite süresi, endometriozis varlığı, diğer patolojilerin varlığı) ART endikasyonu koymada hızlandırıcı faktörler olabilir.

Bizim görüşümüze göre, mevcut durumda, idyopatik OAT'si olan ve normogonodotropik seviyedeki subfertil erkeklerde deneye dayalı tedavinin yeri bulunmamaktadır. Kesin medikal endikasyon yokluğunda, gonadotropinlerin anti östrojenlerin, antioksidanların, multi vitaminlerin veya diğer ispatlanmamış tedavilerin kanıta dayalı tıp bağlamında kullanımını destekleyecek veri bulunmamaktadır.

Mevcut tavsiye edilen ART seçenekleri, düşük karmaşıklıkta olan, IUI tedavisi, standart IVF ve embriyo transferi, ICSI ile desteklenen IVF gibi, tedavilerdir. Eğer kadın partner 35 yaş altında ise basit bir düşük kompliksitede ART örneği olarak hiperstimüle edilmiş overlerle birlikte 4-6 siklüs IUI eğer sperm sayısı motil sperm miktarı 1 milyondan fazla olduğu durumda uygun tedavi alternatifidir.



Şekil 21.1: *Subfertil erkeklerde anormal spermatazoa. Azalış sperm çıkımı, dismorfik sperm diskinetik sperm sperm disfonksiyonlarını ve moleküler hücresel lezyonları içeren anomalilerin ayrımı.*

İlk veriler değerli zamanın kaybedilmemesi ve etkinliği arttırmak amacı ile, IUI eğer total motil elde edilen fraksiyon az olduğunda uygulanmamalıdır, eğer hemi zona indeksi yüzde 31 düşükse, eğer kalsiyum ionofor ile indüklenmiş akrozom reaksiyon yüzde 22'den az ise, zona pellusida ile indüklenmiş akrozom reaksiyonu yüzde 16'dan az ise, ve veya DNA fragmentasyonu içeren sperm oranı yüz-

de 12'den fazla ise uygun bir tedavi alternatifi değildir.

Swim up sonrası ya da santrifüj sonrası motil sperm fraksiyonu 5 milyon dan az olan hastalara, ancak orta ya da hafif teratozoospermia varlığında (yüzde 4-14 normal form durumunda) standart IVF terapisi önerilebilir. Bu vakalarda sperm inseminasyon konsantrasyonları ile iyi fertilizasyon ve gebelik oranları sağlanabilir[125,126]. Ancak bu günlerde düşük ya da başarısız IVF girişme ihtimalini azaltmak için sperm morfolojisi yüzde 14'den fazla olduğu durumlar için IVF ile birlikte ICSI önerilebilir.

Bizim programlarımızda ICSI için seçilecek hastalar aşağıdaki kriterler göre belirlenmektedir[7,127].

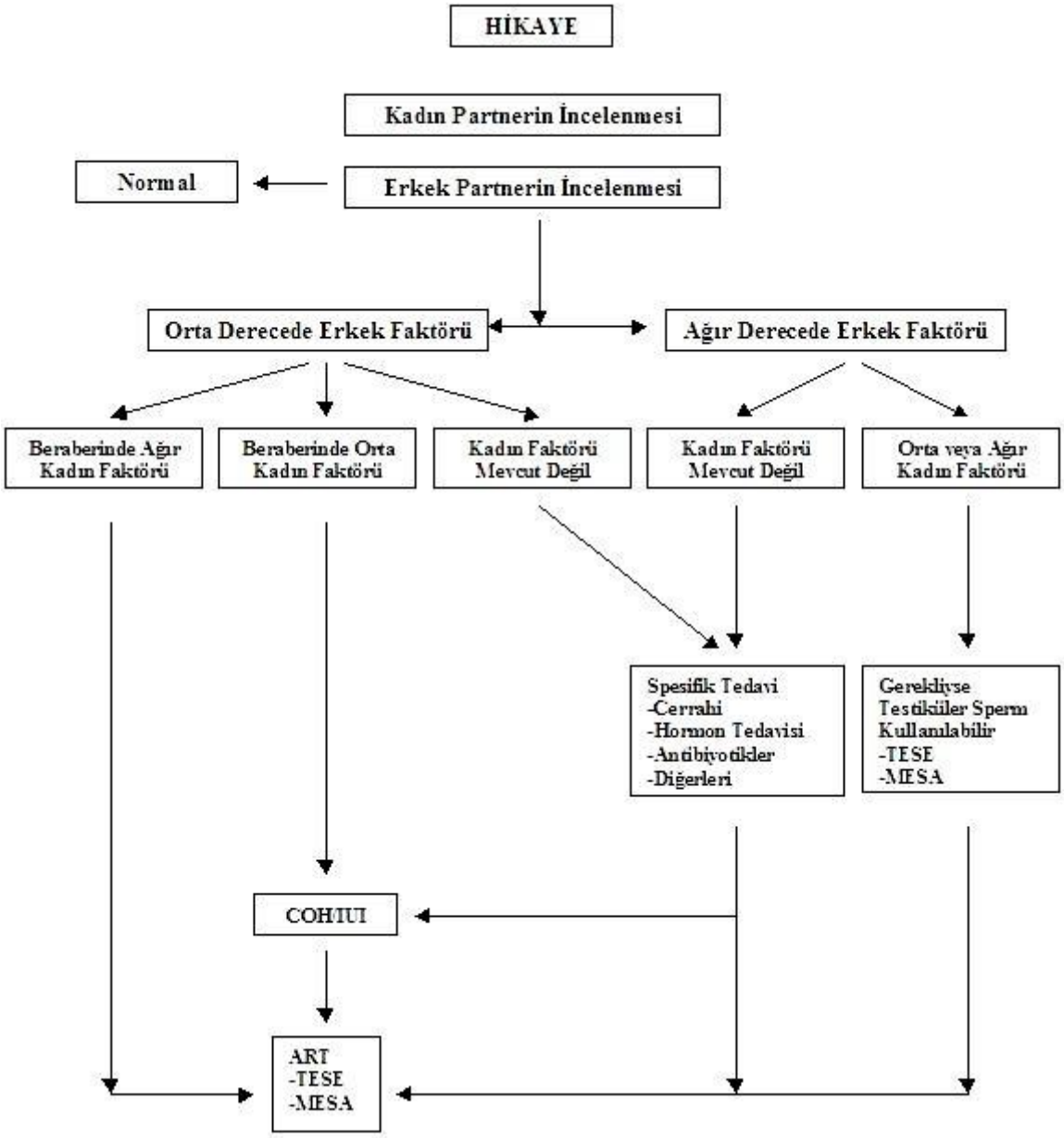
- Kötü sperm parametresi (5 milyondan az sperm, separasyonu sonrası yeterli progresif motilitesi olan ve veya sınırda ya da düşük total motil bölüntü varlığında normal formların yüzde 4'den az olduğu ciddi teratozoospermia olgularında,
- Kötü fonksiyonel yetenekler, defektif sperm zona pellusida bağlanma kapasitesi ve hemi zona indeksinin yüzde 30'dan az olması ve veya yüzde 16'dan az, düşük zona pellusida induced akrozom reaksiyonu ya da ZIAR,
- IVF'de önceden oluşmuş başarısızlık;
- Orta düzeyde anormal sperm parametreleri ile gelen (separesyon sonrası yeterli progresif motiliteye sahip 5-10 milyon toplam spermatozoa sayısı olan ya da morfolojisi yüzde 5-14 aralığında olan, aynı şekilde antisperm antikorlarını içermesi,
- Obstrüktif ya da non obstrüktif azospermi varlığı, ICSI'nin testislerden ya da epididimden elde edilerek kombine edildiği durumlar,
- Ciddi oligoastenoteratozoospermi varlığında ya da sperm fonksiyonellik testleri sonuçları fertilizasyon kapasitesini azalttığını düşündüren olgularda, çiftler direk olarak ICSI'ye yönlendirilmelidir. Bu yaklaşım muhtemel daha cost efektif olacak ve değerli zamanın kaybedilmesine engel olacaktır. Özellikle de yaşı 3'den fazla olan kadınlarda.

Mevcut veriler ışığında ICSI endikasyonu erkek faktörlü infertilite durumu söz konusu olduğunda bu geniş kapsamlı araştırmadan sonra karar verilmesi gereken bir durumdur. Yayınlanmış prospektif randomize çalışmalarda açıklanamayan infertilite ya da erkek faktörü olmayan infertilite olgularında ICSI faydalı bir metot değildir. Ayrıca tüm veriler in vitro konsepsiyon olgularının tümünde ICSI kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Özetle saf faydacı temelde tüm vakalarda ICSI uygulaması kanıta dayalı tıp bağlamında kesinlikle uygulanmamalıdır.

Greco ve arkadaşları yakın zamanda testiküler spermatazoa ile birlikte ICSI, ejekülattaki sperminde yüksek oranda DNA hasarı içeren olgularda ilk basamak yardımcı üreme tekniği fırsatı sunmaktadır. Ancak DNA hasarını belirlemek üzere daha ileri çalışmalara ve metotlara ihtiyaç bulunmaktadır.

Sperm kriyoprezervasyonu erkek infertilitesinde umut vaat eden bir teknik haline gelmiştir. Mevcut endikasyonlar şunlardır: 1) donor semeni ile artifisyel inseminasyon programlarında isteğe bağlı kullanma, 2) hastanın tercihi, 3) radikal cerrahi kemo ya da radyoterapi öncesindeki tüm neoplazi durumlarında reprodüktif özelliğini saklamak için, 4) vazektomi Reversal ameliyatı ya da vazoepididimostomi ameliyatına giden hastalarda ileride IUI ya da ICSI için sperm depolama yetisine sahipse, tedaviye yardımcı olmak maksadı ile ve 5) ICSI'nin çok iyi başarı sonuçlarından dolayı değişik derecelerde oligoasteno-teratozoospermia'sı olan infertil erkeklerde ileride kullanmak üzere kryoprezerve spermatazoa ile yardımcı üreme tekniği ile fertilizasyon için kullanması önerilebilir. Bugün bu sadece ejekülat için geçerli değil aynı zamanda testiküler ya da epididimal elde edilen sperm örnekleri için de geçerlidir[139–140].

İlginç ve umut vaat eden erkek infertilitesi gelecek tedavileri içinde germ hücre transplantasyonları ve in vitro spermatogenez bulunmaktadır[141–143]. Spermatogonial kök hücrelerdeki ileri incelemeler ve germ hücre organ aktarımı teknikleri, in vitro spermatogenezis için[145] kültür sistemlerin optimizasyonuna ek olarak, azospermili hastalara yeni tedavi seçenekleri verebilir.



Şekil 21.2: *Subfertil erkeğin klinik değerlendirilmesi için algoritm. COH: Kontrollü ovaryal hiperstimülasyon, IUI: Intrauterin inseminasyon, ART, Yardımlı üreme teknikleri, IVF: In vitro fertilizasyon, ICSI: Intrastoplazmik sperm injeksiyonu, TESE: Testiküler sperm elde ekstraksiyonu, MESA: Mikrocerrahi ile epididimal sperm aspirasyonu*

KAYNAKLAR

1. Irvine DS. Declining sperm quality: a review of facts and hypotheses. Baillieres Clin Obstet Gynaecol 1997; 11:655
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2000 Assisted Reproductive Technology Success Rates. National Summary and Fertility Clinic Reports. Atlanta: CDC, US Department of Health and Human Services, 2002
3. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999: 4
4. De Jonge C. Commentary: forging a partnership between total quality management and the andrology laboratory. J Androl 2000; 21: 203
5. Kruger TF, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118
6. Oehninger S. An update on the laboratory assessment of male fertility. Hum Reprod 1995; 10 (Suppl 1): 38
7. Oehninger S. Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status. J Androl2000;21:8l4
8. Mortimer D. Sperm preparation methods. J Androl 2000; 21: 357
9. Ombelet W, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in die interpretation of semen testing. Hum Reprod 1997; 12:987
10. Zinaman MJ, et al. Semen quality and human fertility: a prospective study with healrhy couples. J Androl 2000; 21: 145
11. van der Merwe FH, et al. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. Gynecol Obstet Invest 2005; 59: 86
12. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. Hum Reprod 1998; 4: 73
13. Van Waart J, et al. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (ILJi): a structured literature review. Hum Reprod 2001; 7: 495
14. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). J Submicrosc Cytol Pathol 1996; 28: 587
15. Baccetti B, et al. Recent advances in human sperm pathology. Contraception 2002; 65: 283
16. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane trans-location of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15: 1338
17. Ergur AR, et al, Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization {IVF} or intracyto-plasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. Fertil Steril 2002; 77: 910
18. Marchetti C, et al. Study of mkochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. Hum Reprod 2002; 17: 1257
19. Weng SL, et al. Caspase activity and apoptouc markers in ejaculated human sperm. Mol Hum Reprod 2002; 8: 984
20. Oehninger S, et al. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. Reprod Biomed Online 2003; 7; 469
21. Taylor SL, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. Mol Hum Reprod 2004; 10:825
22. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. Reprod Fertil Dev 2004; 16: 581
23. Huszar G, et al. Semen characteristics after overnight shipping: preservation of sperm concentrations, HspA2 ratios, CK activity, cytoplasmic retention, chromatin maturity, DNA integrity, and sperm shape. J Androl 2004; 25: 593
24. Cayli S, et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bel-XL levels in mature and diminished maturity sperm. Mol Hum Reprod 2004; 10: 365
25. Hoffmann N, Hilschcr B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. Hum Reprod 1991; 6: 979
26. Tejada RI, et al. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril 1984; 42: 87
27. Evenson DP, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14: 1039
28. Aitken RJ, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998; 59: 1037
29. Sakkas D, et at. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev Reprod 1999; 4: 31
30. Pfeffer J, et al. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 72: 472
31. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, Biol Reprod 1976; 15: 471
32. Cross ML, Lamberc H, Samuels S. Sperm binding activity of the zona pellucida of immature mouse oocytes, Cell Biol Im Rep 1986; 10: 545
33. Burkman LJ, et al. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. Fertil Steril 1988; 49: 688

34. Liu DY, et al. A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. Fertil Steril 1988; 50: 782
21. Taylor SL, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. Mol Hum Reprod 2004; 10:825
22. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. Reprod Fertil Dev 2004; 16: 581
23. Huszar G, et al. Semen characteristics after overnight shipping: preservation of sperm concentrations, HspA2 ratios, CK activity, cytoplasmic retention, chromatin maturity, DNA integrity, and sperm shape. J Androl 2004; 25: 593
24. Cayli S, et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bel-XL levels in mature and diminished maturity sperm. Mol Hum Reprod 2004; 10: 365
25. Hoffmann N, Hilschcr B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. Hum Reprod 1991; 6: 979
26. Tejada RI, et al. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril 1984; 42: 87
27. Evenson DP, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14: 1039
28. Aitken RJ, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998; 59: 1037
29. Sakkas D, et at. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev Reprod 1999; 4: 31
30. Pfeffer J, et al. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 72: 472
31. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, Biol Reprod 1976; 15: 471
32. Cross ML, Lamberc H, Samuels S. Sperm binding activity of the zona pellucida of immature mouse oocytes, Cell Biol Im Rep 1986; 10: 545
33. Burkman LJ, et al. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. Fertil Steril 1988; 49: 688
34. Liu DY, et al. A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. Fertil Steril 1988; 50: 782
35. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Reprod 1989; 41: 183
36. Aitken RJ, et al. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligo-zoospermia. J Androl 1989; 10: 214
37. Aitken RJ, Irvine DS, Wu PC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 542
38. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1992; 23
39. Huszar G, Vigue L, Morshedi M. Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. Fertil Steril 1992; 57: 882
40. Huszar G, Vigue L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. J Androl 1994; 15:71
41. ESHRE Andrology Special Interest Group. Consensus Workshop on Advanced Diagnostic Andrology Techniques. Hum Reprod 1996; 11: 1463
42. Oehninger S, et al. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVP therapy: a meta-anaiysis. Hum Reprod Update 2000; 6: 160
43. Oehninger S. Pathophysiology of oligoasthenoteratozoospermia: are we improving in the diagnosis? Reprod Biomed Online 2003; 7: 433
44. Burris AS, et al. A low sperm concentration does not preclude fertility in men with isolated hypogonadotropic hypogonadJsm after gonadotropin therapy. Fertil Steril 1988; 50: 343
45. Burgues S, Calderon MD. Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotrophic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotropic Hypogonadism. Hum Reprod 1997; 12: 980
46. De Rosa M, et al. Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment. Endocrine 2003; 20: 75
47. Vandekerckhove P, et al. Bromocriptine for idiopathic oligo/asthenospermia. Cochrane Database Syst Rev 2000; (2): CD000152
48. Yavetz H, et al. Retrograde ejaculation. Hum Reprod 1994;9:381
49. Wong TW, Straus FH, Warner NE. Testicular biopsy in the study of male infertility. Arch Pathol 1973; 95: 151
50. Aumuller G, Fuhrmann W, Krause W. Spermatogenctic arrest with inhibition of acrosome and sperm tail development. Andrologia 1987; 19: 9
51. dc Rooij DG, de Boer P. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. Cytogenet Genome Res 2003; 103: 267

52. Levin HS. Testicular biopsy in the study of male infertility: its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. Hum Parhol 1979; 10: 569
53. Nakamoto T, et al. Impaired spermatogenesis and male fertility defects in CIZ/Nmp4-disrupted mice. Genes Cells 2004; 9: 575
54. De Kretser DM, et al. Expanding our understanding of spermatogenesis: the future genetic tests for infertility. Int J Androl 2000; 23 (Suppl 2): 30
55. Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon -not waving but drowning. Adv Exp Med Biol 2003; 518:85
56. Marchini M, et al. Etiology of severe asthenozoospermia and fertility prognosis. A screening of 5216 semen analyses. Andrologia 1991; 23: 115
57. Courtade M, et al. Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. Fertil Steril 1998; 70: 297
58. Gopalkrishnan K, et al. Severe asthenozoospermia: a structural and functional study. Int J Androl 1995; 18 (Suppl 1):67
59. Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. Hum Reprod 1995; 10: 116
60. Nagy ZP. Sperm centriole disfunction and sperm immotility. Mol Cell Endocrinol 2000; 166: 59
61. Gagnon C, et al. Deficiency of protein-carboxyl methylase in immotile spermatozoa of infertile men. N Engl J Med 1982; 306: 821
62. Kao SH, et al. Sperm mitochondrial DNA depletion in men with asthenospermia. Fertil Steril 2004; 82:66
63. Afzelius BA, Camner P, Mossberg B. Acquired ciliary defects compared to those seen in the immotile-cilia syndrome. Eur J Respir Dis Suppl 1983; 127: 5
64. Kao S, Chao HT, Wei YH. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp delerion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. Biol Reprod 1995; 52: 729
65. Kao SH, Chao HT, Wei YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. Moi Hum Reprod 1998; 4: 657
66. Ruiz-Pesini E, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. Am J Hum Genet 2000; 67: 682
67. Rovio AT, et a!. Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. Nat Genet 2001; 29: 261
68. Baccetti B, et al. An ultrastructural and immunocytochemical study of a rare genetic sperm tail defect that causes infertility in humans. Fertil Steril 2004; 82: 463
69. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1: 108
70. Morshedi M, et al. Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study. Fertii Steril 2003; 79 (Suppl 3): 1625
71. KrugerTF, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 112
72. Menkveld R, et a!. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 5: 586
73. Ombelet W, et al. Teratozoospermia and in-viiro fertilization: a randomized prospective study. Hum Reprod 1994; 9: 1479
74. Grow DR, et al. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. Fertil Steril 1994; 62: 559
75. Oehninger S, KrugerT. The diagnosis of male infertility by semen quality. Clinical significance of sperm morphology assessment. Hum Reprod 1995; 10: 1037
76. Kruger TF, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. Hum Reprod Update 1999; 5: 172
77. Liakatas J, Williams AE, Hargreave TB. Scoring sperm morphology using the scanning electron microscope. Fertil Steril 1982; 38: 227
78. Baker HW, Clarke GN. Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. Clin Reprod Fertil 1987; 5: 37
79. Liu DY, Baker HW. Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. Hum Reprod 1990; 5: 298
80. Franken DR, et al. Hemizona assay and teratozoospermia: increasing sperm insemination concentrations to enhance zona pellucida binding. Fertil Steril 1990; 54: 497
81. Oehninger S, et al. Prediction of fertilization in vitro with human gametes: is there a litmus test? Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 1760
82. Oehninger S, et al. Clinical significance of human sperm-zona peflucida binding. Fertil Steril 1997; 67:1121
83. Liu DY, et al. Human sperm-zona pellucida binding, sperm characteristics and in-vitro fertilization. Hum Reprod 1989; 4: 696
84. Kruger TF, et al. Abnormal sperm morphology and other semen parameters related to the outcome of the hamster oocyte human sperm penetration assay. Int-JAndrol 1988; 11: 107
85. Vazquez-Levin MH, et al. The relationship between critical evaluation of sperm morphology and the TYB-optimized zona free hamster oocyte sperm penetration assay. Int J Androl 1999; 22: 329
86. Oehninger S, et al. Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. Fertil Steril 1994; 61: 349

87. Bastiaan HS, et al. Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization. Fertil Steril 2003; 79: 49
88. Toner JP, et al. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. Andrologia 1995; 27: 143
89. Spiessens C, et al. Isolated teratozoospermia and intrauterine insemination. Fertil Steril 2003; 80: 1185
90. Duran HE, et al. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. Hum Reprod Update 2002; 8: 373
91. Moosani N, et a]. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. Fertil Steril 1995; 64: 811
92. Harkonen K, Suominen j, Lahdetie J. Aneuploidy in spermatozoa of infertile men with ceratozoosper-mia. Int J Androl 2001; 24: 197
93. Calogero AE, et al. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. Hum Reprod 2001; 16: 1172
94. Mclnnes B, et al. Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected in spermatozoa from infertile men. Hum Reprod 1998; 13: 2787
95. Templado C, et al. Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. Mol Reprod Dev 2002; 61: 200
96. Lewis-Jones 1, et al. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. FertilSteril2003;79:212
97. Miharu N, Best RG, Young SR. Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. Hum Genet 1994; 93: 502
98. Guttenbach M, et al. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. Hum Reprod 1997; 12:468
99. Celik-Ozenci C, et al. Sperm selection for 1CSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. Hum Reprod 2004; 19: 2052
100. Vicari E, et al. Absolute polymorphic tetatozoospermia in patients with oligo-asthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. J Androl 2003; 24: 598
101. Gole LA, et al. Does sperm morphology play a significant tole in increased sex chromosomal disomy? A comparison between patients with teratozoospermia and OAT by FISH. J Androl 2001; 22: 759
102. Burrello N, et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. Hum Reprod 2004; 19: 2298
103. Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Womack JE. Mapping of the azh locus to mouse chromosome 4. JHered 1992; 83: 56
104. Mendoza-Lujambio I, et al. The Hookl gene is nonfunctional in the abnormal spermatozoon head shape {azh) mutant mouse. Hum Mol Genet 2002; 11: 1647
105. Adham IM, et al. Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). Mol Hum Reprod 2001; 7: 513
106. Xu X, et al. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. Nat Genet 1999; 23: 118
107. von Bulow M, et al. Molecular nature of calicin, a major basic protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. Exp Cell Res 1995; 219: 407
108. Rousseaux-Prevost R, et al. Abnormal expression of protein 4.1 in spermatozoa of infertile men with teratospermia. Lancet 1994; 343: 764
109. Milatiner D, et al. Associations between androgen receptor CAG repeat length and sperm morphology. Hum Reprod 2004; 19: 1426
110. Martin-du Pan RC, Campana A. Physiopathology of spermatogenic arrest. Fertil Steril 1993; 60: 937
111. Tesarik J, et al. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. Hum Reprod 2002; 17: 1811
112. Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. Nat Med 2002; 8 (Suppl): S33
113. Maduro MR, et al. Microsatellite instability and defects in mismatch repair proteins: a new aetiology for Sertoli cell-only syndrome. Mol Hum Reprod 2003; 9: 61
114. Casella R, et al. Androgen receptor gene poiyglutaminc length is associated with testicular histology in infertile patients. J Urol 2003; 169: 224
115. Lin WW, et al. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. J Urol 1997; 158: 1791
116. Lin WW, et al. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. Int Urol Nephrol 1999; 31: 361
117. Tesarik J, et al. Gas pase-de pen dent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. Hum Reprod 2004; 19: 254
118. Aitken RJ, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. Mol Reprod Dev 1997; 47: 468
119. Gergely A, et al. Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. Hum Reprod 1999; 14: 2007
120. Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. Mol Cell Endocrinol 2004; 216: 31

121. Ombelet W, et al. Semen quality and intrauterine insemination. Reprod Biomed Online 2003; 7: 485
122. Arslan M, ct al. Predictive value of sperm-zona pellucida binding capacity under hemizona assay conditions for pregnancy outcome in intrauterine insemination therapy. Hum Reprod 2005; in press
123. Katsuki T, et al. Prediction of outcomes of assisted reproduction treatment using the calcium ionophore-induced acrosome reaction. Hum Reprod 2005; 20: 469
124. Duran EH, et al. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. Hum Reprod 2002; 17: 3122
125. Oehninger S, et al. Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. Fertil Steril 1988; 50: 283
126. Oehninger S, et al. A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in-vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 1086
127. Oehninger S. Place of intracytoplasmic sperm injection in management of male infertility. Lancer 2001;357:2068
128. Oehninger S, Franken D, Kruger T. Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? Fertil Steril 1997; 67: 434
129. Liu de Y, Baker HW. Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. Fertil Steril 2003; 79: 74
130. Liu de Y, Garrett C, Baker HW. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization - embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. Fertil Steril 2004; 82: 1251
131. Silber SJ, et al. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy, Hum Reprod 1995; 10: 148
132. Palermo GD, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. Hum Reprod 1999; 14: 741
133. Tournaye H. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: which method is to be preferred? Hum Reprod 1999; 14 (Suppl 1): 71
134. Monz6 A, et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients: stressing the liaison between the urologist and reproductive medicine specialist. Urology 2001; 58: 69
135. Ola B, et al. Should 1CSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? Considerations of fertilization and embryo development, cost effectiveness and safety. Hum Reprod 2001; 16: 2485
136. Oehninger S, Gosden RG. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? No, not in light of the scientific data. Hum Reprod 2002; 17: 2237
137. Greco E, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2005; 20: 226
138. Oehninger S. Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors. J Soc Gynecol Invest 2005; 12: 222
139. Tournaye H. Use of testicular sperm tor the treatment of male infertility. Baillieres Clin Obstet Gynaecol 1997; 11:753
140. Oehninger S, et al. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. Mol Cell Endocrinol 2000; 169: 3
141. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 11298
142. Tesarik J, et al. Pharmacological concentrations of follicle-stimulating hormone and testosterone improve the efficacy of in vitro germ cell differentiation in men with maturation arrest. Fertil Steril 2002; 77: 245
143. Tanaka A, et al. Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. Fertil Steril 2003; 79 (Suppl 1): 795
144. Cozzolino DJ, Lamb DJ. Germ cell transplantation: a potential treatment of severe testicular failure. Curr Urol Rep 2000; 1:262
145. Tesarik J. Overcoming maturation arrest by in vitro spermatogenesis: search for the optimal culture system. Fertil Steril 2004; 81: 1417

22

Erkek İnfertilitesi Tedavisinde Ürolojik Girişimler

Victor M. Brugh, Donald F. Lynch Jr.

Çeviri: *Mete Kilciler*[*]

GİRİŞ

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da çiftlerin yaklaşık %20'si çocuk sahibi olmakta sorun yaşamakta ya da istediklerinden daha az sayıda çocukları olmaktadır. Bu vakaların %50'sinden erkek faktörü sorumludur. Erkek faktörü bu olgularda ya primer sebep ya da başka faktörlere yardımcı sebeptir. Bu nedenle ürologlar genelde infertil hastaları gören ilk uzmanlar olmaktadırlar.

Son 20 yılda yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesi sayesinde çiftler önceden mevcut imkanlarla asla elde edemeyecekleri çocuklara sahip olmaktadırlar. Yeni tedavilerin gelişmesi ile birlikte ürologun yardımcı üreme tekniklerindeki etkinliğinde de gelişme olmuştur. Bu bölümde ürologu ilgilendiren cerrahi ve medikal tedavilerden bahsedilecektir.

VARİKOSEL

Varikosel, erkek infertilitesinin en yaygın düzeltilebilir sebebidir. Varikosel, spermatik kord etrafındaki internal spermatik, vazal ve kremasterik venlerin dilate olarak solucanvari bir hal alması ve skrotumda bir kitle oluşturması durumudur. Varikosel genel popülasyonun %15'inde bulunmasına rağmen primer infertilite nedeni ile araştırılan hastaların %35'inde tespit edilmektedir. Sekonder infertilite nedeniyle araştırılan hastalarda ise bu oran %80'lere çıkmaktadır[1]. Bu hastalar tamamen asemptomatik olabileceği gibi, ayakta uzun süre durulduğunda veya fizik hareketlerle başlayan skrotal ağrıları bulunabilir.

Varikosel, spermatik venlerde kapakcıkların tam olarak kapanmaması ile ortaya çıkmaktadır. Genelde sol tarafta görülmesine rağmen bilateral de olabilir. Birçok insan ve hayvan çalışmalarında varikoselin uzaması ve şiddetinin artması ile birlikte testiküler fonksiyonlarda azalma olduğu gösterilmiştir. Bir teoriye göre, varikosel nedeniyle bozulmuş venöz drenaj skrotum ve kordda ısı denetimini bozmakta bu da testisde ısı artışına sebep olmaktadır. Testisdeki ısının artması ise spermatogenezde azalma ile sonuçlanmaktadır. Testisdeki azalmış venöz drenaj toksik maddelerin bu bölgede artmasına neden olmaktadır. Bu durum spermatogenezde azalmaya katkıda bulunmakta ayrıca hatalı sperm üretimine de sebep olmaktadır[2]. Görüldüğü gibi varikosel sadece total sperm sayısında azalma yapmakla kalmaz bunun yanında Kruger strict kriterleri ile ölçülmüş normal sperm sayısında da azalmaya yol açmaktadır.

[*] GATA Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.

VARİKOSEL ONARIMI

Varikoselektomi için çok sayıda cerrahi yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar retroperitoneal, inguinal ve subinguinal yaklaşımlardır. Açık retroperitoneal varikosel onarımı (Palomo) internal inguinal ring seviyesinde yapılan bir insizyondan girilerek retroperitoneal yoldan sol üreterin yanında lökalize internal spermatik venlerin diseke edilip bağlanması ve eksize edilmesidir[3]. Bu seviyede testiküler arter internal spermatik venden ayrılır burada genelde bir ya da iki ven bulunur. Retroperitoneal yaklaşım laparoskopik olarak da yapılabilir. İnternal spermatik ven sol renal vene dökülmeden önce laparoskopik olarak klipslenir[4]. Her yöntem deneyimli ürolog tarafından çabuk, kolay ve iyi tolere edilen bir şekilde ayaktan yapılabilir. Ancak dezavantaj olarak hastaların %15'inde nüks, üçte birinde ise postoperatif hidrosel görülmektedir[5].

İnguinal yaklaşımda (Ivanissevich) 3-4 cm lik bir insizyon sonrası spermatik kord bulunur, mobilize edilir ve askıya alınır. Lup yada operasyon mikroskobu kullanılarak testiküler arter ve dalları ile majör lenfatik yollar ayrılır. Venler tek tek bağlanıp kesilir. Bazı cerrahlar aynı zamanda testisi de mobilize edip eksternal spermatik perforatörleri ve gubernakular venleri de bağlarlar[6,7].

Subinguinal yaklaşımda, insizyon eksternal ringin hemen altına yapılır, ve spermatik kord mobilize edilir. Testis insizyon yerinden mobilize edilebilir, internal spermatik perforatörler ve gubernakuler venler bağlanır ve kesilir. Büyütme kullanılarak lenfatikler ve testiküler arter dalları korunur, venler dikkatli bir şekilde bağlanıp kesilir[8].

Varikoselektomi ile semen kalitesinde %60-80'lere varan oranlarda anlamlı derecede artış sağlanır. Spontan gebelik oranları ise %20-60 olarak bildirilmiştir. Varikoselektomi sonuçlarını değerlendiren çalışmalar azdır, ancak Madgar ve arkadaşları varikoselektomi yapılan hastaların eşlerinde %71 oranında spontan gebelik olduğunu bildirmişlerdir. Bu prospektif çalışmada tedavi edilmeyen grupta bu oran %10 olarak bulunmuştur[9]. Varikoselektomi sonrasında sperm sayılarındaki artmaya ek olarak sperm morfolojisinde, motilitesinde, sperm penetrasyon testlerinde, seminal reaktif oksijen türlerinde ve gebelik oranlarında gelişme olduğu bildirilmiştir[13]. Bazı azospermik hastalarda varikosel onarımı sonrasında ejekülatta spermin görülmeye başladığını bildiren yayınlar da bulunmaktadır[14].

ENDOKRİNOPATİLER

Testisin spermatogenezde hormonal yönden rolü önemlidir. Hormonal kontrol esas olarak hipotalamik-hipofizer-gonadal aks (HPG) ile sağlanır. HPG aksının merkezi olan hipotalamus beynin birçok yerinden uyarılar alır. Ayrıca adrenal ile gonadlardan yapılan protein ve steroid yapılı hormonlar ile de feedback mekanizması sayesinde uyarı alır. Gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH), hipotalamusun preoptik ve arkuat nükleuslarından salınır. GnRH, pulsatil şekilde salınarak portal hipofizyel alana yayılır ve anterior hipofizi besler. Bu hormonun etkisi ile de hipofizden FSH ve LH salgılanır. LH salınımı hem hipotalamik hem de hipofizer seviyede androjenlerin feedback etkisi ile regüle edilir. FSH salınımı ise testisin sertoli hücrelerinden salınan inhibinin negatif feedback etkisi ile düzenlenir. Testisde LH'nin uyarması ile Leydig hücrelerinden testosteron salgılanır. FSH'nın uyarması ile spermatogenez başlar ve spermatogenezin idamesi için de FSH uyarımına gerek vardır. Hem FSH hem de LH kaliteli sperm üretimi için gereklidir. Akslarda feedback normal fonksiyon için gereklidir. Hormonal aktivitenin regülasyonu için birçok seviyede feedback mekanizması mevcuttur. HPG aksındaki bir anormallik erkekte infertiliteye sebep olabilir. Erkek infertilitesinde endokrin defektler genel olarak serum LH, FSH, prolaktin ve estradiol seviyeleri ile değerlendirilir.

GnRH'nın Üretim ve Sekresyon Bozuklukları

Herhangi bir anatomik bozukluk olmadan GnRH'nın anormal sentez ve salınımına bağlı olarak FSH ve LH'nın serum sevilerinin azalması durumuna idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) ismi verilir. Gonadotropin seviyeleri yetersiz olduğunda androjen üretimi ve spermatogenez bozulur.

Kallman sendromu hipotalamusdan GnRH sekresyonunun azalmasıdır ve X'e bağlı geçiş gösteren en sık erkek infertilitesi sebebidir[15,16]. 10-60 bin canlı doğumda bir görülür. Kallmann sendromu Kal genindeki (Xp22.3) mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Uzun boy, anozmi, küçük penis ve yumuşak küçük testisler bu hastalığın fenotipik özelliklerindendir. Testis, FSH ve LH ile uyarılamadığından spermatogenez meydana gelemez ve testosteron üretimi de yapılamaz. Bu hasta-

larda genelde ilk başvuru pubertenin başlamaması ile ilgilidir.

Hormon replasman tedavisi ile IHH hastalarının çoğunda fertilite elde edilebilir[17]. GnRH bu hastalara eksojen bir infüzyon pompası ile 90 dakikada bir pulsatil olarak verilebildiği gibi subkutan olarak da günde iki kez uygulanabilir. Hormon replasman tedavisi için insan koryonik gonadotropinin (hCG) haftada 3 kez subkutan olarak 2000 IU kullanılması daha sık uygulanan bir tedavi şeklidir. hCG tedavisi spermatogenezi başlatır fakat spermatogenez devamı için ilave FSH tedavisine gerek vardır. Bu tedavi, hCG tedavisine başladıktan 3-6 ay sonra rekombinant FSH (haftada üç kez 37.5-75 IU intramusküler) ile yada insan menapozal gonadotropini (hMG) ile yapılır. IHH'ya sebep olan GnRH reseptör yada GnRH sekresyon bozuklukları hCG yada FSH replasmanı ile tedavi edilebilir.

Hipofiz Fonksiyon Bozuklukları

LH ve FSH hipofizden GnRH etkisi altında pulsatil olarak salgılanır. Hipofiz kitleleri portal sisteme direk bası uygulayarak gonadotropinleri serbestleştirmek yoluyla yada FSH/LH'nın azalmış sekresyonuna bağlı olarak hipogonadotropik hipogonadizm oluşturur. Düşük testosteron ile beraber düşük LH seviyeleri olan hastalarda hipofizer adenom düşünülmelidir. Bu amaçla manyetik rezonans (MR) temel görüntüleme yöntemidir.

Hiperprolaktinemi, hipofiz adenomları ile beraber bulunabilir. Hiperprolaktinemi, birçok psikolojik hastalıklarda verilen selektif seratonin reuptake inhibitörlerinin (SSRIs) kullanımı sonucunda da gelişebilir. Yüksek prolaktin seviyeleri GnRH'nın normal pulsatil salınımını etkiler sonuçta seksüel disfonksiyon ve infertiliteye sebep olur. Cerrahi, radyoterapi ve medikal tedavi seçeneklerinden biri yada birkaçı tedavide kullanılabilir. Medikal tedavide kabergolin (Dostinex) ve bromokriptin (Parlodel) kullanılır. Semptomlar ve rutin hormon çalışmaları bir hipofiz hastalığını düşündürdüğü zaman MR ile hipofiz görüntülenmelidir.

FSH/LH yapısındaki veya reseptör aktivitelerindeki anormallikler mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar neticesinde hafif hipogonadizmden komplet virilizasyon yokluğuna kadar değişen tablolar ortaya çıkabilir[18-20].

Testosteron Sentez ve Fonksiyon Bozuklukları

Androjen sentez ve metabolizması kompleks ve basamaklı bir süreçtir. Bu biyosentezdeki enzimlerde meydana gelen mutasyonlar erkek üreme fonksiyonunu etkiler. Kolesterolden testosteron sentezini gerçekleştiren 5 enzim bulunmaktadır. Bu enzimlerdeki mutasyonlar inkomplet virilizasyondan, inmemiş testisle beraber bulunan komplet feminizan genitalyaya kadar değişebilen fenotiplere neden olurlar[22]. Testosteron, eksternal genitaller ve prostatta 5 alfa redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. 5 alfa redüktaz enzim genindeki mutasyonlar eksternal genitallerin inkomplet gelişmesine neden olduğu gibi sperm efektif olarak da atılamadığı için infertilite gelişir[21].

Testosteron ve DHT tüm hücrelere kolayca difüze olabilir ancak sellüler aktiviteyi etkilemek için çekirdeğe sadece androjen reseptörleri yardımıyla girebilir. Androjen reseptör genindeki (AR) defektler bu siklusun bozulmasına sebep olur. Siklusun bozulması fenotipik spekturumu geniş olan internal ve eksternal virilizasyon anormalliklerine neden olur. Bunlara aynı zamanda androjen duyarsızlık sendromları da denilmektedir. Bu hastalıklar Reifenstein's sendromu, testiküler feminizasyon sendromu, Lub's sendromu ve Rosewater's sendromlarıdır[22]. Androjen duyarsızlığının bir diğer formu da poliglutamin yolağının AR transaktivasyon alanıyla genişlemesidir ki bu da yetişkin başlangıçlı motor nöron hastalığına neden olur. Spinal ve bulbar müsküler atrofi (SMBA) veya diğer ismi ile Kennedy hastalığı X'e bağlı geçiş gösteren genetik bir hastalıktır. Bu hastalarda proksimal spinal ve bulbar kaslarda ilerleyici zayıflık, jinekomasti, testiküler atrofi ve orta yaşlarda ortaya çıkan spermatogenetik bozukluk görülür[23].

Günümüzde testosteron replasman tedavisi için enjeksiyon tedavileri, çeşitli jeller ve flaster formları oldukça yaygın kullanılmaktadır. Üreme çağındaki erkeklerin libido kaybı, erektil disfonksiyon ve halsizlik şikayetleri için eskiye göre daha sıklıkla testosteron replasman tedavileri kullanılmaktadır. Anabolik steroidler amatör veya profesyonel vücut geliştiricileri tarafından da kullanılmaktadır. Eksojen alınan androjenlerin endojen androjen üretimini baskıladıkları bilinmektedir. İntratestiküler testosteron seviyelerinin yetersiz olması spermatogenezde bozulmaya ve sonuçta azospermiye neden olmaktadır. Steroidlerin spermatogenez üzerinde yaptığı

zararlı etkilerinin geri dönüşüm oranları değişkenlik göstermektedir. Birçok erkekte eksojen testosteron tedavisi kesildikten sonra 6 ay ila bir yıl içinde spermatogenez geri döner[24]. Eğer normal endojen testosteron üretimi geriye dönmez ise bazı hastalarda hCG ve hMG tedavisi ile testiküler testosteron üretimi ve spermatogenez başarılı bir şekilde geriye döndürülebilmektedir[25].

Antiöstrojenler ve aromatoz inhibitörleri gibi hormonal tedaviler de idiyopatik oligospermili hastalarda kullanılmaktadır[25]. Testosteron aromataz enzimi ile östradiole metabolize olur. Bu dönüşüm testolakton (steroid yapıda aromataz inhibitörü) veya anastrazol ve letrozol (non-steroid yapıda aromataz inhibitörleri) gibi aromataz inhibitörleri tarafından bloke edilebilir. İdiyopatik oligospermi tedavisi için testolakton kullanımı ile ilgili ilk çalışmalarda çok farklı sonuçlar vardır. Çift kör, plasebo kontrollü, randomize bir çalışmaya göre testolakton plasebo ile karşılaştırıldığında herhangi bir avantajının olmadığı gösterilmiştir[26]. Son çalışmalarda düşük sperm konsantrasyonu ve motilitesi ile birlikte testosteron/östradiol oranlarının az olduğu bir hasta grubu olduğu bildirilmiştir. Bu hasta grubunda anastrozol ve letrozol gibi aromataz inhibitörleri ile sperm konsantrasyonu ve motilitesinde istatistiksel anlamlı derecede artış olduğu görülmüştür[27].

Dolaşımdaki östradiol GnRH sekresyonunda feedback inhibisyona sebep olur. Klomifen sitrat ve tamoksifen gibi antiöstrojenler bu feedback inhibisyonunu hipotalamus seviyesinde bloke ederek FSH ve LH sekresyonunda artışa neden olurlar. Bu tedavi ile testosteron üretimi artar ve muhtemelen de spermatogenezde artış meydana gelir. Klomifen sitrat tedavisi ile idiyopatik oligospermili hastaların sperm parametrelerinde düzelme olduğunu bildiren fakat kontrollü olmayan birçok çalışma mevcuttur. Ancak randomize, kontrollü on çalışmanın ele alındığı bir derlemede klomifen ve tamoksifen kullanımının testosteron seviyelerini artırdığını ancak plasebo ile karşılaştırıldığında gebelik oranlarının benzer olduğu bildirilmiştir[28]. Son olarak klomifen sitratla tedavi edilen küçük bir erkek hasta grubunda sperm parametrelerinde kötüleşme olduğu da görülmüştür[29].

KRİPTORŞİDİZM VE ORŞİOPEKSİ

Erkek bebek doğumlarının %5'inde testislerde iniş bozuklukları olsa da bebekler bir yaşına geldiklerinde kriptorşidizm oranı %0.8 olarak bildirilmektedir[30,31]. Ortalama 6-9 aydan sonra testislerde spontan iniş olmamaktadır, ve hormonal tedavi ile inmemiş testisi tedavi etmek genellikle mümkün olmamaktadır. Son 30 yıldan beri cerrahi olarak düzeltme yaşı puberteden hemen önceki yaşlardan bir yaşlarına kadar inmiştir. Kriptorşidik testislerde bir yaşından sonra yapısal bozulmalar başlamaktadır. Puberteye kadar tedavi edilmeyen kriptorşidik testislerde sertoli cell only sendromu gelişme olasılığının %70 olduğu bildirilmiştir. Bu grup hastaları bir yaşına yakın bir dönemde opere etmek hem anestezi riski açısından hem de fizyolojik açıdan avantajlıdır[32].

Kriptorşidizmli doğan çocuklarda testiküler malinite gelişme riskinin yüksek olduğu bilinmektedir. Orşiopeksi bu riski değiştirmemektedir. Ancak orşiopeksi ile testis kolayca muayene edilebileceği bir lokalizasyona getirilmektedir. İnmemiş testis hikayesi olan erkeklerde infertilite için testiküler müdahale edileceği zaman karsinoma in situ açısından testis biyopsisi yapılmalıdır.

İnmemiş testisin tedavisi için birçok cerrahi prosedür tanımlanmıştır. Bevan, başarılı bir orşiopeksi yapabilmek için spermatik kordun yeterli mobilizasyonunun, beraberinde bulunan herninin tamirinin, testisin skrotum içine uygun biçimde yerleştirilerek fikse edilmesinin dikkat edilmesi gereken kurallar olduğunu belirtmiştir[32]. İnmemiş testislerin büyük çoğunluğu inguinal kanal yada internal inguinal ringin hemen yakınında bulunur. Bazıları ise intraabdominal yada suprapubik dokulardan perineye kadar olan bölgede yerleşmiş şekilde ektopik olarak bulunabilir[34].

Standart bir orşiopekside inguinal kanal boyunca insizyon yapılır bu sırada ilioinguinal sinire hasar vermemeye çalışılır. Spermatik kord bulunur, kanal tabanından serbestleştirilir, kordun proksimal traksiyonu ile testis bulunur ve anormal gubernakular bağlantılar eksize edilerek testis serbestleştirilir. İnternal inguinal ring seviyesinde beraberinde bulunan herni kesesi ayrılır. Vaz deferense dikkat ederek kese bağlanır ve kesilir. Kordun diseksiyonu, testis skrotuma yerleştirilince gerginlik olmaması için retroperitoneal alana kadar devam eder. Daha sonra testis cilt ve dartos fasiası arasındaki dartos poşuna

kalıcı suturlarla fikse edilir. Skrotal cilt ve inguinal insizyon vikril veya monokril suturla kapatılır[35].

Eğer testis internal ring seviyesinde veya retroperitoneal alanda yüksek yerleşimli ise, orşiopeksi, Fowler ve Stephens'in tarif ettiği şekilde testiküler arterin transeksiyonu ve testisin mobilizasyonundan sonra skrotuma yerleştirilerek yapılır[36]. Orşiopeksi için çeşitli laparoskopik teknikler de geliştirilmiştir. Ayrıca endikasyonu olan bazı zor vakalarda mikrovasküler ototransplantasyon yapılabilir[37].

EJEKÜLASYON BOZUKLUKLARI VE DUKTAL OBSTRÜKSİYON

Normal spermatogenezi olup da ejekülasyon bozukluğu veya obstrüksiyonu olan vakalarda infertilite sebebi spermin vajinal boşluğa boşaltılamamasından kaynaklanmaktadır. Bu çiftler için birçok tedavi alternatifleri vardır. Ejekülatuar disfonksiyonu olan bazı erkeklerde medikal tedavi yapılır. Cerrahi tedavide ise ya rekonstrüksiyon ya da testiküler sperm elde edilerek in vitro fertilizasyon/intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF/ICSI) yapılır.

EJEKÜLASYON BOZUKLUĞU

Ejekülasyon, koordineli bir şekilde prostatik üretrada semenin biriktirilmesi (emisyon), mesane boynunun kapanması, pelvik taban ve periüretral kasların kasılarak semenin üretradan dışarı atılması olayıdır. Ejekülasyon, santral ve periferik sinir sisteminin kontrolünde yapılır. Emisyon, paravertebral sempatik ganglion içerisinde seyreden T10-L3 den orijin alan sempatik nöronlarla kontrol edilir. Ejekülasyon için, S2-S4'den çıkan pudental sinir içerisinde mesane boynu ve pelvik taban kaslarına giden somatik motor inervasyona da gerek vardır.

Ejekülasyon anormallikleri, emisyon veya ejekülasyon yokluğundan ya da retrograd ejekülasyondan kaynaklanmaktadır. Emisyon veya ejekülasyon bozukluğu, testis kanseri nedeniyle retroperitoneal lenf nod diseksiyonunda, pelvik, abdominal veya diğer retroperitoneal operasyonlarda sempatik zincirin bir kısmının eksizyonu neticesinde meydana gelebilir. Retrograd ejekülasyon, ejekülasyon esnasında mesane boynunun tam kapanmaması neticesinde meydana gelir. Diabetes mellitus, anejekülasyon veya muhtemel retrograd ejekülasyon yapan periferik sinir sistemi hasarına sebep olur. Miyolodisplazi ve spinal kord yaralanması gibi santral sinir sistemi lezyonları da ejekülasyon bozukluklarına sebep olur. Bazı antihipertansifler (anorgazmi veya retarde ejekülasyona sebep olarak), antipsikotikler, antidepresanlar, alfa blokerler (retrograd ejekülasyona sebep olarak) gibi bir kısım ilaçlar da ejekülasyonu etkilemektedirler. Retrograd ejekülasyona sebep olan daha önceki mesane boynu cerrahisi (YV mesane boynu plastisi, prostatın transüretral rezeksiyonu veya insizyonu) ve ejekülator kanalların obstrüksiyonu gibi anatomik değişiklikler de ejekülasyon bozukluklarına sebep olurlar.

Ejekülasyon bozukluğunun tedavisi medikal veya cerrahi olabilir. Emisyon, ejekülasyon veya retrograd ejekülasyona sebep olan nörolojik bozukluklar mesane boynunu kapatıp prostatik üretrada semenin biriktirilmesini sağlayan sempatomimetik ajanlarla tedavi edilebilir. Bu ilaçlar imipiramin hidroklorid ve psödoefedrin hidrokloriddir. Medikal tedavi, ejekülasyon bozukluğu olan hastaların %50'sinde başarılıdır[38]. Retrograd ejekülasyondan antegrad ejekülasyona geçmek için yapılan tedavi başarısız olursa ve anejekülasyonu hasta tedavi ile retrograd ejekülasyonlu hale getirilebilirse mesaneden alınan fonksiyonel sperm intrauterin inseminasyonda veya IVF'de kullanılabilir. Canlı sperm elde etmek için, sodyum bikarbonat veya potasyum sitrat gibi alkile edici ajanlarla ejekülasyondan sonraki idrar örneğinin pH'sı 7.5 veya daha yükseğe çıkarılmalıdır. Elektroejekülasyon veya vibratör ile stimülasyon, ejekülasyon bozukluğu olan erkeklerden sperm elde etmek için alternatif tekniklerdir. Vibratör ile stimülasyon için torakolombar spinal kordda intakt bir refleks ark ve ejekülasyonu indükleyen bir vibratör gereklidir[39]. Ayak tabanları çizildiği zaman kalça ekleminde fleksiyon[40] meydana gelmesi ve bulbokavernöz refleksin intakt[41] olması vibratör ile stimülasyondan hastanın fayda göreceğinin göstergeleridir. Bazı çalışmalarda vibratör ile stimülasyon tedavisinin spinal kord yaralanmalı hastaların %83'ünde başarılı olduğu bildirilmiştir[42].

Hem medikal tedavi hem de vibrasyon ile stimülasyon tedavisinden fayda görmeyen hastalar için elektroejekülasyon diğer bir tedavi alternatifidir. Elektroejekülasyon, retroperitoneal lenf nod diseksiyonuna sekonder anejekülasyonu olan hastalarda ve inkomplet paraplejik erkeklerde genel anestezi gerektirir. Bu işlemde ejekülasyonu uyar-

mak için rektal prob ile elektrik akımı uygulanır ve genellikle başarı elde edilir. Bu işlemin en büyük riski spinal kord yaralanması olan hastalarda otonomik disrefleksiyi tetiklemesidir. Son zamanlarda ejekülasyon bozukluğu olup da tedavilerden fayda görmeyen hastalar ile bu tedavileri yaptırmakta isteksiz olanlarda veya kadın faktörü olup da IVF gerektiren çiftler için epididimal veya testiküler sperm elde ederek IVF/ICSI tavsiye edilen tedavi şeklidir.

OBSTRÜKSİYON

Ekskretuar duktal siklusun obstrüksiyonu ejakülatuar kanal, vaz deferens yada epididimde meydana gelebilir. Obstrüksiyonun yerini belirlemek için anamnez, fizik muayene, semen parametreleri ve radyolojik çalışmalar yapılır. Vazal obstrüksiyonun en sık görülen sebebi vazektomidir. Ancak skrotal, inguinal (herni onarımı gibi) veya pelvik cerrahi sonrasında da vazal obstrüksiyon görülebilmektedir. Hidroselektomi, spermatoselektomi yada orşiopeksi gibi skrotal cerrahilerden sonra epididimal obstrüksiyon gelişebilir. Rekürren epididimit atakları da epididimal obstrüksiyona sebep olabilir. Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu sendromu (CBAVD) olan hastaların fizik muayenesinde vaz deferens tespit edilemez ve dilate epididimler de bu tanıyı destekler.

VAZEKTOMİ

Vazektomi, Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yarım milyon erkeğin kalıcı bir doğum kontrolü sağlamak amacıyla yaptırdığı bir cerrahidir. Genellikle başarılı bir cerrahidir ancak %0.1-0.3 başarısızlık oranları da bildirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda kardiyak ölümle vazektomi arasındaki ilişkiden bahsedilmiş olmasına rağmen son yapılan çalışmalarda böyle bir ilişki gösterilememiştir. Ayrıca önceki çalışmalarda vazektomi yapılan erkeklerde prostat ve testis kanseri riskinin arttığı yeni yapılan çalışmalarda gösterilememiş ve tartışma konusu olarak kalmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar devam etmektedir, fakat vazektomi ile tümör riskinin arttığını düşündüren deliller bu güne kadar bulunamadığı için klinik pratikte vazektomi endikasyonları değişmemiştir[43].

Vazektomi tekniği

Konvansiyonel vazektomi

Palpasyonla vaz deferens diğer spermatik kord yapılarından izole edilir ve üzerindeki skrotum cildi ile dokular arasına epinefrinsiz %0.2'lik lidokain enjekte edilir. Daha sonra vaz deferens skrotum cildine çamaşır pensi ile fikse edilir ve cilde 4-7 mm lik bir insizyon yapılır. Vaz deferens dikkatli bir şekilde etrafındaki yapılardan diseke edilir. İzole edildikten sonra bağlanır veya distali çift klipslendikten sonra proksimalden 5 mm lik segment çıkarılır. Kesi uçları vaz lümenini tamamen kapatmak için fulgarize edilir. Alternatif olarak vaz, ipek yada vikril ile suture edilir sonra fulgarize edilir. Skrotal cilt insizyonu 4/0 vikril ile kapatılır. Aynı işlem karşı tarafa da uygulanarak operasyon bitirilir.

Bistürisiz vazektomi

Bistürisiz vazektomi Çin'de geliştirilen vaz deferensi tutan ve skrotum cildine fikse eden özel bir klemp ile yapılan konvansiyonel vazektomiye alternatif bir tekniktir. Pens ile vaz üzerindeki skrotum cildi delinir, vaz tutulup dışarıya çekilir, dışarıda bağlanıp kesilir ve uçlar fulgarize edilir. Bağlanan ve kesilen uçlar cildin delindiği yerden tekrar skrotum içine itilir. Vaz deferensin çıkarıldığı yer çok küçük olduğu için sutur atmak gerekmez. Kanama ve dokulardaki diseksiyon minimal olduğu için hasta herhangi bir rahatsızlık hissetmez ve normal günlük yaşamına çabucak döner [44].

Vazektomiden 4-6 hafta sonra birinci semen analizi, birinci semen analizinden 4-6 sonra da ikinci semen analizi yapılır. İkinci semen analizinde de sperm görülmesi durumunda cerrahinin başarısız olduğu kanısına varılır ve bu durumda operasyon tekrarlanmalıdır.

Vazektominin geri döndürülmesi

Vazovazostomi

Vazektomi yapılan erkeklerin %2-6'sı vazektominin geri döndürülmesini istemektedirler. Herni onarımı veya diğer pelvik cerrahiler sırasında da vaz deferens hasarlanabilir. Bir çalışmaya göre pediyatrik herni onarımı sırasında %1-2 oranında vaz deferensin yaralandığı bildirilmiştir[45]. Evlilik durumunda değişiklik olan, yeniden evlenen ve çocuk

sahibi olmak isteyen çiftler vazektomi geri dönüşümü isteyen grubun büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Vazektominin geri döndürülmesi için geniş kullanım alanı bulmuş birçok teknik bulunmaktadır.

Medifiye tek tabaka vazovazostomi

Anestezi altında supin pozüsyonundaki hastada vazektomi uçları palpasyonla tespit edilir. Önceki vazektomi seviyesine bağlı olarak ya orta hat skrotal insizyon yada bilateral üst skrotal insizyon ile skrotum açılır. Testis mobilize edilir ve hemiskrotumdan dışarıya çıkarılır, ıslak rulo ile sarılır. Vaz deferensin eksize edilen uçları bulunup serbestleştirilir. Bu bölümlerde nedbe dokuları ve varsa sperm granülomları eksize edilir. Mikroskop yerleştirildikten sonra abdominal vaz deferens güdüğü incelenir. Lümen, 27 gauge pediatrik intraket girebilecek büyüklükte dikkatli bir şekilde lakrimal kanal probları ile dilate edilir. Az bir miktar serum fizyolojik lümene enjekte edilerek vaz segmentinin lümeninin açık olup olmadığı kontrol edilir.

Testiküler taraftaki vaz güdüğünün çapı ve içerisinde semen olup olmadığı incelenir. Eğer mikroskopik incelemede semen görülmez ise bir miktar vaz dokusu daha eksize edilir ve inceleme tekrarlanır. Buna rağmen semen görülmez ise vazoepididimostomi endikasyonu vardır. Eğer gerekli ise bu aşamada testis biyopsisi de yapılabilir.

Vaz segmenti hazırlandıktan ve lümeninin açık olduğu kontrol edildikten sonra iki uç bir vaz klibi ile aynı hizaya getirilir ve 8/0 prolen sutur posterior serozal yüzeye yerleştirilir. Daha sonra 9/0 prolen sutur bir tarafın serozasından lümene, lümenden diger lümene ve oradan da serozadan çıkacak şekilde geçilerek bağlanır. Aynı sutur eşit aralıklarla üç yere daha yerleştirilir. Bu şekilde yapılan suturlar lümendeki açıklığın korunmasını sağlar. Eğer her iki güdüğün çapı büyük ise aynı şekilde ilave birkaç sutur daha yerleştirilebilir.

Vazal uçlar aynı hizaya getirilip, ilk suturlar konulduktan sonra water-tight anastomoz için 4-6 adet serozal sutur daha yerleştirilir. Vaz, daha sonra kordu çevreleyen yapılara 4/0 kromik ile tespit edilir ve testis skrotuma tekrar yerleştirilir. Aynı şekilde diğer taraf vazovazostomisi de yapılır. Her iki tarafın vaz deferensine reanastomoz yapıldıktan sonra skrotum katları dren konulmadan kapatılır[46].

İki tabaka vazovazostomi (Microdot tekniği)

Bu teknikte ilk aşama olarak hastanın ve vazın hazırlanması modifiye tek tabaka vazovazostomide olduğu gibidir. Vaz deferenslerin her iki ucu bulunup, serbestleştirildikten sonra mikro işaretleme kalemi ile lümen etrafına radiyar tarzda 6-8 adet işaret konur. Vaz deferens uçları vaz klibi ile tespit edilir ve birbirine aynı hizada yaklaştırılır. Çift iğneli 10/0 prolen suturlar lümenden girilerek işaretlerin olduğu yerden dışarıya çıkarılır. Vazın anterior tarafına üç yada dört sutur atılır ve sonra anterior anastomozu güven altına almak için serozaya 8/0 prolen ile iki adet sutur yerleştirilir. Daha sonra klip ve vaz 180 derece döndürülür, 10/0 prolen ile üç yada dört sutur daha mukozal anastomozu tamamlamak için konur. Ardından 8/0 prolen ile serozaya üç yada dört sutur konularak vazal anastomoz tamamlanır. Çift iğneli mukozal sutur kullanılması arka tarafta mukozal duvar oluşum riskini azaltır. Vazal kılıf 4/0 yada 5/0 krome katküt yada vikril ile sağlamlaştırıldıktan sonra skrotum kapatılır. Dren, sadece geniş bir diseksiyon yapıldıysa konur.

Her iki tekniğin savunucuları olsa da, sonuçları benzerdir, spermin ejekülatta görülme olasılığı %80-90, gebelik oranları ise %50-65 olarak verilmektedir[46,47]. Ejekülattaki sperm sayısı normal seviyelerine gelmese de ise intrauterin inseminasyon (IUI) ve ICSI için bu sayı yeterlidir.

Vazoepididimostomi

Distal epididimde obstrüksiyon olduğu durumlarda obstrüksiyonun üstündeki seviyeden vazoepididimostomi yapılmalıdır. Testis ve vaz mobilize edildikten ve epididim obstrüksiyonu teyid edildikten sonra operasyon mikroskopu ile dilate epididim tubulleri görülür. Nadiren epididim obstrüksiyonunun olduğu alan görülebilir. Gerilimsiz bir anastomoz yapabilmek için vazın epididimde anastomoz yapılacak proksimal kesimine kadar rahatça ulaştığından emin olunmalıdır. Vazdan epididimin istmusunu ve globus minörü mobilize etmek ilave bir uzunluk sağlayabilir.

Epididimi saran tunika açılır ve dilate bir epididim tübülü kibar bir şekilde mikromakaslarla mobilize edilir. Proksimal tübüllerden birine küçük bir insizyon yapılır ve mikroskop altında normal görünen sperm varlığını tespit etmek için sıvı alınır. 9/0 yada 10/0 prolen ile dört yada beş suturla gerilimsiz bir uç-yan anastomoz yapılır. Vazın serozası

epididimin fibröz tunikasına 8/0 yada 9/0 prolenlerle fikse edilerek anastomoz sağlamlaştırılır. Bu işlem yapılırken suturun derin geçilerek epididim lümeninde obstrüksiyon oluşturulmamasına dikkat edilmelidir.

Bu işlemlerden sonra testis skrotuma yerleştirilir ve genellikle dren konulmadan skrotum kapatılır. Birçok çalışmalarda spermin ejekülatta görülme oranı %60-85, gebelik oranları ise %30-45 olarak verilmiştir[48].

VAZOVAZOSTOMİYE KARŞI ICSI

Tedavide, vazovazostomi yada ICSI seçimi, vazektomiden itibaren geçen zaman, maternal yaş ve çiftlerin sağlık durumları göz önünde bulundurularak yapılır. Birden fazla çocuk sahibi olmak isteyen genç çiftler için vazovazostomi daha uygun bir seçenektir. Eğer başarılı olursa vazovazostomi, gebelik başına ICSI'den çok daha ucuz bir tedavi şekli olacaktır. Ancak bu karar, kadının fertilite durumunun normal olduğu ve menapozun yakın olmadığı durumlarda verilmelidir[49].

Kadının premenapozal döneminin başlamadan önce gebelik ihtimalinin azaldığı durumlar olan 30'lu yaşlarının sonlarında yada 40'lı yaşlarının başlarında ICSI tercih edilmelidir. Anamnezinde jinekolojik, endokrinolojik hastalığı, endometriozisi, anatomik anormallikleri, cerrahi yada pelvik inflamasyonu bulunan çiftlerde, TESA veya mikrocerrahi ile epididimal sperm aspirasyonu (MESA) ile ICSI yapmak, vazovazostomiden daha mantıklı bir seçenektir[49,50].

Genç çiftler yada vazovazostominin başarısız olduğu seçilmiş çiftler için tekrar vazovazostomi yada vazoepididimostomi yapmak kabul edilebilir başarı oranlarına sahiptir ve ICSI'den daha ucuzdur[50,51].

DİĞER BÖLGE OBSTRÜKSİYONLARI

Semen analizi sonuçları, obstrüksiyonun yerine göre değişkenlik gösterir. Düşük hacimli, asidik ve fruktoz negatif semen örneği komplet ejekülator kanal obstrüksiyonu (EDO) olan erkeklerde görülür. Vaz deferens yada epididim obstrüksiyonunda normal hacimli, bazik ve fruktoz pozitif semen örneği elde edilir. İnfertilite sebebinin sadece obstrüksiyon olduğu vakalarda normal testosteron ve FSH tespit edilir. Ejekülatuar kanal obstrüksiyonundan şüphe edildiği zaman radyolojik çalışmalar da yapılmalıdır. Transrektal ultrasonografi (TRUS) kistik kitleler yada taşın sebep olduğu obstrüksiyondan dolayı dilate ejekülatör kanal ve seminal vezikülleri göstererek EDO tanısını destekler. TRUS yapılırken dilate seminal veziküllerden yapılan aspirasyonda sayısız sperm görülmesi EDO varlığının diğer bir delilidir. TRUS'da seminal veziküllerin görülmemesi yada hipoplazik görülmesi CBAVD lehine bir bulgudur. Eğer vaz deferens obstrüksiyonundan şüpheleniliyor ise skrotal eksplorasyon esnasında vazogram tanıyı koydurur aynı zamanda obstrüksiyonun yerini de gösterir. Vazografi esnasında vaz deferensin abdominal tarafından 1/0 prolen vazın içerisinden gönderilerek vazostomiden obstrüksiyona kadar olan gerçek mesafe ölçülür. EDO tedavisi için ejekülator kanallara transüretral rezeksiyon (TURED) yapılır. EDO'su olan ve TURED yapılan erkeklerin yarısının semen parametrelerinde düzelme olur ve neticede bu hastaların da yarısının eşlerinde gebelik meydana gelir[52]. Epididimde veya vaz deferensde obstrüksiyonu olan erkekler, doğal konsepsiyon için mikrocerrahi ile yapılan rekonstrüksiyona aday hastalardır. Bu grup hastalardan MESA ile elde edilen spermle IVF/ICSI'de yapılabilir.

Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu

Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu (CBAVD), ekstratestiküler duktal sistemin en sık görülen konjenital obstrüksiyonudur. İnfertil erkeklerin %1-2'sinde bu hastalık görülmektedir. CBAVD, otozomal resesif geçişli bir hastalık olan ve beyaz ırkın 1/25'inin taşıyıcı olduğu kistik fibrozisin (CF) fenotipik spektromunun bir parçasıdır[53]. CF, kistik fibrozis transmembran iletim düzenleyici genin (CFTR) genetik mutasyonu sonucu meydana gelir. CFTR geni büyük bir gendir (250 000 baz çifti) ve bu güne kadar 1000'den fazla CFTR geni mutasyonu gösterilmiştir. Vaz deferenslerin olmayışı, hipoplastik nonfonksiyonel seminal veziküller ve ejekülator kanallar, sadece kaput bölgesi bulunan küçük, yumuşak bir epididim artığı, CBAVD'si olan erkeklerin karakteristik özellikleridir[54].

En sık görülen pleomorfizmi (5T) değerlendirmek için yapılan kistik fibrozis gen analizi, yanlış negetif sonuçları yüksek olan ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak uygulanan bir test değildir. CBAVD'li hastalarda çok değişik mutasyonlar olduğundan ve tek hastada tüm mutasyonları tespit etmenin zorluğundan dolayı, CBAVD'li tüm hastalar kistik fibrozisin bir genetik formu gibi düşünülür[54]. İdiyopatik epididimal obstruksiyonu olan erkeklerde CF mutasyon insidansının attığı bulunmuştur. Bu erkeklere MESA/TESA veya rekonstrüksiyondan önce CF testi de yapılmalıdır. Unilateral vaz deferens yokluğu olan hastalar da risk grubunda olduklarından CFTR gen analizi bu gruba da yapılmalıdır. Bununla beraber unilateral vaz deferens yokluğu ve karşı taraf soliter böbreği olan hastalarda ise farklı bir konjenital anomali mevcuttur.

TESTİS BİYOPSİSİ

Testis biyopsisi tanısal amaçlı yapıldığı gibi tübüler doku alınarak ICSI için sperm de temin edilir. Genellikle korda lokal anestezi ile blokaj yapıldıktan sonra ofis şartlarında uygulanabilen bir prosedürdür. Tanı için prostat biyopsisinde kullanılan yaylı kurma sistemi ve ateşleme mandalı olan otomatik biyopsi iğneleri kullanılabilir.

Daha fazla miktarda tubuler doku gerekli olduğu zaman açık testis biyopsisi yapılmalıdır. Spermatik kord blokajı %2'lik lidokainle yada %0.5'lik bupivakainle yapılır ve testisi örten cilde de lokal anestetik madde enjekte edilir. 4/0 vikril askı için skrotuma medial olarak yerleştirilir ve skrotuma 1.5 cm lik bir insizyon yapılarak testisin tunika albugineasına ulaşılır. İkinci bir 4/0 vikril tunika albugineaya askı suturu olarak yerleştirildikten sonra tunikaya 4-5 mm lik bir insizyon yapılır. Mikromakasla 0.1 ml büyüklüğünde spermatik tübüler doku alınır ve serum fizyolojik emdirilmiş filtre kağıdı veya embriyologun değerlendirmesi için vasata koyulur. Örnekte yeterli sperm elde edildiği zaman tunikaya daha önce konulan 4/0 askı ile devamlı sutur şeklinde kapatılır. Skrotal ciltte aynı şekilde askı olarak konulan 4/0 vikril ile kapatılır[55].

ICSI için TESE yapılan obstrüktif azospermili erkeklere, ileri dönemlerde kullanılmak üzere testis dokusuna kriyoprezervasyon yapılabileceği teklif edilmelidir.

GELECEKTEKİ TEDAVİLER

Spermatogonyal Kök Hücre Transplantasyonu

Spermatogenez, erkek fertilitesinin temelidir ve birçok faktörden etkilenebilir. Kemoterapi ve radyoterapi spermatogenezi kalıcı veya geçici olarak durdurur, ve spermatogenezin yeniden başlaması için yıllar gerekebilir. Malin hastalıklar için yapılan kemoterapi ve radyoterapinin başarısı ile tedaviden sonraki fertilite durumu önemli bir konu haline gelmiştir. Erkeklerin tedaviden önce sperm dondurma imkanları vardır. Prepubertal erkeklerde bu şans olmadığından, kemoterapi veya radyoterapiden önce gelişebilecek erkek infertilitesi için önleyici tedavi vermek yararlı olabilir. Toksik etki sonrası spermatogenezin tekrar başlatılması için yeni metodlar geliştirilmektedir. Steril ratlara spermatogonyal kök hücre transplantasyonu yapılmıştır. Bu işlemde donor spermatogonyal kök hücreler alıcıya verilmiş ve böylece alıcı ratlarda da spermatogenezin başladığı görülmüştür.

Brinster ve arkadaşları 1994 yılında ilk defa başarılı spermatogonyal kök hücre transplantasyonunu bildirdiler[56,57]. İlk olarak, heterojen testis hücre karışımı Escherichia coli beta galaktozidaz geni (LacZ) taşıyan ratlardan toplandı. Bu genin ekspresyonu transplantasyon yapılan ratın spermatogenezinin başlamasını sağlar. Donor testis hücreleri steril ratın (hem sertoli cell only hem de varyant-larına veya busulfan tedavisi almış ratlara) seminifer tübüllerine mikroenjeksiyon ile yerleştirilir. Donor germ hücreleri seminifer tübüllerin luminal kompartmanlarında ilerlerler. Bu mikroenjeksiyondan bir ay sonra alıcı rat testisinde donor kaynaklı spermatogenez başlar ve üç ay sonra da olgun sperm üretemi görülür[58]. Transplantasyon teknikleri zamanla gelişme göstermektedir. Seminifer tübül lümenleri yerine direk olarak rete testislere ve efferent duktuslara mikroenjeksiyon yapmanın daha etkili bir transplantasyon olduğu görülmüştür. Ayrıca düşük testosteron seviyelerinin olduğu durumlarda da transplantasyonun etkinliğinin daha iyi olduğu bildirilmiştir[59]. Bir çalışmaya göre de kriptorşidizmi olan donor kullanmanın transplante hücrelerde spermatogonyal kök hücre popülasyonunu artırdığı görülmüştür[60].

Malinitesi olan fakat fertilitelerini korumak isteyen erkeklerde, kemoterapi veya radyoterapi sonrası transplantasyon için, tedaviden önce hastadan spermatogonyal kök hücre elde edilerek kriyo-

prezervasyon yapılır. Hasta kanser hastalığından tamamen iyileştikten sonra kriyoprezervasyon yapılan bu hücreler ile transplantasyon yapılabilir. Spermatogonyal kök hücre transplantasyonu spermatogenezi ve fertiliteyi yeniden başlatır. Bu alandaki çalışmalar spermatogonyal kök hücrelerin belirlenmesine ve izolasyonlarına odaklanmıştır. Kanser hücrelerinin bulaşma riskinden dolayı prezervasyondan önce kök hücreleri izole edilmelidir. Bu işlem, kemoterapi yada radyoterapiden sonra yapılacak olan transplantasyon ile kanser rekürrensi riskini yok eder. Kök hücre transplantasyon tedavisi ile henüz spermatogenezi başlamamış prepubertal erkeklerin kanserlerinin tedavisinden sonra fertiliteyi sağlamak için de kullanılabilir. Ancak yine de bu tekniklerin insanlarda henüz daha deneysel aşamada oldukları unutulmamalıdır[61].

KAYNAKLAR

1. Poland ML, et al. Variation of semen measures within normal men. Fertil Steril 1985; 44: 396
2. Gorelick J, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocoele. Fertil Steril 1993; 59: 613
3. Palomo A. Radical cure of varicocoele by a new technique: a preliminary report. J Urol 1949; 61: 604
4. Hagood PG, et al. Laparoscopic varicocoelectomy: a preliminary report of a new technique. J Urol 1992; 147: 73
5. Szabo R, Kessler R. Hydrocoele following internal spermatic vein ligation: a retrospective study and review of the literature. J Urol 1984; 132: 924
6. Ivanissevich O. Left varicocoele due to reflux. Experience with 44709 cases in 42 years. J Int Coll Surg 1960; 34: 742
7. Goldstein M, et al. Microsurgical inguinal varicocoelectomy with the delivery of the testis: an artery and lymphatic-sparing technique. J Urol 1992; 148: 1808
8. Marmar JL, DeBenedicds TJ, Praiss D. The management of varicocoeles by microdissection of the spermatic cord at the eksternal inguinal ring. Fertil Steril 1985; 43: 583
9. Madgar I, et al. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. Fertil Steril 1995; 63: 120
10. Kibar Y, Seckin B, Erduran D. The effects of subinguinal varicocelectomy on Kruger morphology and semen parameters. J Urol 2002; 168: 1071
11. Schatte EC, et al. Varicocelectomy improves sperm strict morphology and modlity. J Urol 1998; 160: 1338
12. Vazquez-Levin MH, et al., Response of routine semen analysis and critical assessment of sperm morphology by Kruger classification to therapeutic varicocelectomy. J Urol 1997; 158: 1804
13. Mostafa T, et al. Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. Int JAndrol 2001; 24: 261
14. Kadioglu A, et al. Microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men. Urology 2001; 57: 328
15. Franco B, et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. Nature 1991; 353: 529
16. Bick D, et al. Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. N Engl J Med 1992; 326: 1752
17. Sigman M, La HS. Evaluation of the subfertile male. In Lipshultz LI, Howards SS, eds. Infertility in the Male, 3rd edn. St Louis: Mosby, 1997: 173
18. Weiss J, et al. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. N Engl J Med 1992; 326: 179
19. Wu SM, et al. Luteinizing hormone receptor mutations in disorders of sexual development and cancer. Front Biosci 2000; 5: D343
20. Simoni M, et al. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two disctete FSH receptor isoforms. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 751
21. Griffin JE. Androgen resistance — the clinical and molecular spectrum. N Engl J Med 1992; 326: 611
22. Quigley CA, et al. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. Endocr Rev 1995; 16:271
23- Casella R, et al. Significance of the polyglutamine tract polymorphism in the androgen receptor. Urology 2001; 58: 651
24. Gazvani MR, et al. Conservative management of azoospermia following steroid abuse. Hum Reprod 1997; 12: 1706
25- Menon DK. Successful treatment of anabolic-steroid-induced azoospermia with human chorionic gonadotropin and human menopausal gonadotropin. Fertil Steril 2003; 79 (Suppl 3): 1659
26. Clark R, Sherins R. Treatment of men with idiopathic oligozoospermic infertility using the aromatase inhibitor, testolactone: results of a double-blinded, randomized placebo-controlled trial with cross over. J Androl 1989; 10: 69
27. Pavlovich CP, et al. Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. J Urol 2001; 165: 837
28. Vandekerckhove P, Lilford R, Vail A, et al. Clomiphene or tamoxifen for idiopathic oligo/ asthenospermia. Cochrane Database Syst Rev 2003; (2): CD000151
29. Gilbaugh JH III, Lipshultz, LI. Nonsurgical treatment of male infertility. Urol Clin North Am 1994; 21: 531
30. Villumsen AL, Zachau-Christiansen B. Spontaneous alterations in posirion of the testes. Arch Dis Child 1966; 41: 198
31. Lynch DF, Brock WA, Kaplan GW. Orchiopcxy: experiences at 2 centers. Urology 1982; 19: 507
32. Leissner J, et al. The undescended testis: considerations and impact on fertility. Br J Urol Int 1999; 83: 885
33. Bevan AD. The surgical treatment of undescended testicle: a further contribution. JAMA 1903; 41:718
34. Kleinteich B, et al. Kongenitole Hodendiptopien. Stuttgart: George Thieme, 1979
35. Lattimer JK. Scrotal pouch technique for orchiopexy. JUrol 1957; 78: 628
36. Fowler R, Stephens FD. The role of testicular vascular anatomy in the salvage of high undescended testes. AustNZJSurgl959;29:92
37. Frey P, Bianchi A. Microvascular autotransplantation of intra-abdominal testes. Prog Pediatr Surg 1989; 23: 115
38. Kamischke A, Nieschlag E. Treatment of retrograde ejaculation and an ejaculation. Hum Reprod Update 1999; 5:448

39. Shaban SFE, et al. Treatment of abnormalities of ejaculation. In Lipschultz LI, Howards SS, eds. Infertility in the Male, 3rd edn. St Louis: Mosby, 1997: 423
40. Brindley *GS.* Reflex ejaculation under vibratory stimulation in paraplegic men. Paraplegia. 1981; 19:299-302
41. Bird VG, et al. Reflexes and somatic responses as predictors of ejaculation by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injury. Spinal Cord 2001; 39: 514
42. Sonksen J, Bienng-Sorensen F, Kristensen JK. Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries. The importance of the vibratory amplitude. Paraplegia 1994; 32: 651
43. Giovannucci E, et al. A prostate cohort study of vasectomy and prostate cancer in US men. JAMA 1993; 269: 873.
44. Li S, et al. The no-scalpel vasectomy. J Urol 1991; 145:341
45. Belker AM, et al. Results of 1469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. J Urol 1991; 145: 505
46. Silber SJ. Microscopic vasectomy reversal. Fertil Steril 1977; 28: 1191
47. Owen ER. Microsurgical vasovasostomy: a reliable vasectomy reversal. Aust NZ J Surg 1977; 47: 305
48. Thomas AJ. Vasoepididymostomy. Atlas Urol Clin North Am 1999; 7: 65
49. Pavlovich CP, Schlegel PN. Fertility options after vasectomy: a cost-effectiveness analysis. Fertil Steril 1997; 67: 133
50. Callahan TL, et al. The economic impact of multiple gestation pregnancies and the contribution of assisted reproduction techniques to their incidence. N Engl J Med 1994; 331: 244
51. Donovan JF, et al. Comparison of microscopic epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection/in-vitro fertilization with repeat microscopic reconstruction following vasectomy. Hum Reprod 1998; 13:387
52. Schlegel P Management of ejaculatery duct obstruction. In, Lipschultz LI, Howards SS, eds. Infertility in the Male 3rd edn. St Louis: Mosby, 1997: 385
53. Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. J Endocrinol Invest 2000; 23: 684
54. Daudin M, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. Fertil Steril 2000; 74: 1164
55. Sigman M. Testis biopsy. Atlas Urol Clin North Am 1999; 7: 21
56. Brinster RL, Zimmerman JW. Spermatogenesis following male germ cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 11298
57. Brinster RL, Avarbock MR, Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial ttansplantation. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 11303
58. Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. Biol Reprod 1999; 60: 1429
59. Ogawa T, Dobinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Leu pro I id e, a gonadotropin-releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. Tissue Cell 1998; 30: 583
60. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. Dev Biol 2000; 220: 401
61. Oehninger S. Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors. J Soc Gynecol Invest 2005; 12: 222

23

Erkek İnfertilitesinin Medikal Tedavisi

Gerhard Haidl

Çeviri: *Mete Kilciler*[*]

GİRİŞ

Erkek infertilitesinin ciddi bozukluklarında modern yardımcı üreme teknikleri önemli bir rol oynamasına rağmen bu metotlar her infertil çifte uygulanamaz. Kesin diagnostik ölçütlere dayanarak konservatif medikal tedavi modaliteleri yalnız olarak ya da bazen cerrahi prosedürlerle kombine olarak ve intrauterin inseminasyon olarak adlandırılan yardımcı üreme tekniklerinin en basit formu ile uygulanabilir. Herhangi bir tedaviye başlamadan önce doğru tanı ortaya konulmalıdır. Ayrıca, sıklıkla birçok faktörlerin bozulmuş erkek fertilizasyonuna katkıda bulunabileceği ve erkek infertilite bozukluğunun ciddiyetinin derecesinin değişebileceği düşünülmelidir. Bazı hastalarda, zararlı etkili bir faktör ortadan kaldırılabilir ve böylelikle spermatogenez iyileştirilebilir. Diğer hastalarda ise durumun ciddiyetinden dolayı hasar onarılamayabilir. Bu şartların ışığı altında, bu bölümde erkek infertilitesinin spesifik durumlarında uygulanacak güncel medikal tedavi seçenekleri ve gerekli öneriler tartışılmış ve diğer bazı durumlar ise sıklıkla deneysel olarak kalmıştır.

SPESİFİK TEDAVİ

Hormon replasmanı

Gonadotropinler

Hipogonadotropik hipogonadizm hastalarının androlojide kabul edilen tedavi şekli hormonal replasmandır. Düşük gonadotropin düzeylerine sahip hastalara yüksek düzeyde arıtılmış rekombinant folikül stimüle edici hormon (FSH) veya insan karyonik gonadotropini (hCG) de mevcuttur, fakat klinik çalışmalar göstermiştir ki rekombinant hCG etkin olarak kullanılabilmesine rağmen rekombinant LH'nın kısa yarı ömrü nedeni ile erkekteki kullanımı hormon replasmanına uygun değildir.

Alternatif olarak, gonadotropin salıcı hormon (GnRH) da kullanılabilir. Eğer gebelik istenmiyorsa, tedavi sadece testosteron ile olur. hCG'nin dozu haftada iki ya da üç kez intramusküler (IM) ya da subkutan (SC) olarak 1000-2500 IU'tir. Çocuk sahibi olmak isteyen hipogonadotropik hipogonadizmli hastalarda insan menopozal gonadotropin (hMG) IM veya SC olarak; yüksek düzeyde arıtılmış rekombinant FSH ile haftada üç kez 75,100 veya

[*] GATA Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.

150 IU şeklinde SC olarak uygulanabilir. Eğer hipogonadotropik hipogonadizm uzun süreli olarak gonadotropinler ile tedavi edilmediyse ya da hasta daha önceden sadece testosteron almışsa, hastanın kendi testosteron üretimini stimüle etmek için öncelikli olarak 4-6 hafta boyunca hCG monoterapisine başlanır, daha sonra hMG eklenir. Hastaların %90'ından fazlasında spermatogenezin başlamış olduğu gözlenir. Bu ortalama olarak spermatozoanın ejekulatta görünmesinden önceki 6-9 aylık zamanı alır ve bazı hastalarda bu süre uzayabilir[1-3].

GnRH

GnRH, hCG/hMG kombinasyonuna veya FSH tedavisine alternatif olarak uygulanabilir. Yaklaşık olarak 50 ng GnRH/kg olarak vücut ağırlığına göre her iki saatte bir pulsatil subkutanöz uygulanması tavsiye edilir. Bu tedavinin endikasyonları arasında tersiyer hipogonadotropik hipogonadizm (örneğin Kallmann sendromu) veya idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm vardır. Tedaviden sonra normal serum testosteron seviyelerindeki gibi testiküler volümde de bir artış görülebilir. Buna rağmen, normal semen parametreleri çok nadiren elde edilir. Bazen spermatogenezi olan ve yüksek FSH seviyelerine sahip hastalarda, GnRH, hCG ve hMG kombinasyonu etkili değildir[1-3,4].

Androjenler

Androjenler, hipogonadotropik hipogonadizmli hastalarda testosteron yetmezliğinin düzeltilmesinde kullanılır. Testosteron yetmezliği IM testosteron enenthate ile her 3-4 haftada bir 250 mg olarak ya da IM 1000 mg testosteron undecanoate ile 12 haftalık aralıklarla uygulama yapılabilir. Bu uygulamalarda testosteron undecanoate serum testosteron düzeyini normal seviyesinde tutarken testosteron enenthate'ın enjeksiyonun uygulanmasının ilk gününden itibaren testosteronu suprafizyolojik düzeylere çıkarır. Testosteron undecanoate'ın günlük 120-160 mg.lık oral alımı absorbsiyon problemleri yapabilir. Bu preparatların kutanöz formları da vardır. Öncelikle 10 veya 15 mg doğal testosteron içeren film kaplı trans-skrotal bantlar geliştirildi. Bu bantlar ile normal diurnal varyasyonlardaki serum testosteron düzeylerine yakın seviyeler elde edilmesine rağmen bantların skrotal ciltte uzun süre kalmayışı ve kullanım zorluğu insanları yeni arayışlara itmiştir. Böylelikle araştırmalar fizyolojik serum düzeylerine ulaşan skrotum dışı transdermal sistemlere doğru kaymıştır.

Testosteron bantlarının içinde bulunan ve absorbsiyonu kolaylaştıran maddelerin hastaların birçoğunda deri irritasyonlarına sebep olması nedeni ile testosteron tedavisinin bu formları kullanılmama aşamasına gelmiştir. Üstelik bu testosteron bantlarının kullanımı manuel iş yapan işçiler ve sıcak iklimlerde yaşayanlar için pratik ve kullanışlı değildir. Androjen replasman tedavisindeki en son gelişme 2,5 ya da 5 gram jel içindeki 25 veya 50 mg testosteron içeren preparatlarıdır. Çalışmalar bu formların iyi klinik etkiye ve tolerabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca testosteron küçük topakçıklar ve mikrokapsüller şeklinde subdermal olarak ve bukkal mukoza yoluyla da uygulanabilir. Testosteron hipogonadotropik hipogonadizm tedavisinde etkili olarak kullanılmasına rağmen (spermatogenezi başlatmak için kullanılmamasına rağmen) idiyopatik erkek infertilitesi tedavisindeki kullanımında yapılan kontrollü çalışmalarda gebelik oranlarını arttırdığı gösterilememiştir[5]. Bununla birlikte, son günlerde yapılan çalışmalarda tamoksifen ve testosteron undecanoate'ın kombinasyonu ile sperm kalitesinde olduğu gibi gebelik oranlarında da belirgin olumlu gelişmelerin gözlendiği rapor edilmiştir.

Emisyon ve ejekülatuar bozukluklarının tedavisi

Hormonal yetmezlikli hastalardaki hormon replasman tedavisinden farklı olarak, emisyon ve ejekülatuar bozukluğu olan hastalarda etkili tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Retrograd ejekülasyon veya emisyon yetmezliğine sekonder transport aspermisinde (örneğin retroperitoneal lenfadenektomi ya da diabetes mellitusta olduğu gibi) α-sempatomimetik ve antikolinerjik tedavi oldukça yararlıdır. Retrograd ejekülasyonun medikal tedavisi hastaya sadece doğal yollardan çocuk sahibi olabilme imkanını vermez, aynı zamanda elektrovibratör stimülasyon, idrardan sperm elde etme ve cerrahi prosedürlerle karşılaştırıldığında en az invaziv ve bu hastalar için ilk seçenek tedavi yöntemidir.

Retrograd ejekülasyon tedavisinde en sıklıkla önerilen ilaç imipramindir[6]. Buna ek olarak klorfeniramin, fenilpropanolamin ve midodrin kombinasyonu da kullanılabilir[7-8]. Özellikle diabetik hastalardaki retrograd ejekülasyonda bromfeniramin ile iyi sonuçların olduğu bildirilmiştir[9]. Son zamanlarda retrograd ejekülasyonun bir ampül oral amezinium ile başarılı olarak tedavi edildiği de bil-

dirilmiştir[10]. Tavsiye edilen dozlar midodrin için intravenöz olarak (preparatın bu formu artık mevcut değildir) 5-15 mg ya da ejekülasyondan hemen önce oral kullanılan tanecikler halinde tek dozdur. Uzun süreli kullanımlar için 25-75 mg oral imipramin ya da günde üç kez kullanılan 8 mg bromfeniramin, 10 mg amezinium ve 50 mg/gün olarak klorfeniramin ve fenil propanolamin vardır. Tedavinin süresi bireye göre belirlenmektedir.

Anti-enfeksiyöz tedavi

Antibakteriyel ajanlar duyarlılık testlerine göre adneksit (prostatit ve vezikülit) tedavisinde kullanılırlar. Mikrobiyolojik bulgulara göre, şu ajanlar en çok kullanılanlarıdır: doksisiklin 200 mg/gün, tetrasiklin 1,5-2 g/gün, florokinolonlar (ofloksasin, norfloksasin, ciprofloksasin, levofloksasin 0,5-1g/gün vb.), kotrimaksazol (sulfamethaksazol 800 mg, trimetoprim 160 mg) veya eritromisin 5-2 g/gün gibi makrolidler. Bu ilaçlar 2-3 hafta boyunca kullanılırlar. Erkek aksesuar bezlerinin enfeksiyonunun tedavisindeki amaç, prostat sekresyonlarındaki mikroorganizmaların sayısının azaltılması ya da tamamen yok edilmesi ve seminal sıvıdaki granülosit elastaz gibi biyokimyasal belirteçler ile lökositler gibi inflamatuar parametrelerin normale dönüştürülerek sperm fonksiyonlarında gelişme sağlamaktır. Bu nedenle, bu konuda yapılan birçok çalışmalar antibakteriyel tedavinin genital sistem enfeksiyonu bulunan hastalarda enfeksiyöz ajanları azaltmakta etkili olduğunu ortaya koymuştur. Fakat bu gebelik oranlarını arttırmada gerekli değildir[11].

DENEYSEL TEDAVİ

Antiöstrojenler

Şimdiye kadarki bölümde spesifik durumlara göre endikasyonlar ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi tartışıldığı halde aslında erkek fertilite bozukluklarının büyük bir bölümü idiyopatik olarak sınıflandırılmaktadır. Bu nedenle, bu vakalarda asıl tedavi belirli değildir ve sonuç olarak deneysel tedaviler uygulanmaktadır. Deneysel tedaviler başarısız da değildir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) idiyopatik oligozoospermi tedavisi için antiöstrojenleri, özellikle de tamoksifeni önermektedir[12] ve Avrupa Üroloji Derneği (EAU) tarafından basılan yayınlarda idiyopatik fertilite bozuklukları[13] gibi sınırlı endikasyonlarla tek tedavi seçeneği olarak tamoksifeni tavsiye etmektedir (Tablo 23.1).

Eğer serum FSH'ı yüksek değilse, tamoksifen 20 mg olarak verilebilir. Yapılan çeşitli çift kör, plasebo kontrollü çalışmalarda sperm konsantrasyonunda ve gebelik ihtimalinde belirgin bir artış saptanmasına rağmen meta analizlerde dikkat çekici bir etki bulunmamıştır[14]. Son zamanlarda yapılan diğer bir çift kör, plasebo kontrollü çalışmada ise 121 infertil erkek androjen ve antiöstrojen tedavisini kombine uygulayarak plasebo veya 20 mg tamoksifen ile 120 mg testosteron undecanoate'ı 6 ay boyunca kullanmışlardır. Tamoksifen ve testosteron undecanoate kombinasyonunun tedavisinden sonra semen kalitesi ve gebelik oranlarında sırası ile %33,9 ve %10,3 oranında önemli bir artış saptanmıştır. Böylece, önceki çalışmalar antiöstrojen-androjen tedavi kombinasyonunun, her iki ilacın ayrı ayrı yalnız olarak ya da plasebo ile kullanılmasına göre daha fazla etkili olduğunu göstermiştir[15-16].

Tablo 23.1: *Avrupa Üroloji Derneği'nin (EAU) idiyopatik oligoastenoteratozoospermi (OAT) sendromu için önerdiği "guideline"*

Hormonal tedavi	**EAU**	**Hormon dışı tedavi**	**EAU**
GnRH	Önerilmiyor	Kallikrein	Sadece klinik araştırma çalışmalarında öneriliyor
hCG/hMG	Önerilmiyor	Bromokriptin	Önerilmiyor
Rekombinant FSH	Önerilmiyor	Antioksidanlar	Sadece klinik araştırma çalışmalarında öneriliyor
Androjenler	Önerilmiyor	α-blokerler	Önerilmiyor
Antiöstrojenler	Sınırlı olarak öneriliyor	Kortikosteroidler	Önerilmiyor

GnRH-gonadotropin salgılayıcı hormon, hCG-insan koryonik gonadotropin, hMG-insan menopozal gonadotropin, FSH-folikül stimüle edici hormon

Tamoksifen tedavisinin özellikle sperm morfolojisi ve motilitesinin ciddi şekilde bozuk olmadığı idiyopatik oligozoospermide uygun olduğu düşünülebilir. Aynı zamanda testosteron undecanoate'ın katkısının potansiyel etkileri ilerideki çalışmalarla desteklenmelidir. Klomifen sitrat, intrinsik östrojenik etkilerinden dolayı önerilmemektedir ve tamoksifen ile karşılaştırıldığında semen kalitesi ve gebelik oranlarında daha düşük oranlarda olumlu etkilere sahiptir[12].

Aromataz inhibitörleri

Testosteronun estradiole ve androstenodionun estrona dönüşümünü engelleyen testosteron aromataz inhibitörleriyle uygulanan tedavi, önceki yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar verdi. Daha öncelerde ise, ciddi fertilite problemleri ve düşük testosteron/estradiol oranları bulunan erkeklerin bir aromataz inhibitörü olan testolaktonun önce 50-100 mg dozunda olmak üzere günde iki kez uygulanması ile sperm sayısında ve motilitesinde artış olduğu gibi hormonal anormalliklerinde de düzelme olduğu gösterildi. Fakat sadece küçük bir çalışma grubu vardı, kontrol grubu yoktu. Aynı değişiklikleri daha fazla selektif aromataz inhibitörü olan 1mg/gün dozundaki anastrazol tedavisinde de elde edildi. Eldeki bu tecrübelere göre, aramotaz inhibitörleri subnormal testosteron ve yüksek estradiol seviyeleri olan hastalarda testiküler testosteron düzeylerini arttırmak için kullanılabilir. Böylece spermatik aktivitede muhtemelen artacaktır[17-18]. Bununla birlikte, erkek infertilitesinin medikal tedavisinin diğer alanlarında olduğu gibi etkinliğini doğrulamak için daha geniş ve randomize, kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

Arıtılmış/rekombinant FSH

İleri derecede bozulmuş fertilizasyonu olan erkeklerde arıtılmış FSH da kullanılmaktadır. Bazı yazarlar bozulmuş sperm yapısı ve sperm fonksiyonlarını düzeltmede günlük 75-150 IU saf FSH'nın en az iki ay boyunca kullanımının uygun olduğunu görmüşlerdir. Ejekulat kalitesinde hiçbir belirgin değişiklik gözlenmemiştir, fakat daha önce yapılan bir in vitro fertilizasyon (IVF) programında başarısız olan erkeklerde fertilizasyon oranları dramatik olarak artmıştır[19].

İntrastoplazmik sperm enjeksiyonundan (ICSI) sonra da yüksek implantasyon oranları elde edilebilirdi[19-21]. Bu gözlem, daha önce yapılan ve erkek partnerlerin idiyopatik oligoastenozoospermi tanısı aldığı ve en az iki başarısız IVF ve intrauterin inseminasyon (IUI) denemesi olan 44 çiftten oluşan bir çalışmadan elde edildi. ICSI tedavisinden önce, çiftlerin 24'ü üç ay boyunca 150 IU arıtılmış FSH aldı ama kontrol grubunu oluşturan 20 çifte verilmedi. Transmisyon elektron mikroskobu, tedaviden sonra sperm kalitesinde önemli bir artış olduğunu ortaya çıkardı. Ayrıca ICSI'den sonraki gebelik oranları arıtılmış FSH verilen grupta %33, verilmeyen grupta ise %20 bulundu ve FSH'nın ICSI'den önceki pozitif etkisi ortaya çıkarıldı[22]. Bir başka çalışmada ise, idiyopatik oligozoospermisi olan (sperm sayısı<10^6/ml, normal plazma FSH ve inhibin B düzeyi) hastalarda üç ay boyunca günlük 100 IU rekombinant FSH uygulanarak testiküler iğne biyopsi aspirasyon sonrası yapılan sitolojik analiz ile sperm parametrelerinde ve hipospermatogeneziste düzelme olduğu gösterildi[23].

Rekombinant FSH kullanımının çalışmalarla doğrulanmaya ihtiyacı olmasına rağmen, yeni yapılan bir prospektif, kontrollü klinik çalışma bu konuda daha fazla kanıt elde edilmesine yardımcı oldu. Foresta ve arkadaşları, erkek idiyopatik infertilite tedavisinin sperm konsantrasyonlarını arttırdığını ve spermatogenetik duraklaması olmayan, normal FSH ve inhibin düzeylerine sahip idiyopatik oligospermisi olan erkeklerden oluşan bir subgrupta gebeliği arttırdığını bildirdiler[24].

Antioksidanlar

Semendeki lökosit ve az bir dereceye kadar da immatür spermatozoa, sperm membranlarını ve DNA'da hasar oluşturan reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturur. Artmış lipid peroksidasyonu membran akışkanlığını azaltır ve bu da sperm motilitesinde azalmaya ve akrozom reaksiyonu gibi önemli fonksiyonların bozulmasına neden olur[25]. Sperm DNA'sının hasarı düşük fertilizasyona ve gebelik oranında azalmaya sebep olur ve bu spermatozoalar ICSI için kullanılırsa muhtemelen genetik olumsuzluklara neden olur. Antioksidan tedavi oksidatif hasarı azaltır ve spermatozoanın fertilizasyon kapasitesini arttırır.

Antioksidatif ajanlar tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), asetilsistein ve glutatyondur[26]. Ayrıca, pentoksifilinin de antioksidatif fonksiyonunun olduğu gösterilmiştir[27].

Tokoferol ile birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Tokoferol, azalmış canlılık ve vitamin yetmezliği tedavisinde kullanılan, yağda çözünen bir vitamindir. Androlojik endikasyonu, serbest oksijen radikallerini temizleyerek sperm membranındaki peroksidasyonu üzerine olan koruyucu etkisidir. Tokoferol (günlük 300-600 mg doz) için androlojik endikasyonlar astenozoospermi ve anormal akrozom reaksiyonunu da içeren sperm disfonksiyonudur[11]. Altı ay boyunca günde üç kez 100 mg tokoferol alan 87 erkek ile yapılan çift-kör, randomize, plasebo kontrollü yapılan bir çalışmada sperm motilitesinin arttığı gözlenmiştir[28]. Ayrıca başka bir çalışma, tokoferolün bir IVF programındaki fertilizasyon oranlarında pozitif bir etkisinin olduğunu ortaya koymuştur[29]. Üç ay boyunca 600 mg/gün tokoferol verilen 30 sağlıklı fakat seminal seminal plazmadaki ROS konsantrasyonu artmış erkekle yapılan diğer bir çift kör, plasebo kontrollü çalışmada ise sperm fonksiyonlarının arttığı (sperm-zona pellusida bağlanma kapasitesi) görülmüştür[30].

Bu iyimser sonuçlar, yüksek doz askorbik asit ve tokoferol alan astenozoospermili veya ılımlı oligoastenozoospermisi olan hastalarda kontrollü bir çalışma yapılarak doğrulanamadı. Semen parametrelerinde hiçbir değişiklik olmadı ve hiçbir gebelik gerçekleşmedi[31]. Oligospermi tanısı almış erkeklerin asetilsistein ve retinol (vitamin A) ile birlikte tokoferol ve esansiyel yağ asitleri ile tedavisi sperm sayısı, akrozom reaksiyonunu arttırdı ve ROS'ta azalmaya neden oldu[32]. Antioksidan tedavi ile ROS'un oluşumunun ve etkilerinin önlenmesi ümit verici bir yaklaşım olarak gözükmektedir. Belki de WHO'e göre kabul edilen varikoseldeki internal spermatik venlerin embolizasyonu, erkek aksesuar bezlerindeki enfeksiyonunun antibiyotik ile tedavisi, idiyopatik oligozoospermideki antiöstrojen tedavisi gibi konvansiyonel yaklaşımlarla birlikte veya onlardan sonra uygulanabilecek tamamlayıcı bir tedavi seçeneği olacaktır[12].

Yapılan bir çift-kör çalışmada infertil erkeklere yukarıda bahsedilen klasik tedaviler uygulandıktan sonra üç ay boyunca ya doğal astaksantin ya da plasebo verildi ve ROS'ta belirgin bir azalma ve spermatozoaların doğrusal progresif motilitesinde artma gözlendi. Aynı zamanda tedavi edilen olgularda zonadan yoksun hamster oositlerine spermatozoaların tutunmasında ve oositleri penetrasyon yüzdelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görüldü. Üç ay sonra gebelik oranları tedavi edilen grupta %23, kontrol grubunda ise %3,6 idi[25]. İyi yürütülen çok merkezli çalışmalar, bu ümit verici yaklaşımı desteklemelidirler.

Karnitinler

Serbest L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondrial ß-oksidasyonunda gereklidir. Yağ asitleri mitokondriye girmek için aktivasyona uğramak zorundadırlar. Bu nedenle koenzim A'ya (CoA) bağlanarak açil-CoA'yı oluştururlar ve internal mitokondrial membranı geçmek için L-karnitini kullanırlar. Açil-karnitinin mitokondriye transferinden sonra, açil grubu mitokondrial CoA'ya transfer edilir; adenozin trifosfat ürünü ile ß-oksidasyon asetil-CoA oluşumuna neden olur. Karnitin aynı zamanda hücre membranı ve DNA'yı ROS tarafından oluşturulan hasara karşı korur[33]. L-karnitin vücutta en yüksek oranda epididimal sıvıda bulunur ve bu da kan serumundaki düzeyinden 2000 kat fazladır.

L-karnitin, in vitro olarak insan sperm motilitesini stimüle ettiği ve oligoastenozoospermili erkeklerde seminal plazmada düşük seviyede bulundukları gösterildiği için, L-karnitin ve L-asetil-karnitin oligoastenoteratozoosperminin seçilmiş bazı formlarında kullanılmaktadır. Fakat gene de şimdiye kadar ki yapılan kontrollü çalışmalarda net bir etki ortaya konulamamıştır. Daha önce yapılıp yayınlanan plasebo-kontrollü, çift-kör, randomize bir çalışmada L-karnitin (2 g/gün) ve L-asetil-karnitin (1 g/gün) kombinasyonu 6 ay boyunca 60 astenozoospermili hastaya uygulandı ve özellikle düşük sperm seviyelerine sahip erkeklerde dikkat çekici bir oranda sperm motilitesini arttırdı[34]. L-karnitin ile yapılan tedavinin temeli antioksidanlar ile aynı olabilir. Gelecekte gebelik oranını inceleyen ve tedavinin sonucu olacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mast hücre blokerleri

Erkek fertilite bozukluklarının mast hücre blokerleri ile tedavi fikri, infertil erkeğin testiküler dokusunda gözlenen artmış sayıda mast hücresinin bulunmasına dayanmaktadır[35]. Mast hücrelerinin artması ve seminifer tübüller ile olan yakın teması, mast hücresi proliferasyonu ile kan-testis bariyeri disfonksiyonu arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir. Histamin ve diğer vazoaktif maddelerin mast hücrelerinden salınımını önleyen mast hücre

stabilizatörleri, idiyopatik fertilite bozukluklarının tedavisinde uygulanmaktadır ve sıkça önerilmektedir. Yapılan bir çalışmada, 17 idiyopatik normogonodotropik oligozoospermili ve idiyopatik astenozoospermisi olan 22 erkeğe üç ay boyunca günde iki kez 1 mg ketotifen verildi. Sperm sayısı ve motilitesinde ılımlı fakat istatistiksel olarak anlamlı bir gelişme gözlendi, fakat gebelik oranı spontan olguların oranının sınırları içerisindeydi[36].

Plasebo kontrollü, randomize, çift-kör bir çalışma ise normal gonodotropin seviyelerine sahip ve sperm sayıları 5 milyon/ml'nin altında olan 50 erkek ile yapıldı ve hastalara bir mast hücre blokeri olan tranilast 300 mg/gün dozunda 3 ay boyunca verildi. Tedavi grubunun sperm dansitesi, motilitesi ve total motil sperm sayısı kontrol grubuna göre oldukça artmış bulunmaktaydı. Üstelik, mast hücresi stabilizatör grubunda gebelik oranı %28.6, plasebo grubunda ise %0 idi[37]. Ebastin ile yapılan daha küçük ve kontrollü olmayan çalışmalarda sperm kalitesinde ve gebelik oranlarında artış elde edildi[38]. Yapılan bu çalışmalar sırasıyla 5 ve 10 yıllık çalışmalar olduğu için bu tedavilerin etkinliğini doğrulama açısından yeni çalışmaların olmaması nedeni ile bu sonuçları yorumlarken dikkatli olunmalıdır. Yine de mast hücre blokerleri ile olan yaklaşım mantıklı gözükmektedir; bu nedenle tanımlanmış seçim kriterleri ile yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır. Belki de triptaz ya da interlökin-6 gibi mast hücre ürünlerinin seminal plazmadaki konsantrasyonları da göz önünde bulundurulmalıdır.

Fosfodiesteraz inhibitörleri

İn vivo ve in vitro araştırmalar göstermiştir ki bir metilksantin türevi olan pentoksifilin spermatozoanın hem motilitesini hem de sayısını arttırabilir. Pentoksifilin, fosfodiesterazı inhibe ederek siklik adenozin monofosfat (cAMP) metabolizması ile etkileşime girerek sperm cAMP'isini arttırır. Tavsiye edilen doz 3-6 ay boyunca günde 3 kez 400-600 mg'dır[11]. İdiyopatik erkek-faktör infertilitesi tedavisinde pentoksifilinin oral kullanımı ile ilgili çalışmaları özetleyen bir yayında, raporların sonuçlarının çelişkili olduğu, yayınlanan verilerin idiyopatik erkek infertilitesinde pentoksifilinin sistemik kullanımının yararlı bir role sahip olduğunu desteklemediği görüşü savunuldu[39]. Erkek infertilitesi tedavisinde birçok diğer ilaçlar da kullanıldığı için, uygun seçim kriterlerini karşılayan prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Antioksidan ve radikalleri temizleme özelliği olduğundan dolayı, pentoksifilinin yukarıdaki bölümde tartışılan endikasyonlardaki kullanımı yararlı olabilir. Son günlerde, erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılan bir ilaç olan ve diğer bir fosfodiesteraz inhibitörü olan sildenafil araştırılmaktadır. Ejekülasyondan 1 saat önce 50 mg sildenafil alımı, tıpkı ejekulatta 8-bromo-siklik guanozin monofosfatın (cGMP) in vitro olarak etkilenmesindeki gibi sperm motilitesini ve zona pellusida'ya bağlanma oranını arttırmaktadır. Bu da fosfodiesteraz inhibitörlerinin sperm motilitesi üzerindeki potansiyel rolünü desteklemektedir[40].

Çinko tuzları

Erkek infertilitesinde sıklıkla kullanılan çinko alımının yararlı etkilerini gösteren kontrollü çalışmalar çok azdır[41]. Bir grup subfertil erkekte olduğu gibi fertil erkeklerde de yapılan çalışmalarda, 26 hafta boyunca çinko sülfat ve folik asitin kombine tedavisinin total normal sperm sayısında dikkat çeken bir artışa neden olduğu gözlendi[42]. Bununla beraber, gebelik oranları ile ilgili yararlı sonuçlar hala saptanamamıştır.

Kallidinogenaz

Renin-anjiotensin sistemi ile birlikte kallikrein-kinin sistemi testiküler fonksiyonların parakrin regülasyonunda bulunmaktadır ve özellikle Sertoli hücresi düzeyinde belirgin miktarda kallidinogenazın oluştuğu gösterilmiştir. Kallidinogenazın ayrıca epididimin epitelyal hücreleri içinde lokalize olduğu gözlendi[43]. Bu nedenle, kallidinogenaz spermatogenezisin modülatör ve mediatörü olarak görüldü, ayrıca idiyopatik oligoastenozoospermili hastalarda bir dekattan fazla kullanılmaktadır[44]. Yararlı etkileri ile ilgili raporlardan sonra bu hastalarda yapılan 2 çift-kör çalışmalar herhangi bir pozitif sonuç ortaya koyamadı[45]. Almanya'da 2001 yılında lisansın uzatılması için başvurulmamasına rağmen ilaç hala bazı ülkelerde bulunmaktadır. Temel araştırmalarda bazı ümit verici sonuçlar bulunmaktadır[46] ; muhtemelen ilerde fazla miktarda ve doğru çalışmalarla bu ilaç için daha iyi tanımlanmış endikasyonlar bulunacaktır. EAU bu ilacın kullanımını sadece kliniksel araştırma çalışmalarında tavsiye etmektedir (bakınız tablo 23.1)

α-Adrenoseptör antagonistleri

İdiyopatik ılımlı oligozoosperminin (sperm sayısı 5-20 milyon/ml arasında) α-adrenoseptör antagonistleri olan bunazosin ile 2 mg/gün dozunda 6 ay boyunca uygulanması sonucunda gebelik oranı %26 bulundu, plasebo grubunda ise bu oran %6,7 de kaldı. Ayrıca, α-adrenoseptör antagonist grubunda daha yüksek düzeyde sperm dansitesi ve total motil sperm sayısı görüldü[47]. Bununla birlikte, çalışmaya katılan hasta sayısı oldukça azdı (n=34) ve bu nedenle bu tür tedaviler büyük gruplarda çalışmalar yapılıp doğrulanmadıkça önerilemez. Testis ve epididimdeki sperm transportu ve depolanması üzerine olan pozitif etki, α-adrenoseptör antagonistlerinin aktivasyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir[47].

İmmunosupresif tedavi

Antisperm antikorlarının tedavisinde çeşitli dozlardaki kortikosteroidler birçok yazarlar tarafından önerilmektedir[48-49]. Bununla birlikte uzmanların belirgin bir çoğunluğu antisperm antikorlara sahip hastalarda kortikosteroidlerin etkinliğini sorgulamışlardır ve sonraki tedavi seçeneği olarak IVF ya da ICSI'i önermişlerdir[50-52]. Yardımcı üreme teknolojisine glukokortikoid tedavisinin eklenmesinin herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir[53-54]. Bunun aksine preoperatif olarak obstrüktif azospermik hastalara prednizolon verildiğinde ICSI'de daha yüksek başarı oranları bildirilmiştir[55]. Buna benzer olarak, sadece IVF uygulamalarla karşılaştırıldığında antisperm antikorlara sahip hastalara IVF ile birlikte immunosupresif tedavi de verildiğinde fertilizasyon oranlarının arttığı ortaya kondu[56]. Bu nedenle, antisperm antikorların kortikosteroidlerle tedavisi genel olarak önerilmemektedir, fakat antisperm antikorları olup daha önce yapılan IVF ya da ICSI'de başarılı olamayıp gebelik elde edilemeyenlerde ya da ICSI tedavisi uygulanamayan ve ICSI tedavisine isteksiz olan hastalarda kortikosteroid tedavisi düşünülmelidir. Kortikosteroid tedavisinin diğer endikasyonları ise sadece testiküler biyopsi ve histolojik inceleme ile tanı konulabilen testisin sessiz inflamatuar hastalıklarıdır[57]. Kabakulak orşiti gibi orşitin akut formlarını takiben fertilizasyonu korumak için interferon-α önerilmektedir.

Antifilojistik tedavi

Testisin ve diğer erkek genital sisteminin kronik inflamasyonları, özellikle epididim de buna dahil olmuşsa sperm kalitesini ciddi şekilde bozan hastalıklardandır. Bu tür durumlarda klinik semptomların sıklıkla olmamasından dolayı tanı koymak zordur. Ejekulattaki peroksidaz-pozitif hücrelerin sayısına ek olarak, granülosit elastaz veya interlökin-6 gibi inflamasyon belirteçleri tanı konmasında yardımcı olmaktadırlar[59]. Antibakteriyel tedavi ile birlikte olan ya da olmayan nonsteroid antifilojistik tedavi lokal oklüzyonları önlemede ve lokal immünolojik fenomeni arttırmak için önerilmektedir[60]. Bu tür inflamatuar olaylara sıklıkla ROS'un yükseliş seviyeleri de eşlik ettiğinden dolayı, antifilojistik tedavi ROS'u ve onun sperm mobilitesi ile özellikle de DNA içeriğine olan zararlı etkilerini azaltmaya yardımcı olabilir[61]. Antienflamatuar tedaviden sonra epididimal çıkış bozukluğunun düzeltilmesi sperm sayısının artmasına sebep olabilir.

Şimdiye kadar prospektif kontrollü çalışmaların olmamasına rağmen, bazı yazarlar diklofenak ve indometazin ile başlangıç çalışmalarındaki tecrübelerini aktarmışlardır[60-62-63]. 10 ciddi oligozoospermili ve inflamatuar olaylara sekonder parsiyel epididimal obstrüksiyonu olan 10 hasta bu tedaviye alındı, bu 20 hastadan 13'ünde sperm sayılarında artış görüldü. Bu 13 hastanın 6'sı da daha önceden azospermik olan hastalardı. Tedavi hastalara 3 ay boyunca günde bir kez 100 mg diklofenak verilerek yapıldı[64]. Buna benzer bir çalışma da yeni bildirildi. Böyle bir antifilojistik tedavi kullanılarak, testiküler sperm ekstraksiyonuna (TESE) gerek kalmayabileceği ve ejekulattaki spermatozoa kullanılarak hastaların ICSI'e yönlendirilebileceği ortaya kondu[65]. Ayrıca prostatoveziküloepididimiti olan ve seminal sıvıda yüksek miktarda lökosit konsantrasyonuna sahip hastalara 2 ay boyunca antifilojistik tedavi olarak 2x100 mg nimesulid, bunu takiben 2 ay boyunca da karnitin verilerek sperm motilite ve canlılığında artış gözlendi[66].

Testisteki inflamatuar reaksiyonları uygun diagnostik seçim kriterleri ile açıklayabilmek için bu ümit verici yaklaşım ile ilgili olarak gelecekte çalışmalar yapılmaya devam edilmelidir. Şimdiye kadar diklofenak için önerilen doz 3-6 hafta boyunca günde 2 kez 50 mg'dır[11].

SONUÇLAR

Bu bölümde bahsedilen tedavi rejimlerinin birçoğu için kontrollü, randomize, prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu probleme rağmen, uzmanların yıllar boyunca kazandığı tecrübeler de göz

ardı edilemez. Kanıta dayalı tıp kriterlerine göre yapılan kontrollü çalışmaların sayısının yeterli miktarda olmaması, daha önceden önerilen bu tedavi rejimlerinin hepsinin önemsiz ve etkisiz olduğunu göstermez. Şimdilik, inflamatuar faktörler gibi bozulmuş erkek infertilitesinin bazı nedenleri sigaranın bırakılması gibi yaşam tarzı değişiklikleri ile önlenebilir. İdiyopatik erkek infertilitesi grubunun birçok çoğunluğu için tamoksifen ile birlikte androjenlerin kombinasyonu önerilebilir ve antioksidan tedavi de bunları tamamlayıcı bir etki yaptığı için tavsiye edilebilir[12-25]. Her iki tedavi seçeneği de yapılacak ilerideki çalışmalarla doğrulanmalıdır. Çünkü androjen tedavisinin yan etkileri çok az değildir. Gelecek için ümit verici bir tedavi seçeneği olan antifilojistik tedavi için yapılan çalışmalar hala devam etmektedir. Ciddi erkek fertilite bozuklukları olan hastalar yardımcı üreme teknikleri ile olan tedavilere yönlendirilmelidirler. Kötü fertilite prognozu olan hastalarda zaman kaybedici tedavilerle vakit kaybedilmemeli ve hasta en uygun şekilde yönlendirilmeli, her durumda androlog ile jinekolog birlikte ve koopere çalışmalıdırlar.

KAYNAKLAR

1. Biichter D, et al. Pulsatile GnRH or human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin as effective treatment for men with hypogonadotrophic hypogonadism: a review of 42 cases. Eur J Endocrinol 1998; 139:298
2. Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E. Recombinant human follicle-stimulating hormone for induction of spermatogenesis in a hypogonadotropic male. Fertit Steril 1995; 63: 1326
3. Schopohl J, et al. Comparison of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin therapy in male patients with idiopathic hypothalamic hypogonadism. Fertil Steril 1991; 56: 1143
4. Knuth UA, et al. Treatment of severe oligospermia with human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin; a placebo-controlled, double blind trial. J Clin Endocrinol Metab 1987; 65: 1081
5. Nieschlag E, Behre HM. Clinical uses of testosterone in hypogonadism and other conditions. In Nieschlag E, Behre HM, eds. Testosterone. Action Deficiency Substitution, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2004: 375
6. Ochsenkiihn R, Kamischke A, Nieschlag E. Imipramine for successful treatment of retrograde ejaculation caused by retroperitoneal surgery. Hum Reprod 1999; 22: 173
7. Kamischke A, Nieschlag E. Update on medical treatment of ejaculatory disorders. Rev Int J Androl 2002; 25: 333
8. Kohn EM, Schill W-B. The alpha-sympathomimetic drug midodrin as a tool for diagnosis and treatment of sperm transport disturbances. Andrologia 1994; 26: 283
9. Schill W-B. Pregnancy after brompheniramine treatment of a diabetic with incomplete emission failure. Arch Androl 1990; 25: 101
10. Ichiyanagi O, et al. Successful treatment of retrograde ejaculation with amezinium. Arch Androl 2003; 49: 215
11. Haidl G. Management strategies for male factor infertility. Drugs 2002; 62: 1741
12. Rowe PJ, et al. WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. Cambridge: Cambridge University Press, 2000
13. Weidner W, et al.; EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. Eur Urol2002;42:313
14. Liu PY, Handelsman DJ. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. Hum Reprod Update 2003; 9: 9

15. Adamopoulos DA, et al. The combination of testosterone undecanoate with tamoxifen citrate enhances the effects of each agent given independently on seminal parameters in men with oligozoospermia. Fertil Steril 1997;67:756
16. Adamopoulos DA, et al. Effectiveness of combined tamoxifen citrate and testosterone undecanoate treatment in men with idiopathic oligozoospermia. Fertil Steril 2003; 80: 914
17- Pavlovich CP, et al. Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. J Uroi 2001; 165: 837
18. Raman JD, Schlegel PN. Aromatase inhibitors for male infertility. J Urol 2002; 167: 624
19. Acosta AA, Khalifa E, Oehninger S. Pure human follicle stimulating hormone has a role in the treatment of severe male infertility by assisted reproduction: Norfolk's total experience. Hum Reprod 1992; 7: 1067
20. Ashkenazi J, et al. The role of purified follicle stimulating hormone therapy in the male partner before intracytopSasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 72: 670
21. Ben-Rafael Z, et al. Follicle-stimulating hormone treatment for men with idiopathic oligoteratoasthenozoospermia before in vitro fertilization: the impact on sperm microstructure and fertilization potential. Fertil Steril 2000; 73: 24
22. Baccetti B, et al. Effect of follicle-stimulating hormone on sperm quality and pregnancy rate. Asian J Androl 2004; 6: 133
23. Foresta C, et al. Use of recombinant follicle-stimulating hormone in the treatment of male factor infertility. Fertil Steril 2002; 77: 238
24. Foresta C, et al. Treatment of male idiopathic infertility with recombinant human follicle-stimulating hormone: a prospective, controlled, randomized clinicai study. Fertil Steril 2005; 84: 654
25. Comhaire F, et al. Factors affecting male fertility. In De Vriese SR, Christophe AB, eds. Male Fertility and Lipid Metabolism. Champaign, IL: AOCS Press, 2003: 1
26. Lenzi A, et al. Placebo controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Hum Reprod 1993; 8: 1657
27. Bhat VB, Madyastha KM. Andoxidant and radical scavenging properties of8-oxo derivatives of xanthine drugs pentoxifylline and lysofyllme. Biochem Biophys Res Commun 2001; 288: 1212
28. Suleiman SA, et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin £. J Androl 1996; 17: 530
29. Geva E, et al. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 1996; 66:430
30. Kessopoulou E, et al. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated with male infertility. Fertil Steril 1995; 64: 825
31. Rolf C, et al. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. Hum Reprod 1999; 14: 1028
32. Comhaire F, et al. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2000; 63: 159
33. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. Hum Reprod Update 1996; 2: 87
34. Lenzi A, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. Fertil Steril 2004; 81: 1578
35. Maseld Y, et al. Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. Fertil Steril 1981; 36: 814
36. Schill W-B, Schneider J, Ring J. The use of ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligo- and asthenozoospermia. Andrologia 1986; 18: 570
37. Yamamoto M, Hibi H, Miyake K. New treatment of idiopathic severe oligozoospermia with mast cell blocker: results of a single-blind study. Fertil Steril 1995; 64: 1221
38. Matsuki S, Sasagawa I, Suzuki Y, et al. The use of ebastine, a mast cell blocker, for treatment of oligozoospermia. Arch Androl 2000; 44: 129
39. Tournaye H, van Steirteghem AC, Devroey P. Penroxifylline in idiopathic male-factor infertility: a review of its therapeutic efficacy after oral administration. Hum Reprod 1994; 9: 996
40. Du Plessis SS, de Jongh PS, Franken DR. Effect of acute in vivo sildenafil and in vitro 8-bromo-cGMP treatments on semen parameters and sperm function. Fertil Steril 2004; 81: 1026
41. Kynaston HG, et al. Changes in seminal quality following oral zinc therapy. Andrologia 1988; 20: 21
42. Wong WY, et al. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Fertil Steril 2002; 77: 491
43. Saitoh S, Kumamoto Y, Ohno K. Studies of kailikrein-kinin system in human male sexual organs. Jpn J Fertil Steril 1985; 30: 276
44. Schill W-B. Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: results of a double-blind study. Arch Androl 1975; 2: 163'
45. Keck C, et a!. Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: a double-blind, randomized placebo-controlled study. Hum Reprod 1994; 9: 325
46. Monsees TK, et al. Tissue kallikrein and bradykinin B2 receptors in the reproductive tract of the male rat. Andrologia2003;35:24

47. Yamamoto M, Hibi H, Mijake K. Comparison of the effectiveness of placebo and alpha-blocker therapy for treatment of idiopathic oligozoospermia. Fertil Steril 1995; 63:396
48. Hendry WF, et al. Comparison of prednisolone and placebo in subfertile men with antibodies to spermatozoa. Lancet 1990; 335: 85
49. Shulman S. Steroids and male immunological infertility. Hum Reprod 1996; 11: 1585
50. Bals-Pratsch M, et al. Cyclic corticosteroid immunosuppression is unsuccessful in the treatment of sperm antibody related male infertility: a controlled study. Hum Reprod 1992; 7: 99
51. Lahteenmaki A, Reima I, Hovatta O. Treatment of severe male immunological infertility by intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1995; 10: 2824
52. Lombardo F, et al. Antisperm immunity in natural and assisted reproduction. Hum Reprod Update 2001; 7: 450
53. Grigoriou O, et al. Corticosteroid treatment does not improve the results of intrauterine insemination in male subfertility caused by antisperm antobodies. Eur J Obster Gynecol Reprod Biol 1996; 65: 227
54. Lahteenmaki A, Rasanen M, Hovatto O. Low-dose prednisolone does not improve the outcome of in-vitro fertilization in male immunological infertility. Hum Reprod 1995; 10: 3124
55. Shin D, et al. Indications for corticosteroid immunosuppression prior to epididymai sperm retrieval. In: J Fertil Womens Med 1998; 43: 165
56. Ulcova-Gallova Z, et al. Effect of corticosteroids on sperm antibody concentration in different biological fluids and on pregnancy outcome in immunologic infertility. Zentralbl Gynaekol 2000; 122: 495
57. Schuppe H-C, et al. Inflammatory reactions in testicular biopsies of infertile men. Andrologia 2005; 37: 188
58. Erpenbach KH. Systemic treatment with interferon-alpha 2B: an effective treatment to prevent sterility after bilateral mumps orchids. J Urol 1991; 146: 54
59. Kopa Z, et al. The rote of granulocyte-elastase and interleukin 6 in the diagnosis of male genital tract inflammation. Andrologia 2005; 37: 188
60. Haidl G. Macrophages in semen are indicative of chronic epididymai infection. Arch Androl 1990; 25: 5
61. Alvarez JG, et al. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril 2002; 78: 319
62. Barkay J, et al. The prostaglandin inhibitor effect of antiinflammatory drugs in the therapy of male infertility. Fertil Steril 1984; 42: 406
63. Moskovitz B, et al. Effects of diclofenac sodium (Voltaren) on spermatogenesis of infertile oligospermic patients. Eur Urol 1988; 14: 395
64. Martin-Du Pan R, Bischof P, de Boccard G, Campana A. Is diclofenac helpful in the diagnosis of partial epididymai obstruction? Hum Reprod 1997; 12: 396
65. Montag M, et al. Recovery of ejaculated spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection after antiinflammatory treatment of an azoosperrnic patient with genital tract infection: a case report. Andrologia 1999; 31: 179
66. Vicari E, Calogero AE. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculoepididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. Fertil Steril 2002; 78: 1203

24

Erkekte Ürogenital Sistem Enfeksiyonları: Tanı ve Tedavi

Frank H. Comhaire, Ahmed MA Mahmoud

Çeviri: *Mehmet Öder*[*], *Halil İbrahim Çam*[**]

GİRİŞ

Üriner sistem enfeksiyonları erkeklerde yaygındır[1] ve infertiliteyle ilgili çalışan klinisyenler bu tip hastalıklarla sık karşılaşırlar. Enfeksiyonlar fertiliteyi etkileyen ya önemsiz üriner bakteriler veya cinsel yolla geçen patojenlerin sebep olduğu sistoüretritleri ya da, prostatoveziküloepididimitleri içerir.

Enfeksiyon ve infertilite arasındaki muhtemel ilişki 1970'lerin ikinci yarısından bu yana tartışma konusu olmuş ve o zamandan beri çeşitli tedavi denemelerine başlanmıştır. Enfeksiyon ilişkili infertilite kriterleri Dünya Sağlık Örgütü kılavuzlarında yer almış[3,4] ve son on yılda, enfekte olmuş erkeklerde reprodüktif rahatsızlığın patogenezi ile ilgili çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır.

Erkek fertilitesindeki azalma ile 'yardımcı (aksesuar) seks bezlerinin' enfeksiyonu arasındaki bağlantının anlaşılması bilimsel olarak tespit edilmiştir ve bu konuyla ilgili çeşitli tanısal yöntemler mevcuttur. Ancak fertilite açısından, antibiyotik ile tedavi sonuçları hala yüz güldürücü değildir. Bunun sebebi, kronik enfeksiyon/enflamasyonun neden olduğu fonksiyonel zararlanmanın geri dönüşümsüz olmasıdır. Bu nedenle, esas önemli olan, hem önemsiz hem de seksüel olarak geçen erkek ürogenital sistem enfeksiyonlarından korunma, erken teşhis ve uygun tedavidir.

HASTALIĞIN TANIMLANMASI

Semen klasifikasyonu azoospermi veya anormal spermatozoa ise ve bunun, ürogenital sistemin enflamatuar hastalığı veya aksesuar seks bezlerinin mevcut veya geçirilmiş enfeksiyonu sonucu oluştuğu düşünülüyorsa, erkek aksesuar bez enfeksiyonu (EABE) tanısı konulur[4].

Erkek aksesuar bez enfeksiyon terimi organ-spesifik bir hastalığı belirtmez. Bu terim ne enflamasyon ve enfeksiyon arasında, ne kronik veya rekürren enfeksiyonla akut hastalık arasında ne de epididimit ya da prostatit gibi organ-spesifik hastalıklar arasında ayrım yapmaz. EABE terimi çok belirsiz olup, belki de daha spesifik bir terminolojiyle yer değiştirmelidir.

ETYOLOJİ VE FİZYOPATOLOJİ

Yardımcı seks bezlerinin enfeksiyonu, ya sözde önemsiz ürolojik patojenlerin ya da seksüel ilişkiyle geçen patojenlerin sebep olduğu, epididimit, vezikülit ve/veya prostatiti içerir. İlk bahsedilen arasında en sık rastlanan patojen *Chlamydia trachomatis*'tir[5] fakat gonokoklara da rastlanabilir. Genelikle tanımlanan ürolojik patojenler, *Escherichia coli*, *Streptococcus* grup D, *Proteus* türleri ve *Klebsiella* türleridir. *Staphylococcus aureus* genellikle bir laboratuar bulaşanı[7] iken

[*] Manisa Devlet Hastanesi, Üroloji Kliniği, Manisa.
[**] Turhal Devlet Hastanesi, Üroloji Kliniği, Turhal, Tokat

koagülaz-negatif Staphylokok'ların rolü belirsizdir[6]. Enfeksiyon enflamasyona sebep olur ve ağrı, şişlik ve bozulmuş fonksiyon gibi klasik semptomlarla karakterizedir. Sonuncusu, spermatozoanın transport ve optimal fonksiyonu için gerekli minerallerin, enzimlerin ve sıvıların sekresyon eksikliğinden sorumludur. Seminal plazmanın anormal biyokimyasal kompozisyonu, seminal volümde azalma, anormal viskosite ve likefaksiyon, anormal pH ve spermatozoanın fonksiyonel kapasitesinin bozulmasıyla sonuçlanır. Bu, tipik olarak zayıf motilite şeklinde ortaya çıkar ve birçok durumda immünolojik infertiliteye sebep olan İmmünglobulin G (IgG) ve/veya IgA sınıfı antisperm antikorlarının bağlanmasıyla ilişkilidir.

Enfeksiyon/enflamasyon sperm duvarının lipid kompozisyonunu değiştiren serbest oksijen radikallerini üreterek[8], spermin bozulmuş akrozom reaktivitesi ve oolemma ile birleşme yeteneğiyle birlikte akışkanlığını ve fusojenik kapasitesini azaltarak[9], peroksidaz pozitif beyaz kan hücrelerinin (iltihap hücreleri) sayısını arttırır. Serbest oksijen radikalleri; Örneğin 8-hidroksi-2-deoksiguanozin ve mutasyonlarının aşırı üretemiyle[10], sperm DNA'sında oksidatif zararlanmaya neden olurlar. Sonuncusu aynı zamanda ilk kez gebelik planlayanlarda aylık gebe kalma oranındaki azalmayla ilişkilidir[11].

Enflamasyon aynı zamanda, daha ilerde sperm fonksiyon ve fertilizasyon kapasitesini bozabilecek[13,14], interlökin-1 (α ve β)[12], interlökin-6[12] ve -8 ve tümör nekroz faktör gibi sitokinlerin yapımını artırır. Epididimin kronik enflamasyonu, parsiyel sperm pasaj obstrüksiyonuyla birlikte oligo- ya da azoospermi[15] ve karşı basınç nedeniyle kan-testis bariyerinin bozulması sonucu antisperm antikorlarına neden olabilir[16].

TANI VE AYIRICI TANI

Oligo- ve/veya astheno-ve/veya teratozoospermi, veya azoospermi gibi anormal sperm kalitesine sahip hastalar aşağıda belirtilen gruplarla kombine anomalilere sahiplerse tanı alırlar[4,17] (tanı kabul edilir):

- Üriner enfeksiyon, epididimit, cinsel yolla bulaşan hastalık hikayesi ve/veya fiziksel bulgular: kalınlaşmış veya hassas epididim, kalınlaşmış vaz deferens, anormal parmakla rektal muayene bulguları;
- Prostat masajı sonrası anormal idrar ve/veya idrarda *C.* trachomatis saptanması;
- Ejakülat anormallikleri:
- Artmış peroksidaz-pozitif beyaz kan hücre sayısı
- Kültürde patojenik bakterilerin anlamlı üremesi
- Anormal viskosite ve/veya anormal biyokimyasal bulgular ve/veya enflamasyon göstergelerinin armış sevileri veya artmış serbest oksijen radikalleri.

Tanı için farklı grupların her birinden iki belirti veya birbirini takiben yapılan iki semen örneklemesinin her birinde en az iki ejekülat belirtisi gerekir. Eğer bakteriler tespit edilmişse, bunlar idrarda ve semende ya da yapılmış her iki semen örneklemesinde tanımlanmalıdır. Seminal plazmada elastaz[19] veya interlökin-6'nın ölçülmesi[18], enflamatuar reaksiyonun veya beyaz kan hücre inflitrasyonunun biyokimyasal belirleyicisi olarak yardımcı olabilir.

Erkek yardımcı seks bezlerinin enfeksiyonu, varikosel[20] (beyaz kan hücrelerinin 300000 gibi seviyelere ulaştığı vakalarda tamamlayıcı zarara sebep olabilir[21]), immünolojik bir faktör[22], veya cinsel veya ejekülasyon bozukluğu gibi diğer hastalıklarla kombine olabilirler. Bu hastalıklar tek başlarına uygun ve yeterli tedavi gerektirirler ve enfeksiyonun tedavisinden sonra fertilite sonuçlarını engelleyebilirler. Diğer taraftan yüksek oranda anormal spermatozoa, tütün içiciliğinden kaynaklanan toksinleri de içeren kimyasal veya çevresel toksinler, viral enfeksiyonlar gibi diğer faktörler, enfeksiyonun tetiklediği enflamasyonda görülenlere benzer immünobiyolojik reaksiyonları başlatabilirler. Buna ek olarak, erkek yardımcı seks bezlerinin enfeksiyonu, kadın eşe olan etkilerinden dolayı çiftlerin fertilitesini düşürür[23].

KLİNİK VE LABORATUAR BULGULAR

Hikaye alınması, kendiliğinden ya da bir üriner antiseptik veya antibiyotik ile kısa süreli tedavi sonrası kaybolmuş, bir veya birkaç dizüri ve/veya pollaküri epizotunu ortaya çıkarır. Ancak hasta geçmişteki herhangibir üriner belirtinin farkında olmayabilir[24]. Hasta, bazen, dolgunluk hissiyle beraber, hafif basınçla şiddetlenen, skrotal ağrı epizotlarından bahseder. Düşük ejekülasyon gücü ve hacmi,

ejekülasyon sırasında veya hemen sonrasında ağrılı hassasiyet veya ejekülatın kan ile boyanması (hematospermi)[25] gibi ejekülasyon belirtileri ortaya çıkabilir. Son olarak, cinsel yakınmalar, libido ve orgazm hassasiyetinin azalmasını veya erektil disfonksiyonu içerir[26].

Klinik muayene skrotal içeriğin, özellikle de epididimler ve vaz deferensin dikkatli palpasyonuna odaklanmalıdır. Hafif basınç sırasında oluşan ağrının yanı sıra herhangi bir şişlik veya nodül varlığı da kaydedilmelidir. Parmakla rektal muayene yapılabilir, fakat transabdominal ve özellikle transrektal ekografi daha anlamlı bilgi verebilir[27].

Kan tahlilleri, beyaz kan hücre sayısında artma, protein elektroforezinde anormal globulin oranları, sedimentasyon oranında artma gibi enfeksiyon belirtileri gösterebilir. Klamidyaya karşı dolaşan antikorlar için spesifik testler ve serumda IgG sınıfı antisperm antikorlarını tespit eden indirekt karma antiglobulin rekasiyonu (SpermMar® test; Fertipro, Beernem, Belgium), erkek infertilitesi için yapılan rutin araştırmaya dahil edilmelidir.

İdrar analizleri bakteriyel enfeksiyonu veya beyaz kan hücrelerinin sayısında artışı ortaya koyabilirler fakat prostat masajı sonrası alınan idrarın analizi amaca daha uygundur[28,29]. C. trachomatis tespiti nükleik asit amplifikasyon metodlarıyla idrarda yapılabilirken semende yapılamaz[30]. Üriner anormallik olmaması, erkek aksesuar bez enfeksiyonunu, özellikle de epididimiti ekarte ettirmez.

Tanıya yönelik esas önemli olan semen analizidir. Deri ve üretradan olabilecek bakteri ve hücre kontaminasyonundan kaçınacak şekilde, ayrıntılı bir anatımla alınmalıdır[31]. Bakterinin tanımlanması ve sayımı için semen kültürü yapıldığında, seminal plazmanın bakteriyostatik kapasitesini, esasen de prostat sıvısını azaltmak için, hazırlık olarak, örneğin dilüsyonu gereklidir[17].

Round hücrelerin sayısı mutlaka hesaplanmalıdır ve bunların, peroksidaz negatif hücreler, büyük oranda spermatogenetik hücreler ve peroksidaz pozitif hücreler (beyaz kan hücreleri) olarak ayrımı yapılmalıdır. Seminal veziküler için fruktoz, prostat için sitrik asit veya γ-glutamiltransferaz (veya kalsiyum veya çinko), epididim için α-glukozidaz (Episcreen®; Fertipro) gibi seks bezlerinin sekresyon belirleyicilerinin ölçümü için seminal plazmanın biokimyasal analizinin yapılması da zorunludur. Son olarak, spermatozoa üzerinde antisperm antikorlarının varlığı, hem IgG hem IgA için direkt karma antiglobulin testleri gibi testler yardımıyla araştırılmalıdır.

TEDAVİ

Enfeksiyonun tedavisi üriner sistem enfeksiyonları için uygulanan tedavi gibi olmalıdır, fakat daha uzun bir süre verilmelidir. Ancak prostatın anormal sekresyonu bu bezde bazik (alkalin) bir ortam oluşmasına sebep olur, bu da doksisilin gibi antibiyotiklerin ortamda yeterince yoğunlaşamayarak etkisiz olmaları anlamına gelir. Üçüncü kuşak kinolonlar, pefloksasin[33], oflaksasin, siprofloksasin[34] ve levofloksasin[35], hem bazik hem de asidik ortamda yoğunlaşabildikleri için hastalanmış prostat ve seminal veziküller içine nüfuz edebilirler. Streptokok enfeksiyon durumunda kinolonlar etkili değildir ve amoksisilin, makrolitler veya sefalosporinlerle tedavi endike olabilir. Güvenilir yazarlar antibiyotik tedavisinin başarı oranını artırmak için sık ejekülasyonu tavsiye etmektedirler[38].

Genellikle bakteriyel infestasyon başarı ile eredike edilebilir fakat aynı veya farklı bir patojenle tekrarlayabilir. Başka bir antibiyotikle daha uzun süreli ikinci bir tedavi eklemek faydalı olabilir. Bakteriler genito üriner sistemden genellikle elimine edilebilirler oysa beyaz kan hücreleri birkaç ay kalabilirler ve aksesuar bezlerin fonksiyonel bozukluğu genellikle geri dönüşümsüzdür. Bu spermatozoanın fertilizasyon kapasitesini bozan işlemlerin aktif olarak kaldığını ve fertilitenin eski durumuna dönmediğini gösterir.

Spontan gebelik açısından erkek aksesuar bez enfeksiyonunun antibiyotik ile tedavi başarı oranı genellikle yetersizdir ve plasebodan anlamlı olarak daha iyi değildir. Ancak patojenlerin eliminasyonunu amaçlayan tedavi iyi bir tıbbi uygulama olması nedeniyle, prostat kanserini de içeren olası komplikasyonların riskini azaltmak için endikedir[39].

Aşırı sayıda beyaz kan hücresinin sperm membranında ve bilhassa DNA'da neden olduğu oksijen zararlanmasının antibiyotik tedavisinden sonra kalıcı olabilmesi nedeniyle intrauterin inseminasyon ve invitro fertilizasyon kötü sonuçlanabilir. İnvitro fertilizasyon ve intrastoplazmik sperm enjeksiyonu sonucu, çok iyi sayıda preembriyo oluşturalabilir, fakat devam eden bir gebelik oluşturmada başarısız olunabilir[40]. Antioksidanları içeren ek yiyeceklerle tamamlayıcı tedavi gerekebilir[41] ve idyopatik oligozoospermidekine benzer tedavi verilebilir[43].

PROGNOZ VE KORUNMA

Enfeksiyon/enflamasyonun lokalizasyonunana bağlı olarak tedavi sonrası prognoz değişkendir. Prostatitler ve vezikülitlerin etkilerinin daha az önemli olmasına ve tedavilerinin fertlilteyle ilişkin olumlu sonuçlar vermesine rağmen, kronik epididimit, genellikle spermatozoanın fertilizasyon kapasitesi ve kalitesi üzerine geri dönüşümsüz zararlanmaya sebep olur. Aynı zamanda kan testis bariyerinin bozulması sonucu oluşan immünolojik infertilite geri dönüşümsüzdür.

Fertilitenin tekrar sağlanmasına ilişkin prognoz kötü olduğundan dolayı, en baştan önemli olan enfeksiyon hastalıklarından korunmaktır. Cinsel yolla geçen hastalıklardan korunma ve pozitif vakalarda bunların hemen tedavisi daha sonra oluşabilecek infertilite riskini düşürecektir. Özellikle tekrar eden *Chlamydia* enfeksiyonlarının geri dönüşümsüz yıkıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir[44]. Sigara içen erkeklerde prostatit ve bunu takiben enfeksiyonun diğer aksesuar seks organlarına yayılma riski 4-5 kat daha fazladır. Ek olarak tütün içiciliği artan miktarda serbest oksijen radikallerine ve spermatozoada toksik zararlanmaya sebep olur. Bu yüzden, tütünden kaçınma, önemsiz ürolojik patojenler tarafından oluşturulan erkek aksesuar bez enfeksiyonundan korunmada en önemli faktördür. Prostat bezinde saklanmış patojenlerden kurtulmak için, erkekte enfeksiyon için anlamlı herhangi bir üriner yakınma epizotu, özellikle kinolonlar kullanılarak, uygun bir şekilde tedavi edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Gates W, Parley TM, Rowe PJ. Worldwide patterns of infertility: Is Africa different? Lancet 1985; 2: 596
2. Henry-Suchet J, Steg A, Constantin A. Infection et recondite". Paris: Masson, 1977
3. Rowe PJ, et al. WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple, 1st edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1993
4. Rowe PJ, et al. WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male, 1st edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2000
5. Keck C, et al. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. Hum Reprod Update 1998; 4: 891
6. Huwe P, et al. Influence of different uropatho-genic microorganisms on human sperm motility parameters in an in vitro experiment. Andrologia 1998;30(Suppl 1): 55
7. Rodin DM, Laronc D, Goldstein M. Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. Fertil Steril 2003; 79 (Suppl 3): 1555
8. Zalata AA, et al. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. Int J Androl 1998; 21: 154
9. Comhaire FH, et al. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. Hum Rcprod Update 1999; 5: 393
10. Chen CS, et al. Hydroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. Biochem Mol Biol Int 1997; 43: 291
11. Loft S, et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. Hum Reprod 2003; 18: 1265
12. Depuydt C, et al. Mechanisms of sperm deficiency in male accessory gland infection. Andrologia 30 1998; 29(Suppl 1): 30
13. Depuydt C, et al. The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection. J Androl 1996; 17:699
14. Gruschwitz MS, Brezinschek R, Brezinschek HP. Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males. J Androl 1996; 17: 158
15. Dohle GR, et al. Subtotal obsttuction of the male reproductive tract. Urol Res 2003; 31: 22
16. Hendry WF. Clinical significance of unilateral testicular obstruction in subfertile males. Br J Urol 1986; 58: 709

17. Cornhaire F, Verschraegen G, Vermeulen L. Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. Int J Androl 1980; 3: 32
18. Paulis G, et al. Evaluation of the cytokines in genital secretions of patients with chronic prostatitis. Arch Ital Urol Androl 2003; 75: 179
19. Ludwig M, et al. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: seminal markers of inflammation. World] Urol 2003; 21: 82
20. Vicari E, et al. Varicocele and coincidental abacterial prostato-vesiculitis: negative role about the sperm output. Arch Ital Urol Androl 2003; 75: 35
21. Everaert K, et al. Chronic prostatitis and male accessory gland infection — is there an impact on male infertility (diagnosis and therapy)? Andrologia 2003; 35: 325
22. Witkin SS, Kligman I, Bongiovanni AM. Relationship between an asymptomatic male genital tract exposure to Chlamydia trachomatis and an autoimmune response to spermatozoa. Hum Reprod 1995; 10:2952
23. Eggert-Kruse W, et al. Chlamydial serology in 1303 asymptomatic subfertile couples. Hum Reprod 1997; 12: 1464
24. Drach GW. Prostatitis: man's hidden infection. Urol Clin North Am 1975; 2: 499
25. Yagci C, et al. Efficacy of transrectal ultrasonography in the evaluation of hematospermia. Clin Imaging 2004; 28: 286
26. Liang CZ, et al. Prevalence of sexual dysfunction in Chinese men with chronic prostatitis. Br J Urol Int 2004; 93: 568
27. Horcajada JP, et al. Transrectal prostatic ultrasonography in acute bacterial prostatitis: findings and clinical implications. Scand J Infect Dis 2003; 35: 114
28. Meares EM Jr, Stamey TA. The diagnosis and management of bacterial prostatitis. Br J Urol 1972; 44: 175
29. Fari A, et al. Incidence des etats inflammatoires ou infectieux des glandes geni tales annexes sur le sperme. In Henry-Suchet J, StegA, Constantin A, eds. Infection ct Fecondite, 1st edn. Paris: Masson, 1977: 43
30. Fredlund H, et al. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: impact on cpidemiological surveillance and interventions. APMIS 2004; 112:771
31. World Health Organization. WHO Laboratory Manual of the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999
32. Comhaire FH, Rowe PJ, Parley TM. The effect of doxycycline in infertile couples with male accessory gland infection: a double blind prospective study. Int J Androl 1986; 9: 91
33- Comhaire FH. Concentration of pefloxacine in split ejaculates of patients with chronic male accessory gland infection. J Urol 1987; 138: 828
34. Weidner W, et al. Outcome of antibiotic therapy with ciprofloxacin in chronic bacterial prostatitis. Drugs 1999; 58 (Suppl 2): 103
35. Bundrick W, et al. Levofloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis: a randomized double-blind multicenter study. Urology 2003; 62: 537
36. Hooton TM, et al. Erythromycin for persistent or recurrent nongonococcal urethritis. A randomized, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 1990; 113: 21
37. Skerk V, et al. Comparative randomized pilot study of azithromycin and doxycycline efficacy in the treatment of prostate infection caused by Chlamydia erachomatis. Int J Antimicrob Agents 2004; 24: 188
38. Branigan EF, Muller CH. Efficacy of treatment and recurrence rate of leukocytospermia in infertile men with prostatitis. Fertil Steril 1994; 62: 580
39. Roberts RO, et al. Prostatitis as a risk factor for prostate cancer. Epidemiology 2004; 15: 93
40. Zorn B, et al. Seminal elastase-inhibitor complex, a marker of genital tract inflammation, and negative IVF outcome measures: role for a silent inflammation? Int J Androl 2004; 27: 368
41. Comhaire FH, Mahmoud A. The role of food supplements in the treatment of the infertile man. Reprod Biomed Online 2003; 7: 385
42. Comhaire F. Clinical andrology: from evidence-base to ethics. The 'E' quintet in clinical andrology. Hum Reprod 2000; 15:2067
43. Vicari E. Effectiveness and limits of antimicrobial treatment on seminal leukocyte concentration and related reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infection. Hum Reprod 2000; 15:2536
44. Gonzales GF, et al. Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male fertility. Andrologia 2004; 36: 1

25

HIV Enfeksiyonlu Erkekler için Sperm Yıkama Teknikleri: Açıklama ve Deneyim

Gary S. Nakhuda, Mark V. Sauer

Çeviri: *Mehmet Öder*[*], *Halil İbrahim Çam*[**]

GİRİŞ

Viral geçişin, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) seropozitif olan bir erkekten, enfekte olmamış bir kadına geçme olasılığının, korunmasız her bir cinsel ilişki için yaklaşık olarak 0.001 olduğu tahmin edilmektedir[1-4]. Enfeksiyon kapma riskinin düşük olmasına rağmen, eğer çift, çocuk sahibi olmak istiyorsa, hamileliğin gerçekleşmesini gerektiren korunmasız çok sayıda ilişki nedeniyle, kadın önemli ölçüde enfeksiyon riskiyle karşı karşıyadır. HIV enfeksiyonu, reprodüktif yaştaki yetişkinlerde en yaygındır, ve kadınların HIV ile enfekte olmalarının en yaygın yolu cinsel ilişkidir.

Yüksek oranda aktif antiretroviral tedavi (HAART) uygulaması, bu hastalığın klinik seyrini büyük ölçüde iyileştirmiştir ve en uyumlu hastalar, şu anda sağlıklı prodüktif hayatlar sürmektedirler[5]. HIV-seropozitif hastaların çocuk sahibi olma konusundaki makul istekleri, doğal hamileliğin, viral geçiş açısından risksiz olmadığı gerçeği ile engellenmektedir. Ancak, çocuk sahibi olma dürtüsü güçlüdür ve bazı çiftler, daha güvenli alternatifler sağlanmasa da hamilelik için viral geçiş riskini göze alırlar[6]. Evlat edinme ya da donör sperm kullanımı, bir aile olmanın hala en güvenli opsiyonları olarak kabul edilmelerine rağmen, birçok hasta için kabul edilebilir değildir[7].

Tümüyle risksiz olmamasına karşın, yardımcı üreme teknikleri (ART), HIV-serodiskordant çiftlere, kendi gametleri ile hamilelik şansı sunar. Bu müdahalenin altında yatan ilke, fonksiyonel spermin, semendeki enfekte elementlerden ayrılabileceği bilgisine dayanır. Semendeki HIV seviyeleri, bir çok vakada periferik kandaki değerlerle ilişkiliyken[8,9], aynı zamanda, üreme sisteminde viral yüklemenin bağımsız regülasyonunu gösteren, seminal HIV'ın kompartmanlara ayrıldığının kanıtı bulunmaktadır[10,11]. Seminal plazma ve hücresel bileşenlerinden ayrılmış spermlerin, virüssüz olduğuna inanılır ve tam olarak hazırlandığında, hem yapay döllenme kullanılarak *in vivo*, hem de enfekte olmamış kadına HIV geçiş riskinin azalması ile *in vitro* tekniğinden yararlanılabilir.

Semprini ve arkadaşları tarafından 1992'de yayınlanan çalışmadan bu yana[12], birçok araştırmacı, çocuk sahibi olmak isteyen HIV-serodiskordant çiftlerin tedavisinde, sperm ayırma yöntemini uygulamaktadırlar. Mevcut dünya literatüründe, annede ya da çocukta kaydedilmiş tek bir enfeksiyon vakası olmadan yüzlerce bebek dünyaya getiren böyle çiftlerde, binlerce ART döngüsü bildirilmiştir (Tablo 25.1)[13-28].

[*] Manisa Devlet Hastanesi, Üroloji Kliniği, Manisa.
[**] Turhal Devlet Hastanesi, Üroloji Kliniği, Turhal, Tokat.

Bu metotların gösterdiği güvenli ve efektif sonuçlara, ve HIV-serodiskordans için yardımcı üreme kullanımının yıllar içinde elde edilmiş yaygın kabulüne rağmen, bir çok tartışma ve sorun vardır. Bu bölüm, sperm işlenmesinin teknik yönlerine ve uygun tedavi seçeneklerine odaklanarak, HIV-pozitif erkekler ve onların enfekte olmamış kadın partnerleri için fertilite tedavisi sağlamanın klinik yönünü incelemektedir.

HASTA SEÇİMİ

Her elektif prosedürde doğru olduğu üzere, tedaviye uygun adaylar olup olmadıklarını belirlemek için, ilk olarak, hastalar, tam olarak gözlemlenmelidirler. Fertilite tedavisi için HIV-pozitif bireylerin seçiminde kullanılan temel kriter, hastanın sağlıklı olması ve sağlığının kötüleşmesini gösterebilecek akut ya da kronik durumların işaretlerinin ya da semptomlarının bulunmayışıdır. Hasta, asıl uzmanı tarafından tam bir medikal değerlendirmeden geçmeli ve fertilite tedavisinin başlangıcından 6 ay öncesinde stabil CD4 sayımları ve HIV viral yüklemeleri göstermelidir. Edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) hastalığının bir kanıtı bulunmamalıdır. Çocuk sahibi olmaya karar verme konusunda çiftlerin kendi kararlarını da göz önüne alarak, partnerlerden biri (ya da her ikisi) yaşamlarını tehdit eden bir duruma sahip ise tedaviyi gerçekleştirenler, hamilelik riskini dikkate almalıdırlar. Ne yazık ki, tam olarak gözlemlendiğinde bile, HIV-pozitif hastalar, sağlıklarında hızlı bir kötüleşme ile karşılaşabilir ve kısa bir sürede ölebilirler[29].

Kadın partnerler, yardımcı üreme başlangıcından itibaren bir ay içerisinde enzim immunoassay yöntemi (EIA) kullanılarak HIV- negatif olarak tasdik edilmelidirler. Bu kadınların, bulaşıcı riski azaltmak için tedavi görmelerine ve infertiliteye eşlik eden diğer faktörlere sahip olmamalarına rağmen, kapsamlı bir üreme değerlendirmesinden geçmelidirler. Yardımcı üremenin, ovülasyon indüksiyon araçlarının kullanımını, döngülerin takibini ve inseminasyon ya da *in vitro* fertilizasyon-intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF-ICSI) prosedürlerini içeren, pahalı ve yoğun işgücü gerektiren doğası nedeniyle, tedavinin başlangıcından

Tablo 25.1: *Erkekten kadına viral geçişin risk düşüşü açısından yardımcı üreme tedavisi gören HIV-1-serodiskordant çiftler için yayımlanmış sonuçların özeti*

Çalışma	Dögüler (n)	Hastalar (n)	Gebelikler (n)	Doğumlar (n)	Enfeksiyon
IUI Döngüleri					
Semprini *et al.*, 1997[13]	1954	623	272	242	0
Vernazza *et al.*, 1997[14]	46	16	5	3	0
Brechard *et al.*, 1997[15]	11	-	5	-	0
Marinia et *al.*, 1998[16], 2001[17]	458	233	116	86	0
Tur *et al.*, 1999[18]	155	67	32	-	0
VVeigeleta/., 2001[19]	143	64	19	14	0
Bujan *et al.*, 2001[20]	62	28	14	2	0
Daudineta/., 2001[21]	93	39	18	-	0
Gilling-Smitheta/., 2003[22]	92	36	12	10	0
Delvigneeta/., 2003[23]	5	5	4	4	0
Toplam	3019	1111	497	361	0
IVF-ICSI döngüleri					
Ohleta/., 2003[24]	54	39	20	14	0
Marina *et al.*, 2003[25]	219	156	92	75	0
Garridoeta/., 2004[26]	73	73	29	19	0
Mencaglia *et al.*, 2005[27]	78	35	22	22	0
Sauereta/., 2006[28]	275	135	94	112	0
Toplam	699	438	257	242	0

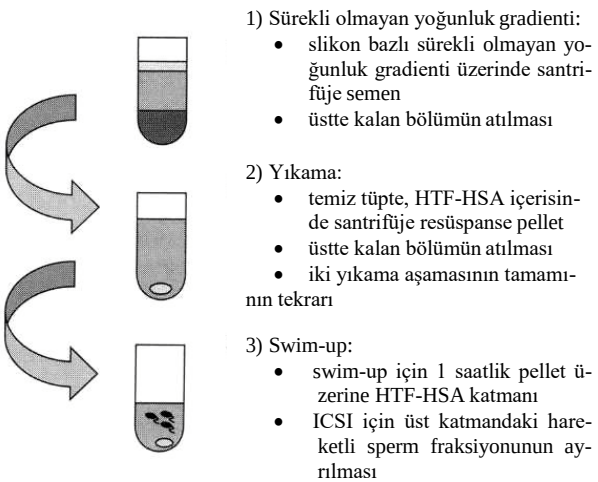
IUI, intrauterin inseminasyon; IVF-ICSI, *in-vitro* fertilizasyon-intrastoplazmik sperm enjeksiyonu

önce, komplikasyon yaratabilecek potansiyel sorunları ortaya çıkarmak mantıklıdır. Kadının bu kapsamlı değerlendirmesi, tedavi döngü sayısını minimalize ederek, kadının HIV-pozitif parterinden gelen sperme maruziyetini azaltırken, başarı olasılığını artırıp optimize edilmiş bir yaklaşımı mümkün kılar.

Serodiskordant çiftlerin, güvenli sekse bağlı kalmaları önemlidir. İşlenmiş semenin rahim içi döllenmesini (IUI) takiben, kadına olası HIV geçisini bildiren tek bir vakada, enfeksiyonun, IUI nedeniyle değil, fertilite tedavisi esnasında korunmasız cinsel ilişki ya da kondomun yanlış kullanıldığı durumlarda ikincil olarak ortaya çıkması muhtemeldir[30].

HIV TAŞIYICILARI OLARAK SEMEN VE SPERM

CD4- pozitif lenfositler ve makrofajlar, semendeki temel HIV depolarıdır. Hareketli sperm hücrelerini, bu enfekte hareketsiz hücrelerden ayırmak, HIV-seropozitif erkeğin enfekte olmamış spermatozoasını, yardımcı üreme için kullanma olanağı sağlar. Tüm androloji laboratuarlarında yaygın olarak bilinen ve kullanılan dansite-gradient santrifüj, peşpeşe sperm yıkama ve swim-up teknikleri, HIV'ın proviral DNA ya da RNA'sı olmaksızın, spermatozoanın yüksek oranda hareketli bölümlerinin ayrılmasına izin verir[31] (Şekil 25.1).



Şekil 25.1: *İn-vitro fertilizasyon-intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF-ICSI) için HIV-pozitif semenin işlenmesi için şematik görünüm. HTF-HSA, insan tubal sıvısı – insan serum albümini.*

Spermatozoanın HIV barındırıp barındırmadığı belirsiz kalmaktadır. İlk tartışma, spermatozoa üzerindeki CD4 molekülünün varlığı ya da yokluğu üzerine odaklanmıştır ki bu da HIV'ın gp120 glikoproteini için primer afinitesi olan reseptördür. 1987'de, CD4 reseptörünün, insan spermatozoası bulunduğu gösterilmiştir[32]. Ancak, daha sonra, moleküler teknikleri kullanan çok çelişkili bir kanıt, sperm yüzeyinde CD4 reseptörünün hem varlığını[33] hem de yokluğunu göstermiştir[34]. Dahası, transmisyon elektron mikroskopiye dayanan morfolojik kanıt, HIV viral partiküllerinin, sperm hücrelerinin (spermatozoa) yüzeyinde ve sitoplazmasında var olduğunu gösterirken[35], aynı tekniğin kullanıldığı diğer kanıtlar, spermin kendisinde değil, seminal sıvıda viral partiküllerin varolduğunu gösterir[36].

Hücresel HIV girişi için, gerekli glikoprotein koreseptörleri, CXCR4 ve CCR5, fare ve insanların üreme hücrelerinde oldukça noksan olmasına rağmen[37], galactosyl-alkyl-acylglycerol (GalAAG) glikolipid aracılığıyla spermatozoa ile HIV arasındaki ilişki için alternatif bir yol düşünülmüştür[38]. CD4- negatif nöral hücreler ve hücre zarında galactosyl seramid içeren kolonik epitel, gp120 için afinite gösterir, ve spermin ekvatoral ve orta bölümünde yer alan benzer GalAAG, benzer bir giriş sunabilir[40]. İlginç bir biçimde, insan oositleri ile yürütülmüş deneylerde, HIV tarafından direkt enfeksiyon, zona pellusida ya da kümülüs hücrelerinde CD4, CCR5 ya da GalAAG'nin varlığı gösterilememiştir ki bu da HIV'ın germ hücrelerine yönelmesinin ilginç bir biçimde özellikle erkeklere özgü olduğunu düşündürmektedir[41].

Tartışmanın her iki yönünde zorlayıcı kanıtlar mevcuttur ve HIV'nin spermatozoayı enfekte ettiğine dair bir fikir birliği nihayet sağlanmıştır. Tek başına spermatozoanın HIV ile ilişkili olabileceği biyolojik olarak akla yatkın gibi görünürken, sperm işleme tekniklerinin kullanıldığı güncel klinik raporlarda viral geçişin olmayışı nedeniyle, yardımcı üreme bağlamında bu teorinin klinik önemi çok az olabilir. Daha fazla araştırma elbette gerekliyken, hastalar teorik risklerle ilgili konsültasyona devam etmelidirler, böylece daha sonra yayımlanacak klinik kanıtlarla şüpheleri giderilebilir.

HIV-POZİTİF ERKEKLERDE SPERM KALİTESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Hastalığın ilerleyişi, sperm parametrelerinin kötüleşmesi ile ilişkili olduğu için, HIV enfeksiyonu, normal spermatogenezize zarar verici olabilir. Ancak, sağlıklı HIV- seropozitif erkeklerin, enfekte olmayanların kontollerinden oldukça farklı olan semen analizlerini yaptırmalarına gerek yoktur[42-44]. Hipogonadizm ve endokrin bozuklukları, HIV- pozitif erkeklerde nispeten yaygındır, ve var olduğunda, ardından spermatogenezizi etkiler[45]. İyileşmeyi geliştirmek ve kas-zayıflığını azaltmak[46] için verilen androjenler, iyatrojenik hipogonadizme neden olabilir[47]. Yardımcı gebeliği denemeden önce, HIV-serodiskordant çiftleri değerlendirirken, klinisyenlerin bu olasılıkların farkında olmaları önemlidir. 'Sperm yıkama' tekniğinin her bir adımı, sperm verimliliğinde önemli ölçüde azalma ile ilişkilidir ve bu nedenle, eğer makul sayıda hareketli sperm işlem sonrası elde edilemezse, işlem gören numunenin normalliği, tedavi planını etkileyebilir.

Antiretroviral terapi, genellikle, nükleik asid sentezi ve DNA entegrasyonunun bozulmasını içerir ve bu nedenle, spermatogeneziz üzerinde, muhtemelen, zıt etkilere sahip olabilir. Tüm antiretroviral türleri, erkek seksüel disfonksiyonu ile ilişkilidir[49]. Moleküler düzeyde, HAART'a uzun süreli maruz kalma, kök hücre seviyelerinde, spermatogenezizi etkileyebilecek çoklu mitokondriyal DNA delesyonu ile bağlantılıdır[50]. Ancak, klinik data, HAART'ın semen profillerinde ya da IVF-ICSI gibi ART'nin kullanıldığı üreme kapasitesinde zarar verici etkisini desteklemez[51]. Antiretroviral ilaç tedavisinin kesilmesi, viral dirence ve hastalığın kötüleşmesine neden olabilir[52] ve bu nedenle, üreme kapasitesini artırma amacıyla desteklenmemelidir.

SEMEN İŞLEME

HIV- seropozitif erkeklerin semen örneklerinin incelenmesi, enfekte ajanların işlenmesine ayrılmış araçlar gerektirir. Tahsis edilmiş inkübatörler ve depolama tanklarının yanı sıra ayrı bir sınıf II biyolojik başlık, yalnızca HIV-pozitif olarak bilinen erkeklerden alınacak örnekler için ayrılmalıdır[53].

Standart sperm 'yıkama' metotları, teorik olarak seminal plazma ve CD4-pozitif hücreler hariç, spermatozoa'nın hareketli bölümünü sağlar. Çoğu işleme teknikleri, swim-up'ı takiben, dansite-gradient santrifüj, sperm pelletinin resüspansiyonunu ve santrifüjünü kapsar. Bizim laboratuarımızda kullanılan işleme tekniklerinin ana hatları, Tablo 25.2'de sunulmaktadır.

Sürekli olmayan gradient ayrımı, tek başına, HIV-RNA ve proviral DNA kopyalarının toplam sayısında, sürekli gradientin yaptığından daha belirgin bir azalma ile sonuçlanmıştır. Ancak, HIV enfeksiyonlu hastalardan alınan semen örneklerinin %8'i, bu teknik tek başına kullanıldıktan sonra, hala saptanabilir viral yüklemeye sahipti. Sürekli olmayan gradienti takiben swim-up yapıldığında, HIV-RNA, her bir 10^5 pre-santrifüj kopyası başına <1 kopyaya düşürüldü ve proviral DNA, birbiri içine yerleştirilmiş hassas polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri kullanıldığında saptanamadı[54]. Ancak diğerleri, gradient/swim-up tekniğinden sonra, örneklerin %5 kadarının HIV pozitif kaldığını bulmuşlardır[16] ve gardient/swim-up, gradientin tek başına yaptığından anlamlı ölçüde daha iyi viral uzaklaştırma sağlayamamıştır[31].

Ticari gradient medyasının karşılaştırılması (Percoll™, Isolate®, PureCeption®, vb.), %47 / %90 gradient kullanıldığında, HIV-RNA kopya numaralarının ortadan kaldırması açısından hiçbir fark göstermemiştir[31]. İlginç bir biçimde, aynı çalışmada, NucliSens® assay ile değil, ancak zıt bir transkriptaz, (RT)- PCR assay ile Percoll'ün HIV-RNA deteksiyonunu kuvvetli bir biçimde ortadan kaldırdığı bulunmuştur. İşleme sonrası daha düşük düzeyler ile sonuçlanan, başlangıçtaki düşük viral konsantrasyonları ile orijinal örnekteki mevcut virüs miktarına bağlı olarak, HIV'ı semen örneklerinden ayırmanın etkinliği doza bağımlıdır[55]. HIV- bulaşmış semeni işleme teknikleri karşılaştırıldığında, $<10^6$ HIV-RNA kopyaları ile numuneler, kullanılan yıkama tekniğine bakılmaksızın, işleme sonrası virüssüz hale gelmiştir[31].

Politch ve arkadaşları, son zamanlarda, hareketli spermi HIV-pozitif semen örneğinden ayıran basit bir yöntem sundular. Araştırmacılara göre, bir 'çift tüp gradient' prosedürü, HIV-RNA'yı ortadan kaldırmada, popüler gradient / swim-up metottan daha etkiliydi. Aynı zamanda, bu metod daha hızlı ve daha basitti ve önemli ölçüde daha fazla sperm verimi ile sonuçlandı[31]. Onaylanırsa, bu umut verici teknik, daha sofistike laboratuar prosedürlerinin mevcut olmadığı bölgelerde, HIV-serodiskordant çiftler için daha güvenli hamileliğe giden bir yol geliştirebilir.

Tablo 25.2: *İn-vitro fertilizasyon - intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF-ICSI) için HIV-1-pozitif erkeklerden semen örnekleri için işleme protokolü.*

Bütün prosedürler Sınıf II biyolojik olarak güvenli kabinlerde yapılır.

Örnekler, toplama kaplarından 15-ml konikal steril santrifüj tüplerine transfer edilir.

Sürekli olmayan yoğunluk gradienti:

- 1.5 ml %47'lik, üst katman fraksiyonu, 1.5 ml %90 alt katman fraksiyonu üzerine (hacimler semen örneğinin miktarına göre ayarlanır) konulur
- 1-2 ml semen üst gradient fraksiyonu üzerine konulur
- 300 g'de 10-20 dakika santrifüj edilir
- pellet, temiz santrifüje transfer edilir ve %5'lik (v/v) insan serum albumini (HSA) eklenmiş 5 ml modifiye edilmiş insan tubal sıvısı ile dilüye edilir.

Yıkama 1:

- örnek, 300g'de 10 dk santrifüje edilir
- üstte kalan bölüm atılır
- pellet, 3 ml HTF-HSA içerisinde tekrar süspanse edilir

Yıkama 2:

- örnek, 300 g'de 10 dk santrifüje edilir
- üstte kalan bölüm atılır

Swim-up:

- yıkama 2'den az miktarda (0.2-1 ml) HTF-HSA pellete eklenir
- 45 dk swim-up yapılır
- ICSI için örneğin üst fraksiyonundan hareketli sperm seçilir

HIV-pozitif erkeklerden alınan spermi işlemek için hangi metotun seçildiğine bakılmaksızın, hastalara, virüsün %100 ortadan kalkacağı garantisi verilemez. Bu nedenle, teorik bir enfeksiyon riski kalır. Ancak, viral yüklemenin tespit edilemeyen düzeylere ya da orijinal viral yüklemenin %1'ne bile düşmesi, nispeten basit metotlar kullanılarak başarılabilir. Bu, seminal viral yükelemeler yüksekken bile geçerlidir[31] ve kümülatif klinik data ile kanıtlandığı gibi viral geçiş riski, ortadan kaldırılamıyorsa, kuşkusuz azaltılmalıdır.

İŞLENMİŞ ÖRNEKLERİN VİRAL TESTİ

İç içe geçmiş PCR ve kantitatif nükleik asid sekansa dayalı amplifikasyon assayları gibi aşırı hassas viral deteksiyon metotları, 10 kopya/ml kadar düşük HIV-RNA viral yüklemeleri tespit etmek için uygundur[56]. Bir çok araştırmacı, semen işleme tekniklerinin, tespit seviyelerinin altındaki numunelerin viral yüklemelerini düşürmede gerçekten etkili olduğunu tasdik etmek için bu methodları kullanmışlardır[13,54,55,57,58]. Belirsiz kalan, işleme sonrası testin, rutin klinik kullanım için gerekli olup olmadığıdır.

İşlenmiş numunenin viral testi, aşırı hassas teknikler ile numunelerin analizlerinin hemen yapılmasının mümkün olmaması nedeniyle, ek bir harcama gerektirir ve tedaviyi erteler. Yıkama sonrası numunelerin, negatif sonuçlar bunların kullanımlarına izin verene kadar dondurulmaları (kriyoprezervasyon) gerekir ve bu zamanda da çözülür. Donma-çözülme işlemi, başarıyı ters yönde etkileyebilecek, sperm veriminde ek bir düşüşle sonuçlanır.

Bazı araştırmacılar, özellikle yetersiz olarak kontrol edildiği bilinen enfeksiyona sahip nesnelerin olduğu durumlarda, aşırı hassas tekniklerin sonuçları ile güvence altına alınıncaya kadar, HIV- pozitif erkeklerden alınan işlenmiş semen numunelerinin karantinaya alınması konusunda ısrar ederler[59]. İşaret ettikleri bu nokta önemlidir, ancak biz, iyi kontrol edilmemiş hastalığı olan hastaların, yardımcı üreme için uygun adaylar olmadığını öne sürüyoruz ve fertilite tedavisi, klinik gelişimin gösterilebildiği zamana kadar ertelenmelidir.

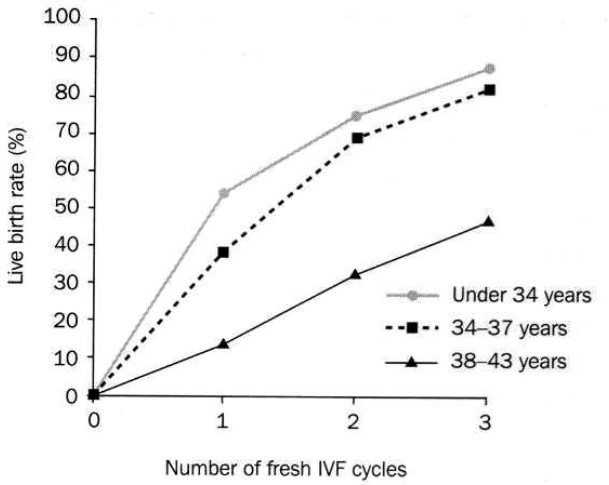
IUI vs ICSI

Intraüterin inseminasyon (IUI) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF-ICSI) ile *in vitro* fertilizasyon, serodiskordant çiftlerde, hamileliği sağlamak için kullanılan en yaygın tekniklerdir. Her iki tekniğin de avantajları ve dezavantajları vardır.

Avrupa grupları tarafından toplanan kanıtların büyük bölümü, HIV-pozitif erkeklerden alınan işlenmiş spermin IUI'sı, güvenli ve etkili bir prosedür olduğunu savunmaktadır[60]. IVF-ICSI ile karşılaştırıldığında, IUI daha ucuz, teknik olarak daha kolay ve iyi seçilmiş hastalarda yüksek oranda etkilidir. Ancak, IUI, kadın hastanın açık (patent) fallopian tüpleri olmasını gerektirir ve etkili olması için, yüksek sayıdaki hareketli sperm toplanmalıdır (en az 1-2 x 10^6 /ml). Sadece küçük sayıda izole edilmiş

sperm kullanılan IVF-ICSI durumuna göre, viral partiküller ve enfekte CD4-pozitif hücreler ile teorik olarak daha yüksek kontaminasyon olasılığı sunan yüksek sayıda spermin insemine edilmesi gerekir. Daha önce 1990 yılında bildirilen, HIV pozitif kocasından alınan numune kullanılarak, başarısız IUI denemesini takiben seropozitif olan bir kadın vakasına dayanarak, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), HIV-pozitif erkeklerden alınan işlenmiş spermin IUI kullanımını onaylamamaktadırlar. Ek olarak, Birleşik Devletler'deki bazı yargı daireleri, hekimlerin bu alanlarda hizmet vermelerini engelleyen, HIV enfekte materyalin inseminasyonunu yasaklayan düzenlemelere sahiptir[61].

HIV serodiskordant çiftler için, 1992'den beri, erkek faktörlü infertiliteyi tedavi etmek için klinik uygulamada kullanılan IVF-ICSI, IUI'ya bir alternatiftir. IVF-ICSI daha pahalıdır, hasta ve hekim için daha fazla iş gücü gerektirir, gonadotropinler ile ovaryan hiperstimülasyon gerektirmesi nedeniyle kadınlar için tabii riskler yaratır ve konjenital bozuklukların riskinin artmasıyla ilişkilidir[62]. IVF-ICSI'nın HIV'daki en temel teorik avantajı, IUI ile karşılaştırıldığında, potansiyel olarak enfekte materyale olan sınırlı maruziyettir. Yalnızca tek bir sperm, tek bir yumurtaya enjekte edildiği için, HIV'ın eğilimi olan non-sperm hücrelere maternal maruziyet ortadan kalkar. Üç tedavi döngüsü içinde hamilelik başarısı elde eden tedavi edilmiş genç çiftlerde %90 ile IVF-ICSI'nin hızlı ve kümülatif hamilelik başarı oranları etkileyicidir (Şekil 25.2).



Şekil 25.2: *Kadın yaşına göre sınıflandırılarak, in-vitro fertilizasyon-intrastoplazmik sperm enjeksiyonunda (IVF-ICSI) birbirini izleyen denemelerle HIV-serodiskordant çiftlerin kümülatif doğum oranlarını tanımlayan yaşam tablosu analizleri.*

Eleştiriler, GalAAg aracılığı ile, sperme tutunan viral partiküllerin, hücre bölünmesi aşamasındaki embriyoların oluşumundan önce, fertilizasyon süresince, oosite girebileceğini öne sürmektedir[63]. Bu *in vitro* datanın teorik çıkarımı, HIV'ın, bulaşmış sperm ile ICSI aracılığıyla, embriyoya doğrudan geçebileceğini işaret ediyor gibi görünmektedir. Biyolojik olarak kabul edilebilir olmasının yanı sıra, HIV pozitif bir bebek, hiçbir zaman HIV pozitif bir anneden doğmaz ve bu nedenle böyle bir durumun olabilirliği çok düşük görünmektedir. IUI, kadın üreme sistemine doğrudan giden milyonlarca sperm gerektirirken, IVF-ICSI prosedürünün son aşaması, genellikle yalnızca 2-3 embriyonun transferini içerir. Dahası, şüpheli semen parametreleri olan erkeklerde ya da kapalı (non-patent) fallopian tüpleri olan kadınlarda, IVF-ICSI bir tedavi seçeneğidir. Son olarak, IVF-ICSI, HIV-pozitif spermlerin, kadına doğrudan yerleştirilmesini gerektirmediği için, en azından Birleşik Devletler'de, bu prosedür, teknik olarak, HIV-serodiskordant çiftlerin inseminasyon tedavisini engelleyen kanunları ihlal etmez. Bu nedenle, bazı merkezlerde, IVF-ICSI, olası yasal engel riskini azaltmak isteyen hekimler için daha kabul edilebilirdir.

Açıkça, her iki tedavinin yararları ve eksiklikleri vardır ve hiç biri, her hastanın ihtiyacını karşılamak için tümüyle optimal değildir. İdeal olarak, iyi bilgilendirilmiş hasta tarafından planlanan, kişiye özel tedavi seçimi gerçekleşmelidir, böylece her bir prosedürün risklerini ve yararlarını açıkça anlayan çiftlerin, yapılacak işlemin yöntemine karar vermede rol oynamalarına izin verilmektedir. Ne yazık ki, dünyanın çoğu bölgesinde, finansal, politik ve sosyal faktörler, HIV-serodiskordant çiftlere uygun üreme seçeneklerinin çerçevesini sınırlandırmaktadır.

TAKİP-GÖZETİM

HIV-pozitif erkeklerden alınan numunelerle yapılan IUI ya da IVF-ICSI'yı takiben, viral geçiş için yakından takip önemlidir. Bizim uygulamamızda, kadın partner hamile kalırsa, HIV için gözlem her üç aylık dönemde yapılır. Postpartumdan hemen sonra, anne ve çocuk neonatal periyot kapsamında ve ardından 3 ve 6. aylarda yüksek hassasiyetli HIV-RNA ya da proviral DNA testleriyle değerlendirilir. Hamilelik gerçekleşmezse ya da spontan düşük vakalarında, kadın 3 ve 6 ay sonra değerlendirilir.

1997-2005 yılları arasında, Colombia Üniversitesi'nde, 100'den fazla canlı doğum ile sonuçlanan, 135'ten fazla hastada, yaklaşık 275 IVF-ICSI döngüsü gerçekleştirilmiştir. Tedavi gören kadın partnerlerde ya da çocuklarında tek bir HIV enfeksiyon vakasına rastlanmamıştır (Tablo 25.3).

SONUÇLAR

Şu anda HIV enfeksiyonu olan dünya üzerindeki yaklaşık 40 milyon insanın çoğu, reprodüktif yaştadır[64]. Hastalığın medikal tedavisindeki gelişmelerin sonucunda, şu anda, bir çok hasta, çocuk sahibi olma isteğini makul kılabilecek, nispeten normal ve sağlıklı bir hayat sürmektedir. Bir aile kurmaya kararlı olanlar için, hamilelik için güvenli seçeneklerin var olması önemlidir.

HIV'ı ve vektörlerini, hareketli spermlerin yararlı fraksiyonlarından izole eden etkili sperm işleme metotları, hamileliği güvenli bir biçimde gerçekleştirmek için IUI ve IVF-ICSI gibi tekniklerin yapılmasına izin verir. Bu hizmetlerin uygunluğunun geniş olması, daha fazla enfekte bireye, aile hayatının keyfini sürme şansı verir. Belki de, halksağlığı perspektifinden bakınca daha önemli olan, yardımcı üreme kullanmanın, enfekte partnerlerin ve çocukların sayısını azaltarak, genel nüfus içinde, hastalığın ağırlığını azaltmasıdır.

HIV seropozitif bireylere fertilite tedavisi sağlamak, "American College of Obstetricians and Gynecologists" ve "American Society for Reproductive Medicine" tarafından onaylanmaktadır[65,66]. Birleşik Devletler'de, 182 fertilite kliniğinin %18'i, bu merkezlerde, bu konuyla ilgili özel hizmetlerin olduğu söylenmemesine rağmen, HIV-enfekte çiftlere bazı yardımcı üreme tekniklerinin sağlandığını rapor etmiştir[67].

Yaygın Avrupa deneyimi, hizmetlere daha geniş erişimi yansıtıyor gibi görünüyor. Gelişmiş ülkelerde birçok HIV serodiskordant çift, ART'dan yararlanırken, teknolojilerin etkisi, eğer HIV'ın yüksek ölçüde yaygın olduğu bölgelere genişletilirse, daha büyük olacaktır. Örneğin, dünyanın HIV/AIDS nüfusunun %64'ünün yaşadığı bölge olan güney Sahara Afrika'sında, geçişin temel yolu, heteroseksüel ilişkidir[64]. HIV-enfekte bireylerin yarısından fazlası kadındır ve AIDS, bebek ölümleri ve yetim kalmanın önemli bir nedenidir. Şüphesiz, HIV'ın heteroseksüel geçişini düşürmeye yönelik her çaba, bu endemik nüfusta önemli bir etki yaratmalıdır. Gelecek araştırmalar, bu bölgelerde kolayca uygulanabilmesi için basit, etkili ve ucuz teknikler üzerine yoğunlaşmalıdır, böylece serodiskordant çiftler, doğal gebelikte var olan ölümcül riskleri üstlenmeden çocuk sahibi olabilirler.

Tablo 25.3: *Colombiya niversitesi'nde HIV-1- serodiskordant çiftlerde, in-vitro fertilizasyon-intrastoplazmik sperm enjeksiyon (IVF-ICSI) sonuçları. Değerler, n, % ya da ortalama ± SD (arasında) gösterilmiştir.*

IVF -ICSI'ye başlayan çiftler (n)	135	
Toplam döngüler (n)	275	
Çift başına IVF denemelerinin sayısı	2 ± 3.2	1-6
Kadın yaşı (yıl)	33.7 4.9	21-48
Erkek yaşı (yıl)	37.2 ± 5.5	22-49
HIV teşhisinin yılları	8.3 ± 5.6	1-20
Viral yükleme (kopyalar /ml)	3171.2 ± 5976.6	51-28424
CD4 (/mm³)	585.9 ± 309.5	33-1810
Klinik hamilelikler, toplam (n)	111	
IVF döngüsü başına klinik hamilelikler (%)	47.60	
IVF döngüsü başına devam eden / sonuçlanmış hamilelikler (%)	41.60	
Doğan bebekler (n)	113	

KAYNAKLAR

1. Downs AM, De Vincenzi I. Probability of heterosexual transmission of HIV: relationship to the number of unprotected sexual contacts. European Study Group in Heterosexual Transmission of HIV. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1996; 11: 388
2. Gray RH, et al. Probability of HIV transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. Lancet 2001; 357: 1149
3. Padian NS, et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus (HIV) in northern California: results from a ten-year study. Am J Epidemiol 1997; 146:350
4. Peterman TA, et al. Risk of human immunodeficiency virus transmission from heterosexual adults with transfusion-associated infections. JAMA 1988; 259: 55
5. Gilling-Smith C, Smith JR, Semprini AE. HIV and infertility: time to treat. There's no justification for denying treatment to parents who are HIV positive. BrMedJ 2001; 322: 566
6. Chen JL, et al. Fertility desires and intentions of HIV-posirive men and women. Fam Plann Perspecr 2001; 33: 144, 165
7. Klein J, er al. Understanding the motivations, concerns, and desires of human immunodeficiency virus 1-serodiscordant couples wishing ro have children through assisted reproduction. Obstet Gynecol 2003; 101:987
8. Ball JK, et al. HIV in semen: determination of proviral and viral titres compared to blood, and quantification of semen leukocyte populations. J Med Virol 1999; 59: 356
9. Gupta P, et al. High virai load in semen of human immunodeficiency virus type 1-infected men at all stages of disease and its reduction by therapy with protease and nonnucleoside reverse transcripease inhibitors. J Virol 1997; 71: 6271
10. Byrn RA, Kiessling AA. Analysis of human immunodeficiency virus in semen: indications of a genetically distinct virus reservoir. J Reprod Immunol 1998; 41: 161
11. Coombs RW, et al. Association between culturable human immunodeficiency virus type 1 (HIV) in semen and HIV RNA levels in semen and blood: evidence for compartmentalization of HIV between semen and blood. J Infect Dis 1998; 177: 320
12. Semprini AE, et al. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. Lancet 1992; 340: 1317
13. Semprini AE, Fiore S, Pardi G. Reproductive counselling for HIV-discordant couples. Lancet 1997; 349: 1401
14. Vernazza PL, et al. Quantification of HIV in semen: correlation with antiviral treatment and immune status. Aids 1997; 11: 987
15. Brechard N, et al. Etude de la localisation du VIH dans le sperme. Contracept Fertil Sex 1997; 25: 389
16. Marina S, et al. Human immunodeficiency virus rype 1-serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. Fertil Steril 1998;70:35
17. Marina S. Round Table Discussion. Fourth International Symposium on AIDS and Reproduction, Genoa, 2001
18. Tur RA, et al. Artificial insemination with processed sperm samples from serodiscordant couples for HIV-1. Hum Reprod 1999; 14: 208 (P-133)
19. Weigel MM, et al. Reproductive assistance to HIV-discordant couples — the German approach. Eur J MedRes2001;6: 259
20. Bujan L. Reproduction, laboratory, and HIV-1. Fourth International Symposium on AIDS and Reproduction, Genoa, 2001
21. Daudin MFC, Izopet J. Le protocole ANRS 096: prise en-charge en assistance medicale a la procreation des couples serodifferents dont 1'homme est infecte par le VIH. Reprod Humaine Horm 2001; 14: 365
22. Gilling-Smith CFL, Tamberlin B. Reducing reproductive risks in HIV infected couples: a comprehensive programme of care. Hum Reprod 2003; 18 (Suppl. 1}: xviii
23. Delvigne ABP, Manigart Y. Fertility treatment in couples where either or both partners are HIV infected. Hum Reprod 2003; 18: P-405
24. Ohl J, et al. Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples: 18 months of experience. Hum Reprod 2003; 18: 1244
25- Marina SSA, et al. Results of 219 IVF-ICSI cycles in serodiscordant couples (seropositive men) to HIV-1. Hum Reprod 2003; 18: P-450
26. Garrido N, et al. Semen characteristics in human immunodeficiency virus {HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. Hum Reprod 2005; 20: 1028
27. Mencaglia L, et al. ICSI for tteatment of human immunodeficiency virus and hepatitis C vitus-serodiscordant couples with infected male partner. Hum Reprod 2005; 20: 2242
28. Sauer MVNG, et al. IVF-ICSI for the prevention of viral transmission in HIV-1 serodiscordant couples: the experience at Columbia University. ESHRE Annual Meeting, Prague, 2006
29. Nakhuda GS, Pena JE, Sauer MV. Deaths of HIV-positive men in the context of assisted teproduction: five case studies from a single center. AIDS Patient Care STDS 2005; 19:712
51. Nakhuda G, PenaJ, Sauer MV. Antiretroviral therapy does not adversely affect the semen parameters of

HIV+ men undergoing IVF-ICSI. American Society for Reproductive Medicine, Annual Meeting, 2004
30. Centers for Disease Control and Prevention. HIV infection and artificial insemination with processed semen. MMWR Morb Mortal Wldy Rep 1990; 39: 249, 255
31. Politch JA, et al. Separation of human immunodeficiency virus type 1 from motile sperm by the double tube gradient method vetsus other methods. Fertil Steril 2004; 81:440
32. Ashida ER, Scofield VL. Lymphocyte major histocompatibility complex-encoded class II structures may act as sperm receptors. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:3395
33. Gobert B, et al. CD4-like molecules in human sperm. FEES Lett 1990; 261: 339
34. Quayle AJ, et al. The case against an association between HIV and sperm: molecular evidence. J Reprod Immunol 1998; 41: 127
35- Baccetti B, et al. HIV particles detected in spermatozoa of patients with AIDS. J Submicrosc Cytol Pathol 1991; 23: 339
36. Borzy MS, Connell RS, Kiessling AA. Detection of human immunodeficiency virus in cell-free seminal fluid. J Acquir Immune Defic Syndr 1988; 1:419
37. Habasque C, et al. Study of the HIV receptors CD4, CXCR4, CCR5 and CCR3 in the human and rat testis. Mol Hum Reprod 2002; 8: 419
38. Brogi A, et al. Human sperm and spermatogonia express a galactoglycerolipid which interacts with gp!20. J Submicrosc Cytol Pathol 1995; 27: 565
39. Harouse JM, Collman RG, Gonzalez-Scarano F. Human immunodeficiency virus type 1 infection of SK-N-MC cells: domains of gp!20 involved in entry into a CD4-negative, galactosyl ceramide/3' sulfogalactosyl ceramide-positive cell line. J Virol 1995; 69: 7383
40. Brogi, A, et al. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotcin gp!20 with a galactoglycerolipid associated with human sperm. AIDS Res Hum Retroviruses 1996; 12: 483
41. Baccetti B, et al. Failure of HIV to infect human oocytes directly. J Acquir Immune Defic Syndr 1999; 21:355
42. Krieger JN, et al. Fertility parameters in men infected with human immunodeficiency virus. J Infect Dis 1991; 164:464
43. Muller CH, Coombs RW, Krieger JN. Effects of clinical stage and immunological status on semen analysis results in human immunodeficiency virus type 1-seropositive men. Andrologia 1998; 30 (Suppl 1): 15
44. Politch JA, et al. The effects of disease progression and zidovudine therapy on semen quality in human immunodeficiency virus type 1 seropositive men. FertilSteril 1994; 61: 922
45. Sellmeyer DE, Grunfeld C. Endocrine and metabolic disturbances in human immunodeficiency virus infection and the acquired immune deficiency syndrome. Endocr Rev 1996; 17: 518
46. Bhasin S, et al. Testosterone replacement and resistance exercise in HIV-infected men with weight loss and low testosterone levels. JAMA 2000; 283: 763
47. Pena JE, Thornton MH, Jr. Sauer MV. Reversible azoospermia: anabolic steroids may profoundly affect human immunodeficiency virus-seropositive men undergoing assisted reproduction. Obstet Gynecol 2003;101: 1073
48. Evliyaoglu Y, Ciftci U, Bozdemir N. Spermatozoa selection by the swim-up procedure and two-layet percoll gradient centrifugation. Int Urol Nephrol 1996; 28: 409
49. Collazos J, et al. Sexual dysfunction in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 2002; 31: 322
50. White DJ, et al. Sperm mitochondrial DNA deletions as a consequence of long term highly active antiretroviral therapy. AIDS 2001; 15: 1061
51. Sauer MV. Sperm washing techniques address the fertility needs of HIV-seropositive men: a clinical review. Reprod Biomed Online 2005; 10: 135
52. Foli A, et al. Strategies to decrease viral load rebound, and prevent loss of CD4 and onset of resistance during structured treatment interruptions. Antivir Ther 2004; 9: 123
53. Sauer MV, Chang PL. Establishing a clinical program for human immunodeficiency virus 1-seropositive men co father seronegative children by means of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. Am J Obstet Gynecol 2002; 186: 627
54. Hanabusa H, et al. An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV. AIDS 2000; 14: 1611
55. Fiote JR, et al. The efficiency of sperm washing in removing human immunodeficiency virus type 1 varies according to the seminal viral load. Fertil Steril 2005; 84: 232
56. Notermans DW, et al. Evaluation of a second-generation nucleic acid sequence-based amplification assay for quantification of HIV type 1 RNA and the use of ultrasensitive protocol adaptations. AIDS Res Hum Retroviruses 2000; 16: 1507
57. Kim LU, et al. Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. Aids 1999; 13:645
58. Pasquier C, et al. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. AIDS 2000; 14: 2093
59. Leruez-Ville M, et al. Assisted reproduction in HIV-serodifferent couples: the need for viral validation of processed semen. AIDS 2002; 16: 2267

60. Semprini AE, Fiore S. HIV and reproduction. Curr Opin Obstet Gynecol 2004; 16: 257
61. Public Law No. 184 of 1989, 5 May 1989. Annu Rev PopulLaw 1989; 16: 53
62. Rimm AA, et al. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. J Assist Reprod Genet 2004; 21: 437
63. Baccetti B, et al. HIV-particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte. JCellBiol 1994; 127: 903
64. UNAIDS. AIDS epidemic update: 2004. Geneva: UNAIDS, 2004
65. The Committee on Ethics of the American College of Obstetricians and Gynecologists. Human immunodeficiency virus: physicians' responsibilities. ACOG Committee Opinion No. 255- Washington, DC: AGOG, 2001
66. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Human immunodeficiency virus and infertility treatment. Fertil Steril 2004; 82 (Suppl 1): S228
67. Stern JE, et al. Access to services at assisted reproductive technology clinics: a survey of policies and practices. Am J Obstet Gynecol 2001; 184: 591

26

HIV Uygunsuz Çiftlerin Tedavisi: İtalyan Tecrübesi

Augusto E. Semprini, Lital Hollander

Çeviri: *Mutlu Kilciler*[*], *Güldem Kilciler*[**]

HIV-POZİTİF ERKEK ÇİFT İÇİN GÜVENLİ ÜREME SEÇENEKLERİ

Batı ülkeleri insan immun yetersizlik sendromunu (HIV/AIDS) gay erkeklerin ve intravenöz ilaç kullananların hastalığı olarak keşif etmiştir. Bununla beraber global HIV epidemisi önemli oranda heteroseksüel yolla tetiklenmektedir. Etkili antiviral tedavinin HIV'in seksüel ve vertikal geçişini azalttığı gösterilmesine rağmen[1-4], endüstrileşmiş ülkelerde heteroseksüel geçiş eğilimi artış göstermektedir[5-8]. Bu heteroseksüel geçişle enfekte olmuş kişilerin geç teşhis edilmesi, kendilerini risk olarak görmemeleri, testlerden kaçınmaları, seksüel partnerlerine enfeksiyonu taşıyabilmeleri gerçeğine bağlıdır. Diğer taraftan güvenli cinsel ilişkide bulunma oldukça aktif antiretroviral tedavi (HAART) alan HIV pozitif hastaların sayısını azaltabilir. Yine HIV negatif seksüel partnerler HIV enfeksiyonunu daha az enfeksiyöz yada tehlikeli olarak görebilirler[9].

HAART HIV pozitif erkeklerde hem yaşam kalitesini hemde hastalıksız dönemi uzatarak pek çok çiftin anne baba olmasını teşvik etmektedir. Kadın yada erkek olsun HIV ile enfekte insanlar daha uzun süre yaşamakta, pek çoğuda fertil yaşa ulaşmakta bu hastalara gebelikten kaçınmadan daha ziyade aile kurma arzusu ve anne baba olma isteği önerisi daha fazla vurgulanmalıdır.

Bu bölümde HIV geçişi ile ilgili ve HIV ile enfekte erkekte güvenli ebeveynlik ile ilgili kanıtlar tartışılmaktadır. Reprodüktif danışmanlık ve semen yıkanması ve yardımlı üreme tekniklerine (ART) hazırlık bu bireylere üreme yardımında bulunmada dönüm noktasını teşkil etmektedir.

AVRUPA'DA HIV ENFEKSİYONUN EPİDEMİYOLOJİSİ

Dünya sağlık örgütünün (WHO)ve Birleşmiş Milletlerin HIV/AIDS programının (UNAIDS) resmi rakamlarına göre Avrupa'da HIV ve AIDS'li bireylerin sayısı 2010000 milyon (hesaplanan aralık 1.40 ile 2.86 arasında)ve Avrupa'daki sıklığı ise %0.4 (%0.2 ile 0.6) arasında değişmekte idi[10]. Şekil 26.1; 2004 yılının ortalarına kadar saptanmış olan HIV hastalarının yıllık sayısını göstermektedir.

Avrupa'da bugünkü epidemiyolojik tablo HIV enfeksiyonun yayılımının artışı ve Doğu Avrupa'da antiretroviral tedaviye ihtiyacı olan kişilerin sayısının hızlı bir şekilde artmasıdır. Bu bölgede WHO ve UNAİDS göre 1 milyondan fazla insan etkilenmiş olup bu durum ülkelerin sosyal ve ekonomik gelişmelerine ve ulusal güvenliklerine gerçek bir tehdit oluşturmaktadır.

[*] Bursa Askeri Hastanesi, Kadın Doğum ve Hastalıkları Kliniği, Bursa.
[*] GATA Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara.

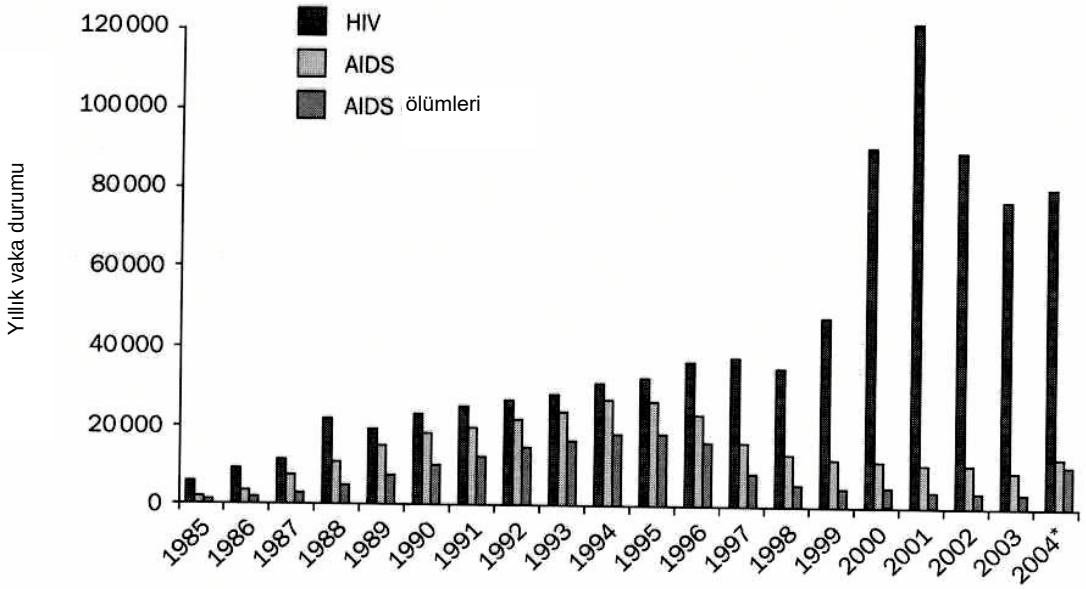
Avrupa'da HIV/AIDS ile yaşayan insanların sayısının sürekli artması hem yeni olarak kayda giren vakalara hem de enfeksiyon esnasında yaşamı uzatan antiretroviral tedavinin bulunabilirliğindeki artışa bağlıdır. HIV enfeksiyonun büyük çoğunluğu genç erkeklerde görülmektedir. Fransa, Almanya, İskandinavya ve Yunanistan'da baskın olarak homoseksüel ilişkiye bağlı olup, İtalya, İspanya ve doğu Avrupa'da ise çok yaygın olan ilaç kullanımına bağlıdır[10].

Bununla birlikte son yıllarda epidemilerde kadınların sayısı sürekli olarak artmıştır. 2003 yılında yeni kayıt olan kadınların oranı Batı Avrupa'da %37, doğu Avrupa'da ise %38 idi. Bu oranlar 1999 yılı ile karşılaştırıldığında sırası ile %31 ve %25 idi. Rusya ve Ukrayna gibi bazı Doğu Avrupa ülkelerinde çocuk doğurma çağındaki kadınlarda (15-49 yaşlar arasında) hastalıklı erkekle heteroseksüel erkekle ilişki sonrası enfekte olma oranı hemen hemen %50'dir.

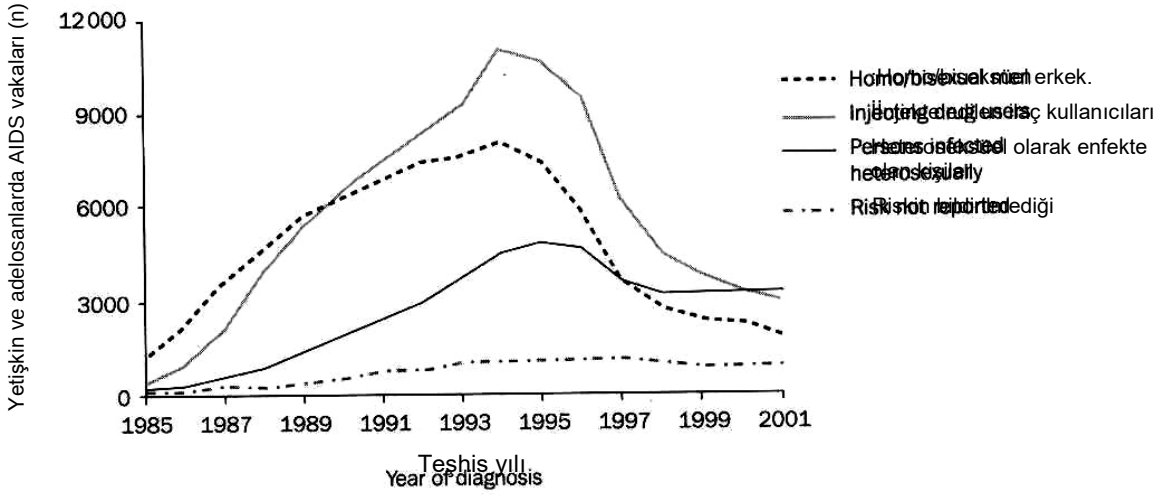
HAART uygulanan erkeklerde HIV'in seminal konsantrasyonu düşük olup, bu da seksüel geçişi azaltabilir. Bununla birlikte viremi olmayan erkeklerin belli bölümünde semende virus bulunabilmekte ve fertilizasyon için korunmasız ilişkiden vazgeçmeleri önerilmelidir. HIV uyumsuz çiftlerde erkek seropozitivitesi hakkında bilgi verilmeli ve sperm yıkanması ile semenden HIV'in temizlenebileceği ve seronegatif kadına risk teşkil etmeden gebe kalarak çocuk sahibi olmasına imkan verebileceği konusunda bilgilendirme yapılmalıdır.

HIV'İN HETEROSEKSÜEL YAYILIMI

Yeni yapılmış çalışmalar heteroseksüel populasyonun bugünlerde en sık enfeksiyona maruz kalan grup olduğunu göstermektedir. İngiliz kaynaklı takip çalışmasında 1997-2001 yılları arasında 15 ila 24 yaşları arasında 1624 gençte HIV teşhis edilmiştir. Bunların %55' i heteroseksüel olarak enfekte olmuşlardı[11]. Farklı uluslararası çalışmalar heteroseksüel enfeksiyonlarda artışı doğrulamaktadır[5-8]. Şekil 26.2 de Batı Avrupa'da enfeksiyonun geçiş eğilimlerindeki farklılıkları göstermektedir. İntravenöz ilaç kullanıcıları ve erkek erkeğe seks yapan grup gibi klasik risk gruplarında riskin azaltılması mümkündür. Aksine heteroseksüel geçişe bağlı enfeksiyonlar artma eğilimi göstermektedir.



Şekil 26.1: *Avrupa'da yıllık HIV infeksiyonlularının sayısı[10]. Tamamlanmamış ön veriler.*



Şekil 26.2: *Batı Avrupa'da maruz kalma şekline göre HIV geçişi. Veriler bildirilen gecikmelere göre ayarlanmıştır.*

Artmış heteroseksüel enfeksiyon sıklığı aynı zamanda HAART'nın mevcut olmasına bağlı olabilir. Yeni bir çalışmada, HIV pozitif kişilerin seronegatif stabl durumdaki heteroseksüel partnerlerinin %40'ında daha az enfeksiyon endişesi olduğunu ve riskli davranışlarında artma saptamışlardır[9]. Bu özellikle HIV uygunsuz çiftlerden gebe kalabilmek için kondom kullanımından kaçınanlarda tehlikelidir.

Epidemiyolojik çalışmalarda heteroseksüel kadınlarda risk artışının nedenleri nadiren vurgulanmaktadır. Bununla birlikte bu enfeksiyona maruz kalma kasıtlı olabilir. İki farklı dönem olan (1985 ve 1989) yılları ile (1993-1997) yılları arasında HIV testi yaptırmak isteyen kadın populasyonu ile yapılan İtalyan çalışmasında, gönüllü olarak çalışmaya katılanların HIV-1 enfekte erkek partnerlerin sayısında artış gözlenmiştir. (%8.7-36.5)[13]. Serokonversiyon olan 581 bireyin çalışmasında, serokonversiyon olan kadınların %56'sı seksüel partnerlerinin HIV pozitif olduğunu biliyorlardı.[14]. Diğer bir çalışmada ise gebelik süresi ile heteroseksüel olarak HIV'in geçişi araştırılmıştır. Başlangıçta ilaç kullanım öyküsü olmayan HIV negatif olan 449 kadının 30 aylık izleme periyodu süresince 4'ünde seropozitifleşme saptanmıştı. Serokonversiyon oluşan hastaların 3 tanesi gebe kalmış ve gebelik oranları ise genel populasyonun 5 katı idi[15]. Böylece HIV pozitif erkek partner ile ilişkiye girme ve gebe kalma girişimleri, kadınların HIV virüsüne maruz kalmasına yol açan faktörler arasındadır.

HAART'nin uygulamaya girişi ve yoğun önleme kampanyaları ile yüksek risk gruplarının hedef alınması bu epidemik tabloda değişmeye katkıda bulunabilir. Gerçekte heteroseksüel bireyler kendilerini düşük risk grubunda görmekte ve güvenli cinsel ilişki tavsiyesini dikkate almamaktadırlar. Gönüllü olarak test grubuna dahil olma bu grupta daha az idi. İspanya'da 30000 AIDS vakasının 1994-1996 yılları arasındaki analizi sonucunda 1994-1996 yılları arasında geç test yaptıranların oranı %24 iken 1994-1996 yılları arasında ise %35 bulunmuştu. Testin geç yaptırılması birbirinden bağımsız olarak erkek seks, AIDS insidansının düşük olduğu bölgelerde yaşayanlarda ve ilaç kullanımı öyküsü olmayan ve hapishanede kalmamış olma ile ilişkili bulunmuş idi.[16].

YÜKSEK ETKİLİ ANTİRETROVİRAL TEDAVİNİN SEMEN VİRUS SALINIMI ÜZERİNE ETKİSİ

Etkili antiretroviral tedavi virus çoğalmasında belirgin azalma ve kan HIV-RNA konsantrasyonunda haftalar içinde düşmeye yol açmaktadır. Tedaviye bağlı kalan hastalar sürekli olarak aviremik kalmaktadırlar. Düzenli şekilde HAART alan heteroseksüel çiftlerde her korunmasız ilişki için enfeksiyon bulaşma riskini hesaplamak mümkün değildir. 415 HIV uyumsuz Uganda'lı çiftin longitüdinal çalışmasında, erkeğin viral yükü 1500 kopya/ml den az olduğunda serokonversiyon sap-

tanmamış, viral yük 38500 kopya/ml veya üzerinde olduğunda ise her ilişki için bulaşma olasılığı 0.0023'e çıkmıştır[17]. HAART'nin yaygın olduğu 1994-1999 yılları arasında HAART tedavisi ile gay çiftlerde parnerler arası enfeksiyonun bulaşmasının %60 azaldığını gösteren çalışma verileri HAART'nin HIV enfektivitesini azalttığını desteklemektedir[1].

Serolojik olarak uyumsuz çiftlerdeki seksüel geçiş olasılığı düz bir şekil izlememekte, bazı enfekte bireyler virüsün transferinde daha etkili (yüksek bulaştırıcılar), bazı kadınlar ise enfeksiyona daha hassastırlar[18]. HIV'in erkekten kadına transferi muhtemelen semendeki virüs miktarına bağlı olup, diğer faktörlerde enfeksiyon olasılığını etkileyebilirler[19-21]. Sürekli enfektivite modelini öneren çeşitli çalışmalar çok az ilişkinin enfeksiyon riskini düşük gösterdiğini, fazla sayıda ilişki ile ise riskin yüksek olarak hesaplandığını göstermektedir[22]. Ayrıca uzun süre gebe kalamayan çiftlerde her korunmasız ilişki sonrası enfeksiyon riskini değerlendirilirken ilişki sıklığı ve beraberinde bulunan HAART' ye uyum, muhtemel tedaviye ara vermeler, viral başarısızlığın saptanamaması gibi eşlik eden faktörler göz önünde tutulmalıdır değerlendirilmelidir.

Semende HIV seminal lökositler içersinde hücreye bağlı formda veya hücreden bağımsız olarak seminal plazma içersinde bulunabilir. Pek çok çalışmada HAART'nin, tedavi edilen bireylerin semenindeki HIV-RNA ve DNA üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Çok sayıda hastada kandaki viral yükteki düşme seminal plazmadaki ile beraber seyreder. Bununla birlikte HIV viremisinin düşük yada saptanamadığı erkekler hala semenlerinde önemli oranda virus ekskresyonu göstermektedirler[23,24].

Bujan ve arkadaşları[24] 67 HIV pozitif olan ve sperm donasyonu yapan erkeklerde (üreme sağlığı tedavisinin parçası olarak) virosperminin sıklığını değerlendirmişlerdir. Erkeklerin %73'ü sürekli olarak HIV (-) olmasına rağmen, %29'unda en azından bazı seminal örneklerde HIV mevcut, 2 örnekte ise (%3) sürekli HIV mevcut idi. Bu bulgular kanda saptanamayacak oranda viral yük mevcut olan hastaların enfeksiyöz olmadığı şeklindeki yeni görüşe zıttır. Bu daha önceki bulguları[19] destekler şekilde sürekli enfektivite kavramının doğru olmadığını ve erkeklerin etkili bulaştırıcılar ya da etkisiz olarak kategorilere ayrılması gerektiğini desteklemektedir.

Seminal viral yük aynı bireyde bile değişebilecek şekilde değişkenlik gösterebilir. Yukarıdaki çalışmada[24], sürekli olarak düşük plazma viral yükü mevcut olan erkeklerde semende asemptomatik HIV yüksekliğinden yüksek oranda enfeksiyöz konsantrasyonlara kadar (300000 kopya /ml)artış gözlenmiştir. Virusun seminal ekskresyonu ile ilgili faktörler CD4 hücre sayısı, HIV viremisi ve tedavi tipi gibi HIV ile ilişkili olabilir. Bununla birlikte en fazla korelasyon sekresyon riskini dört kat artıran seminal lökositlerin bulunması gibi seminal özelliklerde gösterilmiştir. ($p< 0.001$)

Bu bulgular özellikle HIV uygunsuz çiftlerde kondomu düzenli kullanmama eğilimi olanlarda geçerli olup, bu kişilerde kanda viral süpresyonun seronegatif bireylere infeksiyonun bulaşmasına karşı kesin koruyucu olduğu veya az sayıda ilişkinin minimal enfeksiyon riskine yol açtığı dair hatalı inanışı göstermektedir.

HIV ENFEKSİYONLU HASTALAR İÇİN ÜREME SAĞLIĞI SERVİSLERİ

HIV ve AIDS'in hızlı yayılımı kişilerin hayatını pek çok şekilde etkilemiştir. Çocuk doğurma ve HIV ile yaşama dinamik ve kompleks bir süreç olup, tek ideal bir yaklaşım tarzı ortaya koymak uygun olmayıp aynı zamanda imkansızdır.

Üremenin engellenmesi için dizayn edilmiş olan bazı kontraseptif metodların şimdilerde HIV ve diğer seksüel geçişli hastalıklara karşı koruma amaçlı olarak etkili olduğu görünmektedir. Kondom kullanımı ile ilgili tartışmalar bugünlerde istenmeyen gebeliklerden daha fazla enfeksiyonun önlenmesi üzerinde odaklanmaktadır. Bununla beraber HIV mevcut olan her iki cins çocuk sahibi olmayı arzu edebilir ve HIV'in seksüel ve vertikal geçiş yollarını öğrenmek için öneriye ihtiyaçları olabilir.

HIV ve üreme sağlığı merkezlerinin bütünleşmesi hakkındaki bilgiler halen sınırlıdır. Özellikle gebelik girişimleri esnasında HIV (-) eşlere seksüel geçişin önlenmesi ve HIV (+) anneden çocuğa enfeksiyon geçişini engelleyen üreme sağlığı programları son derece gereklidir[25]. Sağlık hizmeti verenlerin HIV (+) bireylerin danışmanlığa ve seksüalite ve anne babalık konusundaki seçenekler için destek ve aktif yardım konusunda ihtiyaçlarının olabileceğini önceden tahmin edebilmelidir. Ayrıca üreme sağlığı programları HIV (+) bireylerde ebeveynlerin sağlığını optimal düzeyde tutmak için ayrıntılı antiretroviral tedavi seçeneklerini içermeli ve sunmalıdır. Böylece HIV/AIDS ve üreme merkezleri arasında olumsuz sonuçların azaltılabilmesi için bağlantı kurulmalıdır.

Üreme ve HIV merkezlerinde hizmet verenler HIV (+) pozitif bireylerin üreme sağlığı ile ilgili olumlu yaklaşım sergilemelidir. HIV (+) bireylerde cinsel sağlığı destekleyen girişimler, güvenli seksüel davranışı engelleyen faktörlerin saptanıp üstesinden gelinmesini ve HIV'li birey antiretroviral tedavi alırken enfeksiyon bulunmayan partnere HIV geçişi konusunda eğitimi içermelidir. Ayrıca seksüel yolla geçen hastalıkların (STI) önlenmesi hususunda bilgilendirme ve tavsiye, uygun ve doğru prezervatif kullanımı ve güvenli üreme seçenekleri konusunda eğitimi de içermelidir.

PREZERVATİF

HIV açısından uygunsuz çiftlerdeki çalışmalarda gösterildiği şekilde erkek lateks prezervatifleri uygun ve etkili kullanıldığı zaman HIV'in hem kadından erkeğe hem de erkekten kadına geçişini önlemektedir[26]. Ayrıca prezervatifler HIV ile yeniden enfeksiyon oluşmasına karşı koruyucu özellik göstermektedir. Sınırlı verilere göre birden fazla HIV tipi ile ortaya çıkan enfeksiyon HIV hastalığının ilerlemesini hızlandırabilir[27].

Laboratuar çalışmaları erkek lateks prezervatiflerinin en küçük virüslerde dahil olmak üzere genital sekresyonlardaki enfeksiyoz ajanlara karşı geçirgen olmadığını göstermiştir. Sadece ciltten cilde temas ile taşınan herpes, human papilloma virüs ve sfilis gibi STI'lerde kondomun etkinliği düşük olmasına rağmen diğer STI'lere karşıda koruma sağlamaktadır[28].

Prezervatiflerin kullanımı gebelik, infertilite, sterilizasyon sonrası veya postmenopozal kadınlarda olduğu gibi gebeliğin önlenmesinin önemli olmadığı diğer tüm durumlarda tavsiye edilmelidir. Uygunsuz serolojisi olan çiftlere özel destek verilmelidir. Seksüel olarak aktif HIV (+) ve HIV (-) çiftlerde ilişkide kondom kullanımı seksüel partnerin enfekte olmaması için tek yoldur.

Kondomun etkinliği konusundaki kanıtlara rağmen, HIV'in sık rastlandığı bölgelerde kondom kullanımını engelleyen önemli faktörler halen mevcuttur. Bunlar arasında prezervatif kullanımına karşı olumsuz inanışlar ve prezervatif elde etmede güçlük ve politik taahhütlerin yetersizliği sayılabilir. Seksüel partnerlere HIV durumlarının bildirilmesine rağmen kondom kullanımının düşük olduğu bildirilmiştir[29].

HIV UYUMSUZ ÇİFTLERDE SPONTAN VE YARDIMLI GEBELİK KARŞILAŞTIRILMASI

HIV uygunsuz çiftlerde teorik olarak tek bir ilişki ile enfeksiyon riskinin az olması, ampirik olarak gebelik için planlı ilişki önerilen çiftlerde kondom kullanımından kaçınılmasına yol açabilir. 1997 yılında Fransız grubu gebelik isteyen korunmasız ilişki mevcut olan 96 HIV uyumsuz çiftin gözlem bulgularını yayınlamışlardı. Genel olarak değerlendirildiğinde 104 gebelik elde edilmiş, gebeliğin 7.ayında ve postpartum 2. ayda iki serokonversiyon saptanmıştır[30]. Bu enfeksiyon oranı HIV uygunsuz çiftlerdeki[17] heteroseksüel geçişin değerlendirildiği çalışmalardakinden yaklaşık 8 kat yüksektir. Serokonversiyon saptananlarda uygun olmayan kondom kullanımı bildirilmesine rağmen makalede bunun nedenleri tartışılmamıştır. Bu çalışma 1986 ve 1996 yılları arasında yapılmış olup, sadece 21 erkek tahmin edilebileceği şekilde HAART'den farklı antiretroviral tedavi alıyordu[30].

Cinsel öyküsü üreme ile ilgili danışmanlık isteyen HIV uyumsuz çiftlerde gerçek seksüel geçiş riskini gösterebilmesi nedeni ile öykü ayrıntılı olarak alınmalıdır. Paradoks olarak düzenli prezervatif kullanan çiftler uzun süreli korunmasız ilişki olan ve enfeksiyonu bulaştırmayan çiftler ile karşılaştırıldığında sürekli kondom kullanan çiftlerde temel bir yüksek bulaştırma riski mevcuttur. Böylece cinsel hayatın başlangıcından beri düzenli olarak kondom kullananlarda erkeğin potansiyel olarak yüksek düzeyde bulaştırıcı olabileceği vurgulanmalıdır.

Bununla birlikte bu öneri konsepsiyon için çiftlere güvenli alternatif seçenekler sunulabilmesi ile beraber olmalıdır. Klinisyenler HIV uygunsuz çiftlerin çocuk isteğinden vazgeçirilmesinin etkili olduğu tarzında yanlış bir inanışa sahip olup, bu nedenle çiftler kondom kullanımına sıkı sıkıya bağlı kalacaklardır. Aksine, Kaliforniya Partner Çalışması II'deki 104 heteroseksüel 104 HIV uyumsuz çiftlerin 2/3'ünden fazlasında, partnerleri ile son 6 ayda korunmasız ilişki olduğu bildirilmiştir[9]. 114 HIV (+)'li bireyle yapılan ve fertilite isteği ve kondom kullanımını değerlendiren İsveç kaynaklı çok merkezli çalışmada, pozitif kadınların %45'i, pozitif erkeklerin ise %38'i çocuk istekleri olduğunu belirtmişlerdi. Ayrıca çalışmaya katılanların %73'ünü geçmeyecek şekilde sürekli kondom kullanımı bildirilmiştir[31].

Daha önceki hastalarımızın inseminasyon sonrası davranış ve yaşam kalitesini değerlendirdiğimizde, semen yıkaması yapılıp gebe kalamayan çiftlerin yaklaşık yarısı kendi davranış şeklini oluşturup kondom kullanımından kaçınmışlardı. Gebelik oluşması sonrası tüm çiftler alışkanlık olarak kondom kullanımına dönmüşlerdi. Aksine tedavilerimizle gebe kalan çiftlerde ise güvenli cinsel birlikteliği uyum oranı yüksek idi.

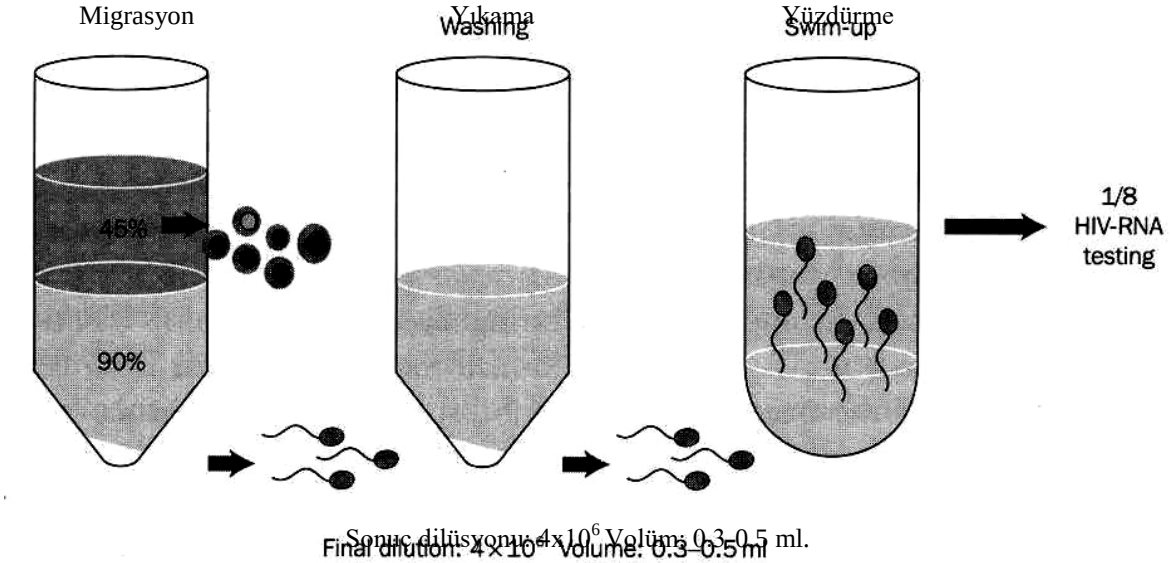
SEMEN YIKANMASI

Semen yıkaması yoğunluğa göre yapılan santrifüj, yıkama işlemi ve spontan migrasyon içeren üç aşamalı semen işleme metodunu tanımlamak için kullanılır. Yaklaşık olarak 15 yıl önce Milan'da tasarlanmış olup, Lancet dergisinde enfekte olmayan annelerdeki 10 sağlıklı çocuğun doğumu ilk kez yayınlanmıştır[32].

Spesifik semen yıkama metodu 3 aşamalı bir sistem olup, ilk olarak likefiye semen yoğunluğa göre filtre olur, daha sonra toplanan spermatozoa yıkanarak seminal plazma ve hiperosmotik gradient media ayrılır. Takiben modifiye swim-up yöntemi ile yoğunluğa göre ayırma ile lökositlerden temizlenmiş motil spermatozoa elde edilir (Şekil 26.3). Anderson ve arkadaşları bu işlem ile motil sperm fraksiyonunun %0.1 olan semeninkinden de daha aza düştüğünü ve in vitro olarak bu sperm kısmının periferal kan lenfositleri için enfeksiyoz olmadığını göstermişlerdi[33].

Programa ulaşmak için korunmasız ilişkiden uzak durma dışında herhangi bir klinik veya immunolojik hariç tutma kriterleri önerilmemiştir. Metod orijinal olarak riskin azaltılması yöntemi olarak doğmuş ve immun yetersizliği olanlar gibi en çok bulaşabilme riski olan hastalarda daha çok gereklidir. Aslında HAART'nin immunolojik ve virolojik markırlar üzerindeki etkisine ait veriler 1997 yılına kadar İtalya'da mevcut değildi. Gerçekte tüm erkekler programın ilk altı yılında aktif antiretroviral tedavi almıyordu. Bugüne kadar yardıma ulaşabilme sınırlanmamış olup bu özellikle viral replikasyonun ilaç tedavisi gerektirmediği, yapısal ve diğer tedaviye ara verme, tedaviye uyumu düşük olanlarda veya başarısız antiretroviral tedavi alanlarda geçerlidir.

Aynı şekilde yıkanmış spermatozoa solüsyonunda virus varlığının saptanması için polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kullanılmaya başlandığı 1995 yılına kadar yaklaşık 500'e yakın sperm yıkama ve intrauterin inseminasyon (IUI) uygulaması yapılmıştır. Böylece yıllarca potansiyel olarak enfeksiyoz semen örnekleri, her yıkama işleminin etkinliği doğrulanmadan kullanılmıştır. Bugüne kadar hiçbir kadında serokonversiyon gözlenmemiştir[34].



Şekil 26.3: *Sperm yıkama işlemi.*

Halen sperm yıkama işlemi uygulanan tüm yardımla üreme programlarına iştirak eden çiftler hiçbir riskin olmadığı konusunda bilgilendirilmelidir ve onayları alınmalıdır. Sonuçları değerlendirmek için her yardımla üreme siklusu sonrası gebe kalanlarda bir yıl boyunca 3'er ay aralar ile HIV serolojik testini yaptırması istenmektedir.

Yukarıdaki çalışmalara kadar, Avrupa'da (İngitere, Fransa, İspanya, Almanya, İsviçre, İsveç, Hollanda, Belçika, Danimarka, Polonya) benzer programlara başladılar, diğer ülkeler ise gelecekte başlamayı planladılar. Sperm yıkama ve takiben yapılan yardımla üreme tekniklerinin etkinliği ve güvenirliği ile ilgili kanıtları geliştirmek için bu işle ilgili merkezler CREAThE (Avrupa'da HIV'li çiftlere yardımla üreme teknikleri sunan merkezler) kurmuşlardı. Bu ağ HIV ve diğer seksüel geçişli enfeksiyonlardan olan hepatitis C (HCV), sitomegalovirus (CMV) gibi seksüel geçişli hastalıkları olan çiftlere üreme konusunda yardımcı olmaktadır.

CREAThE açık bir ağ sistemi olup, en az bir partnerin HIV'li olduğu çiftlere hizmet sunmak isteyen yada bu konuda istekli olan yeni katılacak merkezleri kabul etmektedir. CREAThE yardımla üreme alanının gerçeklerine göre çalışan tipik bir merkezdir. Bu merkez 9 Avrupa ülkesinden 13 aktif üyeyi içermektedir. Bugünlerde CREAThE merkezleri semen yıkamanın etkinliği ve güvenirliği ile ilgili ortak tedavi verilerini birleştirmişlerdi. Tablo 26.1 bu analizin sonuçlarını özetlemektedir.

Bugüne kadar İtalya'da 5000 sperm yıkama ve sonrasında intrauterin inseminasyon veya in vitro fertilizasyon işlemi yapılmıştır. Bu yukarıdaki merkezlerden hiç birisinde annenin serokonversiyonu yada enfekte bebeğin doğumu bildirilmemiştir.

HIV uyumsuz çiftlerdeki tedavinin güvenli ve risk azaltılmasında etkili olduğunun bulunması daha sonra oldukça seçkin dergilerdeki ünlü uzmanlar tarafından yapılan yayınlar ile doğrulanmıştır. Bu veriler sadece HIV uyumsuz çiftlere yardımlı üreme metodlarının sunulmasını sağlamamakta aynı zamanda HIV'li çiftlere gebe kalmamanın önerilmesinin bilimsel ve etik yönden kabul edilemez olduğunu göstermektedir[35-37].

SPERM YIKAMA İLE BİRLİKTE YARDIMLI ÜREME

Çiftler programa dahil olmadan önce bebek yada gebeliği ters yönde etkileyen HIV'in bulaşma riskini artıran infertilite faktörleri, enfeksiyoz hastalıkların ekarte edilmesi veya teşhisi için ayrıntılı olarak taramaya tabii tutulmalıdır.

Tablo 26.1: *CREAThE (Avrupada HIV'li çiftlere Reproduktif Yardım Teknikleri sağlayan Merkezler) 31 Aralık'tan 2002 tarihinden önce yapılan semen yıkama ve yardımlı üreme teknolojilerinin retrospektif incelenmesi (yayınlanmamış veriler)*

	Çiftler (n)	Sikluslar (n)	Gebelikler (n)	Düşükler (n)	Canlı doğumlar (n)	Devam eden (n)
IUI taze sperm	1373	3693	524	79	427	59
IUI dondurulmuş sperm	142	397	62	13	47	7
IVF-ET/ICSI	254	361	117	17	42	27
ET dondurulmuş	16	18	2	0	0	2
Total	1785	4469	705	109	516	95

IUI, intrauterin inseminasyon, IVF-ET invitro fertilizasyon –embryo transferi;ICSI, intrastoplazmik enjeksiyon

Enfeksiyon ile ilgili tarama gözönüne alındığında, kadınlardan Klamidya, Üreoplazma ve Mikoplazma enfeksiyonlar için servikal sürüntü; bakteriyel enfeksiyonları değerlendirmek için ise vajinal sürüntü örnekleri istenir. HIV, hepatit B (HBV), HCV, sfilis,CMV ve rubeola antikorlarının tespiti için kan testleri yapılır. IUI adayı olan hastalarda Papanicolaou (PAP) testi ve tubal açıklığı değerlendirmek için histerosalpingografi yapılması gerekli olan jinekolojik testlerdendir; alternatif olarak in vitro fertilizasyon adayı olan hastalarda histeroskopi yapılır. Fertilitenin değerlendirilmesi troid stimule edici hormon (TSH), luteinize edici hormon (LH), folikül stimule edici hormon (FSH) ve 17-beta östradiolün menstruel siklus esnasında yada siklusun 22 ile 24 günlerinde progesterone ve prolaktin ölçümü yapılarak tamamlanır.

Erkekte yapılabilecek olan enfeksiyon hastalık testleri ise Klamidya, Üreoplazma ve Mikoplazma için üretral sürüntü örneği ve bakteriler için sperm kültürüdür. HBV, HCV, sfilis ve CMV antikor testlerine ek olarak klinik değerlendirme HIV kan viremisi, HCV pozitif erkek için HCV viremisi ve HIV ile ilişkili iyilik halini belirleyen CD4 ve CD8 hücre sayılarının değerlendirilmesi ve antiretroviral tedavi anamnezini içerir. Erkek fertilite değerlendirmesi testesteron, LH, FSH ile yapılabilmesine rağmen başlıca sperm yıkanmasını sonrası yapılan spermiogram özelliklerine göre yapılır.

Yardımla üreme tedavisinde sperm yıkama sonrası intrauterin transfer veya in vitro fertilizasyon yapılır. İn vivo yada in vitro fertilizasyon endikasyonu çiftin fertilite potansiyeli ile belirlenmelidir. HAART tedavisi olup olmamasına bakmasızın, in vitro fertilizasyon veya intrastoplazmik enjeksiyonun intrauterin inseminasyona göre daha güvenli olduğunu gösteren kanıtlar mevcut değildir. Dahası, akrosomal membran spontan sperm yumurta etkileşimi esnasında çıkarıldığından ICSI oositin sitoplazması içindeki eksternal akrozomal membrana bağlı viral partiküllerin muhtemel geçişini artırabilmektedir. Sonuçta sperm yıkanmasının inseminasyon yada in vitro fertilizasyon ile takip edilmesi sağlıklı klinik değerlendirmeye dayanmalıdır. Bunun yanında lojistik faktörler, çiftlerin ekonomik durumlarına ve duygusal durumlarına da bağlıdır. Çiftlere ulaşamayacağı yardımla üreme programının sunulması spontan gebe kalmayı tek seçenek olarak bırakır. HIV epidemisinin epidemiyolojisi düşünüldüğünde çok az çifte pahalı prosedürlerlerin sunulması ile yapılan seçme işlemi çocuk isteği olan HIV ile enfekte pek çok çiftin dışlanmasına yol açabilir[38].

4 farklı ART seçeneğinin endikasyonları;

Spontan ovulatuvar siklusta İntrauterin İnseminasyon (IUI) Her iki eşin fertil, kadın eşin 35 yaşında olduğu ve hormonal bozukluk olmayan; sperm yıkanması sonrası erkeğin sperm örneğinde motil spermatozoa sayısının ml de 1.5 milyon üzerinde olması durumunda kullanılır. Her siklus için konsepsiyon şansı %15'dir.

Multipl foliküler büyümenin stimule edilmesi ile birlikte uygulanan IUI kadın eşin 35 yaş üzeri olması, çiftin 3 kez spontan siklus sonrası gebe kalınamadığı durumlarda, çiftin merkezden uzak olması ve lojistik nedenlerden dolayı gebelik şansının artması arzu edilen durumlarda çiftlere tavsiye edilir.

IVF-ET Fallop tüplerinin darlığı endometriozisde dahil olmak üzere kadın infertilitesi mevcut olduğunda yapılması gerekmektedir. Erkeğin sperm örneği ml'de 1.5 milyondan fazla spermatozoa içermelidir. IVF aynı zamanda tekrarlanan inseminasyonlara rağmen gebelik elde edilemeyen çiftlerde kullanılır. Bu durumda da yanı sıra sperm yıkamasından sonra ml'de 1.5 milyondan fazla spermatozoa bulunmalıdır. Her siklus için gebelik oranı %25'dir.

IVF-ET/ ICSI Total motil spermatozoa sayısının ml'de 1.5 milyondan az olduğu erkek infertilite olguları; motilite de ciddi azalma olan olgularda yada immotil spermin mevcut olduğu durumlarda gerekmektedir.

HIV UYUMSUZ ÇİFTLERDE FERTİLİTE

Gebe kalmak isteyen çiftler haftada ortalama iki kez ilişkiye girerlerse ortalama 5.2 ayda gebelik oluşmaktadır. Ancak 12. ayın sonunda fertilizasyon oranı bir sonraki yıl için %7'den daha az olmaktadır. HIV uyumsuz çiftlerde, bu şekilde gebe kalma girişimleri kadın eşe HIV geçişi riski nedeni ile kontrendikedir.

Genel populasyonda 1 yıllık korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalamama olarak tanımlanan infertilite sıklığı yaklaşık %10'dur. HIV uyumsuz çiftlerde HIV'in seksüel olarak geçme riski nedeni ile benzer sonuçlar elde edilememektedir. Yardımla üreme programının ilk yıllarında infertilite oranı intravenöz

ilaç kullanımından heteroseksüel populasyona doğru geçişe paralel olarak değişse de bu çiftlerde daha fazla infertiliteden sorumlu faktörler mevcut idi (Tablo 26.2). 1989 ve 1995 yılları arasında programa dahil olan erkeklerin %85'i daha önceki intravenöz ilaç kullanıcıları idi. Bu erkeklerde genital enfeksiyon sıklığı %50'den fazla olup, muhtemelen bu kadın eşlerdeki %10 tubal hasar sıklığını açıklamaktadır. O dönemde herhangi bir antiretroviral tedavi mevcut değil ve erkeğin klinik durumu stabil değildi. Bu tarışmalı durum kadınlarda büyük ihtimalle stress seviyesinin yüksekliğine bağlı idi ve anovulatuar siklusların %20 olan oranını izah etmekte idi.

Pek çok erkeğin heteroseksüel olarak enfekte olduğu mevcut epidemiyolojik tabloda pek çok erkek HAART'ye bağlı olarak iyi klinik tabloda bulunmaktadır. İnfertilite faktörü dağılımı ise sık rastlanan seminal sayının azlığı dışında genel populasyon ile artmış oranda benzerlik göstermektedir.

Hiç bir longitudinal çalışma HIV enfeksiyonunun klinik durumda bozulma ve düşkünlük olmadığı sürece kesin olarak tek başına dispermiye yol açtığını göstermemiştir. Bununla birlikte teorik olarak HAART inverse transkiptase inhibitörleri olan nükleosid antiretrovirallerin başta gelen yan etkilerinden birisinin mitokondrial toksisitede olduğu şekilde seminal motiliteyi etkilemektedir. Başlangıçtaki kanıtlar HAART tedavisi alan erkeklerin periferal kan mononükleer hücrelerinde mitokondrial RNA miktarında önemli oranda azalma göstermişti. Bu sperm motilitesini bozabilir[39]. İn vivo olarak spontan konsepsiyon durumunda yada yardımla üremede gebelik oranlarını düşürmektedir. Bu etki özellikle semen yıkanması durumunda belirgin olup işlem ile sonuçta sadece yüksek motiliteye sahip spermler seçilebilmektedir.

Böylece herhangi bir ilişkinin enfeksiyon ile sonuçlanabildiği ve kendi kendilerine gebe kalmaya çalışan çiftlerde en azından basit infertilite testlerinin yapılması tavsiye edilmeli ve sperm yıkama ile beraber yapılan yardımla üremenin koruyucu etkisi olduğu tavsiye edilmelidir.

SONUÇLAR

HIV ile enfekte erkeklere sperm yıkama ve oldukça yüksek etkili olan antiretroviral tedavi uygulanması, tıbbi olarak kontrollü çocuk sahibi olma seçeneğinin sunulmasında esas teşkil etmektedir. HAART kan ve seminal virüs sayısını düşürerek enfeksiyon potansiyelini azaltmakta, sperm yıkama işlemi ise semen enfeksiyon bulaştırma potansiyelini düşürmektedir.

Günümüz gerçeklerinde HIV ile enfekte olup sağlıklı ve uzun süre yaşayan bireyler HAART ile sunulan uzun süreli viral supresyona teşekkür etmektedirler. Bu bireylerde uzun dönem projelerden olan anne baba olma arzusunu enfekte olan bireylerin büyük kısmında mümkün hale getirmiştir. Bu çiftlere en iyi seçeneğin sunulmasını medikal ve etik olarak haklı hale getirir. Aynı zamanda bu çiftlere medikal yardımlı üremenin yapılmamasının çocuk sahibi olmama yada bu çiftlerin spontan olarak gebe kalma yolunu seçmelerine yol açacağı akılda bulundurulmalıdır.

Tablo 26.2: *Sperm yıkama ve yardımlı üreme teknolojileri (ART) uygulanan HIV açısından uygunsuz çiftlerde infertiliteye yol açan faktörlerin sıklığı (yazarın verileri)*

İnfertilite faktörü	**Sıklık (%)**
Erkek genital sistem enfeksiyonu	47
Kadın genital sistem enfeksiyonu	29
<1.5 milyon/ml motil spermatozoa	16.5
Hiperprolaktinemi	14
Tek yada çift taraflı tubal hasar/tıkanıklık	12
Anovulatuvar sikluslar	10
Uterin kavite anomalileri	7
Endometriosis	1.5.

KAYNAKLAR

1. Porco TC, et al. Decline in HIV infectivity following the introduction of highly active antiretroviral therapy. AIDS 2004; 18:81
2. Shaffer N, et al. Short-course zidovudine for perinatal HIV-1 transmission in Bangkok, Thailand: a randomised controlled trial. Lancet 1999; 353: 773
3. Guay L, et al. Intrapartum and neonatal single-dose of nevirapine compared with zidovudine for preven-don of mother-to-child transmission on HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. Lancet 1999; 354: 795
4. Thorne C Fiore S, Rudin C. Antiretroviral therapy duting pregnancy and the risk of an adverse outcome [Comment]. N Engl J Med 2003; 348: 471
5. Cederfjall C, et al. Gender differences in perceived health-related quality of life among patients with HIV infection. AIDS Patient Care STDS 2001; 15: 31
6. CDC. Recommendations of the US Public Health Service Task Force on the use of zidovudine to reduce perinatal transmission of human immunodeficiency virus. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1994; 43: RR-11
7. Hamers EF, Downs AM. HIV in central and eastern Europe. Lancet 2003; 361: 1035
8. Rotily M, et al. Factors related to delayed diagnosis of HIV infection in Southeastern France. EVALVIH group. IntJ STD AIDS 2000; 11: 531
9. Van der Straten A, et al. Sexual risk behaviors among heterosexual HIV serodiscordant couples in the era of post-exposure prevention and viral suppressive therapy. AIDS 2000; 14: F47
10. UNAIDS. 2004 Report on the global AIDS epidemic. Executive Summary. Geneva: UNAIDS, 2004
11. Dougan S, et al. Epidemiology of HIV in young people in England, Wales and Northern Ireland. Commun Dis Public Health 2004; 7: 1 5
12. www.eurohiv.org
13. Giuliani M, et ai. Screening for HIV-1 infection targeted to women at a center for sexually transmitted diseases (STD). Comparison between 2 periods of 5 years of work. Minerva Ginecol 2000; 52 (Suppl 1): 34
14. Klevens RM, et al. Knowledge of partner risk and sec-ondary transmission of HIV. Am J Prev Med 2001; 20: 277
15. Chirgwin KD, et al. Incidence and risk factors for heterosexual!/ acquired HIV in an inner-city cohort of women: temporal association with pregnancy. J Acquir Immune Defic Synd Hum Retrovirol 1999; 20: 295
16. Cascilla J, et al. Late diagnosis of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy: consequences for AIDS incidence. AIDS 2002; 16: 1945
17. Gray RH, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. Lancet 2001; 357: 1149
18. Louria DB, et al. HIV heterosexual transmission: a hypothesis about an additional potential determinant. Int J Infect Dis 2000; 4:110
19. Chakraborty H, et al. Viral burden in genital secretions determines male-to-female sexual transmission of HIV-1: a probabilistic empiric model. AIDS 2001; 15:621
20. Mayer KH, Anderson DJ. Heterosexual HIV transmission. Infect Agents Dis 1995; 4: 273
21. Taylor S, Boffito M, Vernazza PL. Antiretroviral therapy to reduce the sexual transmission of HIV [in Process Citation]. J HIV Ther 2003; 8: 55
22. Downs AM, De Vincenzi I. Probability of heterosexual transmission of HIV: relationship to the number of. unprotected sexual contacts. European Study Group in Heterosexual Transmission of HIV. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1996; 11:388
23. Vernazza PL, et al. Potent antiretroviral treatment of HIV-infection results in suppression of the seminal shedding of HIV. The Swiss HIV Cohort Study. AIDS 2000; 14: 117
24. Bujan L, et al. Factors of intermittent HIV-1 excretion in semen and efficiency of sperm processing in obtaining spermatozoa without HIV-1 genomes. AIDS 2004; 18: 757
25. World Health Organization. Progress in Reproductive Health Research, No. 48. Geneva: WHO, 1998
26. Weller S, Davis K. Condorn effectiveness in reducing heterosexual HIV transmission. Cochrane Database Syst Rev 2002; (1): CD003255
27. Gottlieb GS, et al. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. Lancet 2004; 363: 619
28. World Health Organization. Progress in Reproductive Health Research, No. 59. Geneva: WHO, 2002
29. Norman LR. Predictors of consistent condom use: a hierarchical analysis of adults from Kenya, Tanzania and Trinidad. Int J STD AIDS 2003; 14: 584
30. Mandelbrot L, et al. Natural conception in HlV-negative women with HIV-infected partners. Lancet 1997; 349: 850
31. Panozzo L, et al. High risk behaviour and fertility desires among heterosexual HIV-positive patients

with a serodiscordant partner — two challenging issues. Swiss Med Wkly 2003; 133: 124

32. Semprini AE, et al. Insemination of HTV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. Lancet 1992; 340: 1317
33. Anderson DJ, et al. Efficacy of conventional semen processing techniques in separation of motiie sperm from HIV-1 and HIV-1 host cells. Presented at the 48th Annual Meeting of the American Fertility Society, New Orleans, November 1992; Abstr book: 107, P213
34. Semprini AE. Semen washing in ART for uninfected women with HIV-positive partners. Presented at the 56th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, San Diego, October 2000
35. Gilling-Smith C, Smith JR, Semprini AE. HIV and infertility: time to treat. There's no justification for denying treatment to parents who are HIV positive. Br Med J 2001; 322: 566
36. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Human immunodeficiency virus and infertility treatment. Fertil Steril 2002; 77: 218
37. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Commirtee Opinion 255. HIV: Ethical guidelines for obstetricians and gynecologists, April 2001. Washington, DC: ACOG, 2001
38. Peria JE, et al. Providing assisted reproductive care to male haemophiliacs infected with human immunodeficiency virus: preliminary experience. Haemophilia 2003; 9: 309
39. Miro O, et al. Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood rnononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy. Antivir Ther2003; 8: 333

27

Homolog ve Donör Spermin Kullanıldığı Artifisyel İnseminasyon

Willem Ombelet, Martine Nijs

Çeviri: *Mutlu Kilciler*[*]

GİRİŞ

Artifisyel inseminasyonun ilk uygulaması 1770 yılında John Hunter tarafından sunulmuştur. İleri derecede hipospadiaslı olan elbise tüccarına spermini ılık bir şırınga içersinde toplaması ve bunu vajene boşaltması önerilmiştir. Sims 1873 yılında yapmış olduğu 55 inseminasyon ve postkoital test sonuçlarını bildirmiştir. Sonuçta sadece tek bir gebelik oluşmuş, bu da ovulasyonun menstruasyon esnasında oluştuğu gerçeğine inanılarak açıklanabilmiştir

Hastanın kendi spermleri ile yapılan intrauterin inseminasyon (IUI) amacı servikal-mukus bariyerini by pass etmek ve fertilizasyon bölgesindeki normal şekilli, hareketli spermatozoaların miktarını artırmaktır[1]. Bir kaç dekat önce hastanın kendi spermleri ile artifisyel inseminasyon sadece fizyolojik ve retrograt ejekulasyon, vajinismus, hipospadias ve impotens gibi psikolojik disfonksiyon durumlarında uygulanmıştır. Postkoital testlerin rutin kullanımı ile servikal mukusun bozukluğu ve antisperm antikoru gibi immunolojik nedenlerde endikasyonlara eklenmiştir.

IUI 'e tekrar ilgi uyanmasının nedeni IVF uygulamasında motil spermatozoa hazırlama tekniklerinin geliştirilmesi ihtiyacının ortaya çıkmasıdır.Yıkama prostoglandinler, enfeksiyoz ajanlar ve antijenik proteinlerin ejekulattan temizlenmesi için gereklidir. Bu tekniklerin diğer bir amacı hareketli olmayan spermatozoa, lökosit ve immatur germ hücrelerinin temizlenmesidir. Bu lenfokin ve/veya sitokinlerin salınımını ve aynı zamanda serbest oksijen radikallerini de azaltarak sperm kalitesini artırabilir. Tüm bunların sonucu olarak sperm örneğinin in vitro ve in vivo fertilizasyon kapasitesi artmaktadır[2].

Yapay homolog inseminasyonu konusunda çok sayıda literatür olmasına rağmen, popular tedavi seçeneğinin özellikle orta ve şiddetli erkek subfertilite olgularında etkinliği konusunda tartışma vardır. Pek çok çalışma retrospektif olduğundan ve[1] çalışma gruplarının karşılaştırılması (farklı erkek subfertilite grupları)[2] farklı ovarian hiperstimulasyonu kullanımı ya da kullanılmaması[3], her tedavi siklusu için yapılan inseminasyon sayıları[4], ovulasyonun zamanlaması[5], inseminasyon bölgesi[6] ve sperm hazırlama metodlarındaki farklılıklar nedeni ile birbiri ile uyuşmayan sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Yine de, literatürde pek çok açıklanamayan, hafif ve orta derecede erkek faktörü infertilitesinde ilk tedavi seçeneği olarak önerilebileceğine dair belirgin kanıtlar vardır. IUI ile in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrastoplazmik enjeksiyon gibi (ICSI)[3-5] daha invazif ve daha pahalı yardımla üreme tekniklerine girişilmesine gerek kalmayacak şekilde yüksek gebelik oranları elde edilebilmektedir.

[*] Bursa Askeri Hastanesi, Kadın Doğum ve Hastalıkları Kliniği, Bursa.

IUI'ın ortalama kadın yaşının 39 olduğu ve erkek faktörünün sorumlu olduğu her siklus için gebelik oranının %8.2 olduğu subfertil gruptaki 10000 IUI siklusun değerlendirildiği geniş bir çalışma grubunda etkili olduğu bulunmuştur[6].

IUI diğer yardımla üreme tekniklerine göre daha az invazif, daha ucuz ve daha az risklidir. Ayrıca çoğul gebelik riski kabul edilebilir seviyelere düşürülebilir ise risk çok azdır.

DONÖR SEMEN İLE YAPILAN ARTİFİSYEL İNSEMİNASYON

Donör sperm ile yapılan ilk artifisyel inseminasyon (AID) William Pancoast tarafından 1884 tarafından postgonokokkal azosperminin tedavisinde uygulanmıştır. New york'lu Robert Dickson tarafından bu tekniğin kabul edilmesinin yasal ve uygulanabilir olmasındaki katkısı kabul edilmelidir. Farklı dinler tüm dünyada artan popularitesine rağmen cinsel ilişki olmadan olan üremenin bu formunu kabul edilemez olarak değerlendirmiştir. Bugünlerde AID yardımla üremede başarılı bir teknik olmasına rağmen duygusal, dinsel ve yasal problemler önem arzetmektedir.

Bu bölümde kısaca endikasyonlar, donör seçimi, donörlerin enfeksiyöz ve genetik hastalıkları, prosedür ve teknik yönleri ile tedavisi konularına değineceğiz.

AID endikasyonları

ICSI'nin uygulanmaya başlanmasına kadar, AID şiddetli oligoastenoteratozoospermi ve azospermili infertilite olgularında en çok uygulanan tedavi idi. AID nin diğer endikasyonları ise genetik bozukluklar, tekrarlayan fertilizasyon başarısızlığı ve başarısız IVF girişimleridir. 1992[7] yılında ICSI'nin uygulanmaya başlaması ile çok ciddi erkek infertilitesi bile başarılı olarak tedavi edilebilmiş ve AID ile tedavi edilen vakalar tüm dünyada belirgin oranda düşmüştür. Bugünlerde AID sıklıkla lezbiyen ve tek yaşayan kadınlar tarafından kullanılmakta ve etik ve yasal olarak bu işleme izin verilen ülkelerde en azından inseminasyonların %50'den fazlasında kullanılmaktadır. Diğer taraftan ciddi erkek infertilitesi olanların büyük kısmı ICSI'yi seçebilmesine rağmen AID halen bu tekniklerin yapılamadığı veya başarısız olduğu çiftlerde halen bir seçenektir. Hastaların önemli bir bölümü (%33) ICSI'yi seçmemişti[8].

Donörlerin seçimi

Her ülkenin farklı kuralları vardır. Donör toplanması için ortak kabul gören bir yazılı bildiri yoktur ancak en azından şu önerileri içermelidir[1]. hastalara danışmanlık önerilmeli ve potansiyel donörler gametlerin kullanımı, gametlerinin en fazla kaç aileye verilebileceği ve merkez kuralları hakkında bilgilendirilmelidir[2] kendi isteği ile verilmiş bilgilendirilmiş onam formu alınması zorunludur[3]. donörün gizli kalması (donör ve alıcı arasında bilgi olmaması) veya olması konusunda isteğini belirtmelidir[4]. donörlere para ödenmesi mümkündür ancak donasyon için başlıca amaç olmaması için sınırlı tutulmalıdır[9]. Avrupa Parlamentosu ve Amerika ilaç ve gıda yönetim kurumları donasyon işleminde donör bulunması, değerlendirme, işleme, koruma ve insan üreme hücrelerinin dağıtımına kalite ve güvenliğine standartlar getirmek için yazılı dokümanlar hazırlamışlardır.

Donörlerin taranması

Psikolojik danışmanlık

Psikolojik danışmanlık motivasyonun, çiftlerin bu işlem için hazır olup olmadığının değerlendirilmesi, psikiyatrik anamnez, çocuk arzusunun yerine getirilmesi ve donörün bilindiği ya da bilinmediği durumlardaki psikososyolojik sonuçları içermelidir.

Normal medikal öykü

Major kalıtsal hastalık anamnezi olmayan sağlıklı donörlerin toplanması önerilir. Kan grupları ve Rh grubu tayini yapılır. Saç ve göz rengi, kilo ve boy gibi fiziksel özellikler kaydedilir.

Enfeksiyon hastalıkları açısından tarama

Tüm donörler enfeksiyon hastalıklarının klinik bulguları ve risk faktörleri açısından taranmalıdır. Bu tarama donörün medikal öyküsünün incelenmesi ve fizik muayeneyi ve uygun medikal kayıtların gözden geçirilmesini gerektirmektedir. Bu tarama en azından HIV, hepatit B, hepatit C nin risk faktörleri ya da klinik bulgularını içermelidir. Donör spermi donör isminin gizli tutulduğu vakalarda mutlaka orijinal donasyon işleminden en az 6 ay sonrasında yeniden değerlendirilebilmesi açısından saklanmalıdır. Bu saklanan örnekler kabul ya da red sonucu beklenirken fiziksel ya da diğer yöntemler ile izole edilmelidir.

Genetik hastalıklar açısından tarama

Karyotipleme mutlaka yapılmalıdır. Major kalıtsal hastalığı olan donörler rededilmeli ve thalassemi ve sistemik fibrozis gibi belirli etnik gruplarda sık görülen resesif genetik hastalıklar için seçici testler yapılmalıdır.

Sperm kalitesi açısından tarama

Donör sperm kalitesinin hareketlilik, konsantrasyon ve morfoloji açısından WHO kriterlerine göre normal sınırlar içersinde olması gerekmesine rağmen, dondurulmuş spermlerin çözülmesi sonrasındaki sperm kalitesi de önemlidir. Hareketlilik ve canlılıktaki %30'dan fazla azalma dikkate alınmalıdır. Ayrıca bazı sperm örnekleri dondurulma ve çözülme işlemini tolere edememektedir[10]. AID işlemi yapılacağı zaman donör kalitesinin iyi olup olmadığını değerlendirebilmek için dondurulmuş örnek çözülmelidir.

AID'nin teknik yönleri

En az 6 ay süre ile dondurulmuş ve çözülerek depolanmış donör spermler AID işlemi için kullanılabilir. Depolama öncesi ve sonrası enfeksiyoz hastalıkların geçişini engellemek için gerekli testler yapılmalıdır. Tüm donör örneklerinin kayıtlarının tutulması önemli olup gametlerin işlenmesi ve depolanmasına yönelik düzenlemeler belirgin olarak tanımlanmalıdır.

Eğer mümkün ise donör ve alıcının fenotip özelliklerinin eşleştirilmesi tavsiye edilir. Tek bir donörden doğan çocuk sayısı sınırlı sayıda tutulmalıdır (maksimum 5 aileden 10 çocuk olacak şekilde). Bu sadece çok düşük bir ihtimal olan AID sonucu aynı ailenin çok fazla üyesi olma sonucunu engellemek dışında; donörle ilişkili psikolojik nedenler açısından da önemlidir.

Tedavinin değerlendirilmesi

Her merkez tüm AID sikluslarının sonuçlarını sıkı olarak kayıt altına almalı ve gebelik ile ilişkili bölgesel yığılmalar da belirlenmelidir. Donör isminin gizli tutulduğu vakalarda kayıt ve verilerin açıklanmaması için gerekli önlemler alınmalıdır. Genel olarak AID sonucu oluşan gebeliklerin sonucu homolog spermin kullanıldığı dondurma işlemi yapılmayan sikluslar ile karşılaştırılabilir. AID de başarı oranını etkileyen faktörler daha sonraki bölümde tartışılmıştır.

HOMOLOG SPERM İLE ARTİFİSYEL İNSEMİNASYON

Günlük uygulamada homolog spermin kullanılması ile yapılan IUI'dan önce, bu tekniğin gerçek değeri konusunda ikna olunması gerekmektedir. Bu yüzden IUI, takip, planlı koitus, IVF ve ICSI işlemler ile etkinlik açısından karşılaştırılmalıdır. Bu karşılaştırma sadece başarı oranlarını içermemeli aynı zamanda kar zarar değerlendirmesi ve çeşitli tedavi seçeneklerinin komplikasyon oranlarını, tekniğin invazifliğini ve hasta uyumunu içermelidir.

IUI'nin etkinliği

Servikal faktöre bağlı subfertilite

Servikal faktör subfertilitesinde IUI yapmak mantıklı bir yaklaşımdır. Sperm için zararlı ortamın bypass edilmesi gebelik oranlarını artırmaktadır. Servikal faktör infertilitesi olan çiftlerde planlı ilişki ile IUI yi karşılaştıran randomize kontrollü çalışmaların meta analiz sonuçları, IUI yapılan grupta gebelik oranlarının arttığını göstermiştir (Olasılık oranı 3.6, %95 güvenlik sınırları içinde 2.0-6.5)[11].

Açıklanamayan İnfertilite

Eğer 1 yıl süreli subfertilite öyküsü olan çiftlerde infertilite araştırması sonucunda neden saptanamıyorsa 'açıklanamayan infertilite' terimi kullanılır. Subfertilitenin net bir açıklamasının olmamasından dolayı tedavi sıklıkla ampiriktir. Doğal sikluslarda IUI ile planlı ilişkiyi karşılaştıran meta analizler sonucunda farklılık bulunmamıştır. Böylece açıklanamayan infertilite olgularında doğal sikluslarda IUI kullanımı etkisiz görünmektedir. Kontrollü over hiperstimulasyonu (COH) kullanıldığında IUI planlı ilişki ile karşılaştırıldığında daha etkili görünmektedir[11]. Peterson ve arkadaşları[12] açıklanamayan infertilite de 3 siklus yapılan COH'nin bir IVF siklusu kadar başarılı olduğunu bulmuştur. Ancak IVF işlemi çok daha maliyetli idi.

Erkek faktöre bağlı subfertilite

Erkek faktörünün sorumlu olduğu uzun süreli infertilite öyküsü olan çiftlerde spontan gebeliği bekleme düş kırıklığına yol açmakta, bunlarda her siklus için spontan gebelik şansı sadece %2'dir[13]. Bu nedenle spontan olarak gebeliği bekleme klinik uygulamada uygun bir yaklaşım tarzı değildir. COH ile veya onsuz IUI uygulananlarda her siklus için

gebelik oranı %10-18 olarak bildirilmiştir[6,14]. Cochrane gözden geçirmesinde Cohlen ve arkadaşları[15] hem doğal sikluslarda hem de COH'li beraber yapıldığında IUI'nın planlı ilişki (TI)'ye göre daha başarılı olduğu sonucuna varmışlardır (Doğal siklus-IUI karşı TI OR: 2.43 CI 1.54-3.83, COH-IUI karşı TI OR: 2.14 CI 1.30-3.51);

Bu bulgulara göre IUI doğal sikluslarda, sperm hazırlanması sonrasında hareketli sperm sayısının (IMC) 1 milyondan fazla elde edilebildiği ve üç sperm parametresinde bozukluğun olmadığı (WHO kriterlerine göre) orta ya da ileri derece erkek subfertilite vakalarında tedavi seçeneği olmalıdır.

Sperm kalitesi ve IUI sonuçları.

Çiftlerde IUI ya da IVF/ICSI tedavi seçeneklerinden hangisinin uygulanacağına karar verilmesinde, IUI'ın IVF/ICSI ya gerçek alternatif oluşturabileceği semen sınır değerlerinin belirlenmesi ilgi çekicidir. Literatüre göre, inseminasyon yapılan motil sperm sayısı (IMC) ve sperm morfolojisi IUI başarısını belirlemede en değerli parametrelerdir[14,16-18]. Hareketli sperm sayısının artışı ile gebelik oranlarının artışı bildirilmiştir; bununla birlikte hangi cut-off değerinde IUI 'ın başarılı olacağı 0.3 ile 20 milyon arasında değişmektedir[14,18-22]. Genk'in klomifen sitrata normal over cevabı olan hastaları içeren geniş bir retrospektif çalışmasında, IMC sayısının 1 milyondan fazla olması koşulu ile 3 siklus IUI uygulamasını takiben tüm hastalarda kümülatif gebelik oranları açısından farklılık olmadığı gösterilmiştir[16]. Ayrıca sperm morfoloji skorunun %4'den fazla olması koşulu ile 1 milyondan daha az hareketli spermatozoa olması durumunda IUI ilk seçilecek tedavi olma özelliğini devam ettirmişti (3 siklus IUI sonrasında kümülatif gebelik oranları %21.9).

Van Waart ve arkadaşlarının[23] almış olduğu %5'den daha fazla normal şekillerin olduğu sıkı cut-off değerlerine göre gebelik oranlarında önemli oranda artmaya yol açmıştır. Pek çok geniş ölçekli çalışmalar sonucunda normal formların %5 olması ve sperm hazırlanmasından sonra ml'de 1 milyon hareketli spermatozoa bulunmasının çiftlerin IUI uygulamasına seçilmesinde potansiyel sınır değerler olduğuna inanılmaktadır[16,17,24-31]. Sperm hazırlanmasından önce sperm motilitesi için sınır değerleri %30 ile %50 arasında bildirilmektedir[14,29,31,32]. IUI' dan sonra gebelik şansını etkileyen diğer 2 parametreler ise hipoosmotik şişme testi (HOS) (Tartagni ve ark.[33] çalışmasında %50'den fazla idi) ve sperm DNA fragmantasyonudur (Duran[34] ve arkadaşlarının çalışmasında %12'den daha az idi).

Art ile ilişkili servislerin maliyeti

İnfertilite tedavisinin etkinliği ve maliyeti ile ilgili veriler mevcuttur, ancak pek çok çalışmada sadece in vitro fertilizasyon (IVF) değerlendirilmiştir. Tedavi konusunda karar verirken çeşitli işlemlerin karzarar hesabı dikkate alınmalıdır. IVF ile IUI'ın karzarar hesabını karşılaştıran pek çok çalışma yapılmıştır[3,4,12,35,36].

IVF ile IUI'nın maliyet oranlarını karşılaştıran yayınlanmış olan verilere göre IVF, gametlerin tuba içi transferi (GIFT) ve zigotun tuba içi transferi (ZIFT) işlemlerinin tek bir süperovulasyon /IUI siklusuna göre 4 ila 7 kat daha fazla maliyetinin olduğunu göstermektedir[37-39]. Peterson ve arkadaşları[12] meta analiz kullanarak açıklanamayan infertilite olgularında 3 siklus gonadotropin tedavisi ve takiben yapılan IUI sonrasında gebelik oranları IVF ve ZIFT 'e göre daha yüksek ve GIFT ile benzer oranlarda idi. Prospektif randomize kontrollü çalışmalarda, Goverde ve arkadaşları[3] 3 siklus sonrası IUI sonrası gebelik başarı oranlarının IVF ile aynı olduğu sonucuna varmıştır. IUI'ın sadece açıklanamayan infertilite de değil aynı zamanda orta derecede erkek faktör infertilitesinde de maliyet olarak uygun bir yaklaşım olduğu sonucuna varmışlardı.

Bu önemli mesajlar İngiltere'de yapılan başka bir çalışma ile doğrulanmıştır[4]. Bu çalışmada yazarlar İngiltere'de infertilitede çeşitli tedavi seçeneklerinin kar zarar oranını değerlendiren verileride içeren mevcut klinik rehberleri tamamlamışlardı. Çeşitli infertilite tiplerinde mevcut teşhis ve tedavi seçeneklerini gösteren algoritmalar geliştirilmiştir. Bu çalışmaya göre, over stimulasyonu ile beraber yapılan IUI açıklanamayan ve orta derecede erkek infertilitesinde maliyet olarak uygun bir yaklaşım olarak değerlendirilmiştir. Garceau ve arkadaşları[5] sistematik olarak verileri gözden geçirdiğinde IUI ile tedaviye başlamanın pek çok açıklanamayan ve orta derecede erkek infertilitesinde maliyet olarak IVF'ten daha uygun olduğunu göstermektedir.

IUI'ın risk ve komplikasyonları

Gonadotropinlerin kullanıldığı tüm tedavi şekillerinde şiddetli over hiperstimulasyon sendromu (OHSS) komplikasyonu oluşabilmekte, bununla birlikte IVF ile karşılaştırıldığında COH-IUI'da OHSS nadir olarak gözlenmektedir[40-43]. İntrauterin kateterizasyon ve/veya transvajinal oosit aspirasyonu sonrasında pelvik inflamatuvar hastalık

insidansı IVF[41] için %0.2, IUI için %0.01 ile 0.2 bulunmuştur[24,40,43]. Yardımla üreme tekniklerinin (ART) major komplikasyonu ise önemli derecede mortalite, morbidite ve maddi külfete yol açan çoğul gebeliktir[44]. COH-IUI sikluslarında özelliklede gonadotropin kullanıldığında ultrasonla dikkatli monitorizasyon ve serum östradiol düzeylerinin takibine rağmen çoğul gebeliğin oranı tam belirlenememektedir. Monitorizasyona özen gösterilmesi esas olup, inseminasyon işleminin iptal edilmesi, IVF işleminin yapılmaması ya da IUI' dan önce foliküler aspirasyon yapılması diğer seçeneklerdir. Transvajinal ultrason eşliğinde çok sayıda folikülün aspire edilmesi gonadotropinler ile yapılan COH-IUI'nın hem etkinliğini hem de güvenirliğini artırmaktadır[45,46]. Bu metod aşırı stimulasyon olan durumların in vitro fertilizasyona dönüşümününe farklı bir alternatif oluşturmaktadır. (kaçış IVF). Doğal siklus IUI, klomifene sitrat, ve gonadotropinlerin düşük dozu ile tedavi over hiperstimulasyonu sonrasında görülen kabul edilemez oranda olan çoğul gebelik oranlarını önlemektedir.

Flanders'te 1993-2003 yılları arasında 619065 gebelik ve 661065 doğumun retrospektif incelenmesi sonucunda çoğul gebelik insidansının sırası ile yardımlı üreme sonrasında %13.3, IVF sonrasında %27.8 olarak bulunmuştur. ART sonucu oluşan gebeliklerin %50'sinden fazlası IVF dışında olan IUI ile beraber ya da tek başına COH işlemi sonrasında oluşmasına rağmen, ART sonrası oluşan çoğul gebeliklerin hemen hemen 2/3'ü IVF ya da ICSI sonrasında oluşmaktadır. Bu durum Flanders'te pek çok merkezin IUI'da gonadotropin yerine klomifen sitrat ve doğal siklusları kullanmasına bağlıdır. (Ombelet, yayınlanmamış veriler, Flemish obstetrik ve Jinekoloji derneğinin anketine göre).

Bilgilerimize göre IUI sonrası obstetrik ve perinatal sonuçları bildiren 3 makale yayımlanmıştır. Nuojua ve arkadaşlarına göre[47] ve Finlandiya doğum kayıtları merkezi (MBR) verilerine göre, IUI tedavisi spontan ya da IVF gebelikleri ile karşılaştırıldığında obstetrik ve perinatal riskleri artırmamakta idi. Wang ve arkadaşları[48] preterm doğumu,1015 IUI/AID tek gebeliklerini 1019 IVF/ICSI ve 1019 IVF/ICSI ve 1019 spontan gebelikleri karşılaştırmıştır. Sonuçta IUI/AID tek gebeliklerinde spontan gebeliklere oranla 1.5 kat daha fazla oranda preterm doğum riski olduğunu bulmuş, oysa IVF/ ICSI grubunda ise spontan gebeliğe göre 2.4 kat fazla riskte artma saptanmıştır. Retrospektif yapılmış kohort çalışmasında, Gaudoin ve arkadaşları[49] subfertil hastalarda COH-IUI sonrası oluşan tek gebelikler İskoçya'daki ulusal kayıtlardaki spontan gebelikler ile karşılaştırıldığında kötü perinatal sonuçların olduğu bulunmuştur. Bu durum prematür ve düşük doğum ağırlığı sıklığının artmasına bağlıdır. Bu yazarlar subfertil çiftlerdeki intrinsik faktörlerin daha düşük doğum ağırlıklı infant doğmasına yol açtığını ileri sürmüşlerdi. Yardımla üreme ile ya da tek başına yapılan kontrollü over hiperstimulasyonu sonrası tek ve ikiz gebeliklerin perinatal sonuçlarının spontan gebelikler ile karşılaştırıldığı yeni bir çalışma yaptık[50].

Belçika'da Flanders'te 1993-2003 yılları arasında olan 661065 doğumun ulusal kayıtları değerlendirilmiştir. Total 12021 tek ve 3108 ikiz gebelik seçilebilmiştir. Kontrol grubu anne yaşı, parite, fetal cinsiyet ve doğum yılı açısından eşleştirilmiştir. Yüksek oranda erken prematürite (32 haftadan önce), çok düşük doğum ağırlığı (1500 gr'dan az), in utero bebek ölümü ve perinatal ölüm oranlarının COH/AI tek gebeliklerinde sıklığının arttığını bulduk. COH/AI sonrası oluşan ikiz gebeliklerde yüksek oranda neonatal mortalite, yardımlı ventilasyon gereksinimi ve respiratuar distress sendromu gözlenmiştir. Sonuçlarımıza göre COH/IUI tek ve ikiz gebelikleri spontan gebeliklere göre önemli oranda yüksek mortalite ile birlikte düşük doğum ağırlığı ve prematürite oranında artma gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca infertilitenin bizzat kendisi spontan gebeliklere göre kötü prenatal sonuçlara yol açmaktadır.

Çiftlerin Uyumu

IUI basit ve invazif olmayan bir işlem olup, pahalı bir ekipman gerektirmeden yapılabilmekte ve 3 veya 4 siklus içersinde gebelik elde edilebilmektedir. Basit ve güvenilir bir tedavi olup işleme bağlı çok az risk vardır ve monitorizasyona gerek duyulmamaktadır. Bu faktörler IVF'e göre IUI işleminde hasta uyumunun daha fazla olmasını açıklamaktadır.100 IUI serisinde hastaların tedaviyi bırakma oranını %19.6 olarak bulduk[16]. Daha önceleri IVF ve ICSI işlemlerinde yüksek oranda tedaviye ara verme ve tedaviyi bırakma saptanmıştı[37]. Tablo 27.2; IUI'ın IVF/ICSI ye göre avantaj ve dezavantajlarını göstermektedir.

Erkek subfertilitesinde tedavi stratejisi: Bir görüş

Şekil 27.1; Genk enstitüsü fertilite teknolojisinde kullanılan tedavi stratejisini göstermektedir. Pek çok vakada kümulatif gebelik oranları folikül stimüle

edici hormon (FSH) ve/veya luteinleştirici (LH)hormon stimulasyonu[14] ile karşılaştırıldığında daha düşük olmasına rağmen tedaviye klomifene sitrat over stimulasyonu ile başlıyoruz. Klomifen sitratın diğer bir avantajı ise daha düşük oranda çoğul gebeliğe yol açmasıdır. (%7'den daha az). Üç siklus IUI sonrası kümülatif gebelik oranı tek bir IVF siklusu ile benzerdir (%25). Hastaların %90'dan fazlası tek bir IVF siklusu sonrası başarı şansının daha fazla olmasının farkında olmasına rağmen, protokolümüzü takip etmeyi kabul etti. Mükemmel danışmanlık hizmeti zorunlu ve temeldir.

IUI başarısını etkileyen faktörler

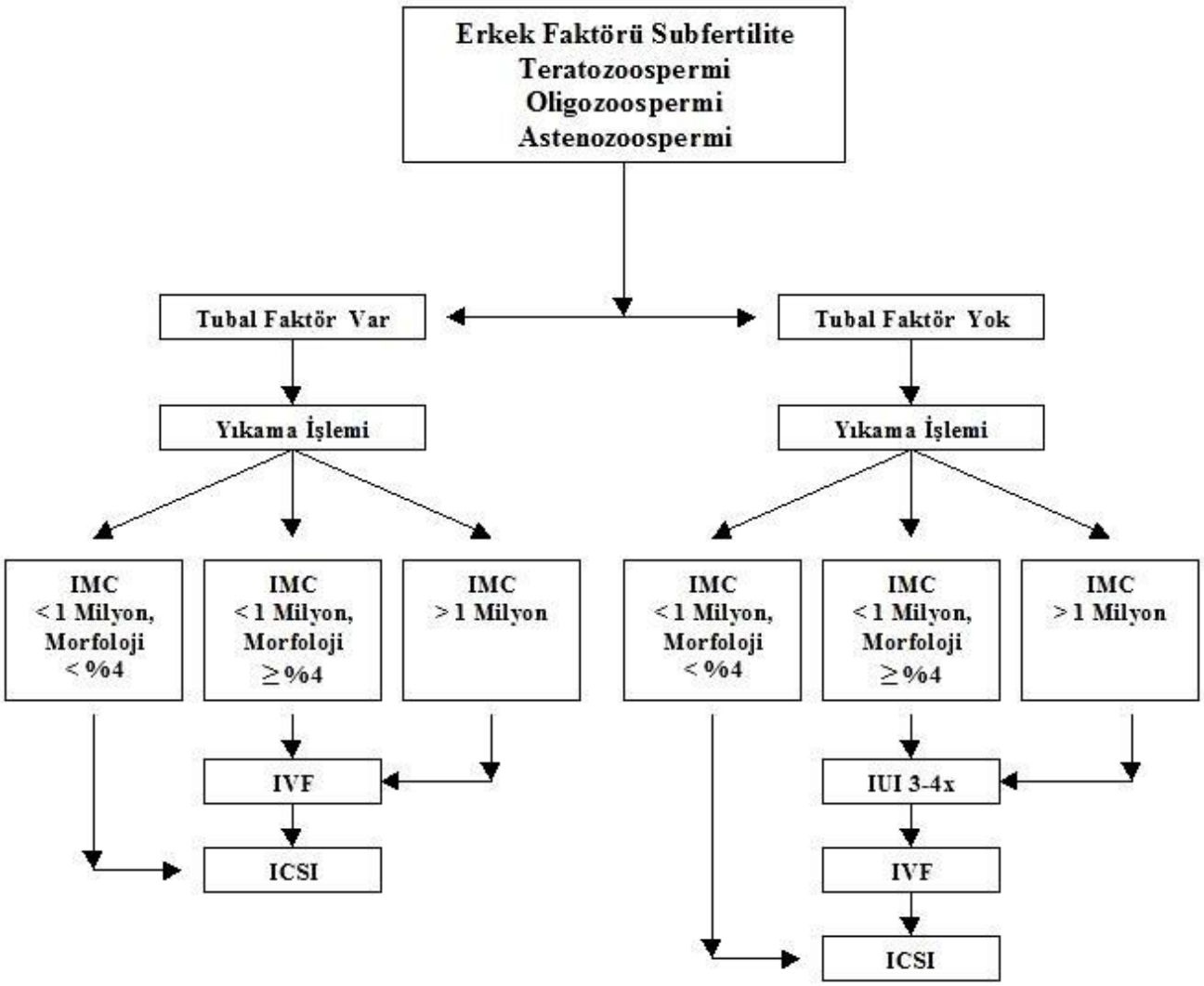
Kadına ait faktörler

Subfertilitenin süresi[53], primer veya sekonder subfertilite, endometriosis ve over hiperstimulasyonun uygulanıp uygulanmamış olması IUI başarı şansını önemli oranda etkileyebilen faktörler olabilir[54]. Diğer değişkenler ise inseminasyon bölgesi, antioksidan kullanımı, tuba içi ortamı etkileyen faktörler ve embiryo implantasyonunu etkileyen faktörlerdir (şekil 27.2)[55]. 40 yaş altında kadında erkek eşin spermi (AIH) ile yapılan yardımla üreme tedavisinde her siklus sonrası gebelik oranında kadın yaşı belirleyici değildir[14].

İnseminasyon bölgesi Artifisyel inseminasyon intravajinal, intraservikal (ICI), periservikal veya intrauterin (IUI), transservikal, intrafallopian (IFI) veya intraperitoneal (IPI) olarak yapılabilir. Pek çok çalışmada IUI basit ve daha iyi bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir. Donör inseminasyon programında, Hurd ve arkadaşları[56] ICI ve IFI ile karşılaştırıldığında IUI da daha yüksek siklus fekundite oranları bildirmiştir. ICI[57] ile karşılaştırıldığında IUI sonrasında peritonel kavitede daha fazla sperm bulunmuştu. IUI sonrası gebelik oranlarını, servikal başlık kullanılarak yapılan inseminasyon[58] ve transuterotubal inseminasyon[59] ile karşılaştıran çalışmalarda, intrauterin metod lehine sonuçlar vermişti. Geniş randomize kontrollü bir çalışmada, infertil çiftler arasında superovulasyon indüksiyon-intrauterin insemi-nasyonla, intraservikal inseminasyona göre üç kat yüksek gebelik şansı elde edilmektedir. Aynı şekilde superovulasyon-intraservikal inseminasyon veya tek başına intrauterin inseminasyona göre iki kat fazla gebelik ile sonuçlanmaktadır.

Tablo 27.1: *İntrauterin inseminasyonun (IUI) avantaj ve dezavantajları invitro fertilizasyon (IVF) ve intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) ile karşılaştırılması. IMC, inseminasyon yapılan motil sperm sayısı.OHSS, over hiperstimulasyon sendromu; PID, pelvik enflamatuvar hastalık; LBW (<2500 gr) düşük doğum ağırlığı. Ombelet ve arkadaşları tarafından Reprodüktif biomedicine online'dan alınan makale Üreme sağlığı merkezinin izni ile tekrar yayınlanmıştır[51].*

Avantajlar	Dezavantajlar
IUI	
Daha az ekipman gereksinimi	Her siklus için başarı oranı daha az
Kolay uygulanan metod olması	Eğer IMC <1milyon ise başarı oranı daha az
Daha az invazif olması	Morfoloji < %5 ise başarı oranı düşük
Daha ucuz olması	LBW, prematürite oranında artma (antisperm antikorları riski)
Çiftlerin uyumunun daha fazla olması (tedaviyi bırakma oranının daha az olması)	
OHSS ve PID açısından daha az risk olması	
Orta derecede çoğul gebelik riskinin olması	
IVF+/-	
Enfeksiyonun minimal oranda aktarılması	İnvazif
Her siklus için yüksek başarı oranı	Prematürite, LBW riskinin yüksek olması
	OHSS, PID riskinin yüksekliği
	Çoğul gebelik oranının yüksek olması
	Genetik bozuklukların riskinin artması
	Çiftlerin tedaviye uyum oranının düşüklüğü, tedaviyi bırakma oranı yüksekliği



Şekil 27.1: *Genk Fertilite Teknolojileri Enstitüsü tarafından erkek subfertilite olgularının tedavisinde önerilen algoritm. IMC: İnsemine edilen motil sayı, IVF: İn vitro fertilizasyon, ICSI: İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu, IUI: İntrauterin inseminasyon. Ombelet ve arkadaşları tarafından Online Reprodüktif Biomedicine'den alınan makale Üreme Sağlığı Merkezinin izni ile tekrar yayınlanmıştır*[52]

Oosit kalitesi ve oosit sayısını etkileyen faktörler

Doğal siklusa karşı kontrollü over stimulasyonu (COH) Yardımla üremede over hiperstimulasyonu uygulanmasının ardındaki gerçek fertilizasyon için mevcut olan oosit sayısını artırmak ve belirgin olmayan, önceden saptanamayan ovulatuvar disfonksiyonu düzeltmektir[61]. İnsan menopozal gonadotropinleri ile superovulasyonun diğer avantajları ise oosit toplanması, fertilizasyonu ve implantasyon için seçeneklerin artmış olmasıdır.

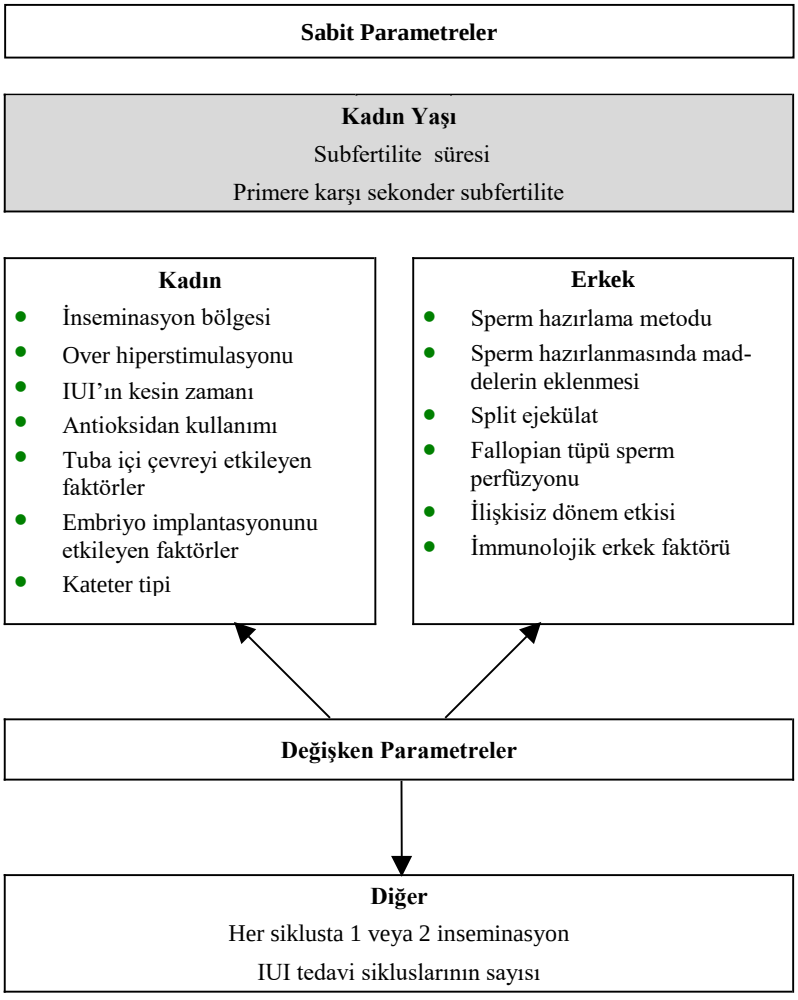
Diğer taraftan, kontrollü çalışmada Cohlen ve arkadaşları[62] erkek subfertilite vakalarında over stimulasyonu başarı oranını ancak orta derecede vakalarda (IMC 10 milyon üzerinde) artırmıştı. IUI da COH'nin etkileri karşılaştırıldığında klomifene sitrata göre insan menopozal gonadotropinleri (HMG) ile stimulasyon fekunditede daha fazla artmaya yol açmıştır[43]. 412 çiftteki 1100 IUI işleminin retrospektif incelenmesinde hMG sonrası her siklus için gebelik oranı %17.7, klomifen sitrat ile stimulasyonda ise %10 olarak bulunmuştur. Ancak hMG tedavisi daha çok çoğul gebeliğe yol açmaktadır. Bu istatistiki farklılığı IUI endikasyonu etkilememektedir[63]. Çoğul gebelik ve over hiperstimulasyonu (OHSS) göz önüne alındığında, düşük doz COH tedavisi uygulanmalıdır. Cohlen ve arkadaşları[15] IUI'ı şiddetli sperm defektlerinin olduğu hastalarda (IMC 1 milyondan fazla ve üçlü semen

defektinin olmaması durumunda) ilk tedavi seçeneği olarak tavsiye etmektedirler.

IUI'ın tam olarak yapılma zamanı IUI tedavisinde inseminasyon zamanlamasının tam yapılması esas faktördür. Bununla birlikte literatürde hangi metodun kullanılacağına dair bir biri ile uyuşmayan veriler bildirilmiştir. Ultrasonun insan koryonik gonadotropini (hCG) ile kombinasyonu büyük olasılıkla IUI yapılması için en doğru zamanı vermekte ancak nispi olarak zaman alıcı ve pahalıdır. İdrarda belirli aralıklarla LH bakılması ile yapılan IUI uygulaması sıklıkla kullanılmaktadır ancak bazı hastalarda ovulasyondan önce LH pikinin 2 güne kadar sürebilmesi gibi dezavantaja sahiptir. Buda ovulasyonun ve inseminasyonun zamanlamasının hatalı olmasına yol açar[64]. Zreik ve arkadaşlarının[65] yaptığı prospektif randomize çalışmada, zamanlı LH bakılması ile karşılaştırıldığında ultrason ile monitorizasyon ve HCG bakılmasının gebelik oranlarını artırmadığı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada hCG uygulanmasından önce spontan LH pikinin beklenmesinin yarar sağlamadığı bulunmuştu[66].

Sonuç olarak hangi metod kullanılırsa kullanılsın, IUI da yapılma zamanın kesin olarak belirlenmesinin bilinmesi esas teşkil etmektedir.

Foliküllerin perifoliküler vaskülaritesi. Chiu ve arkadaşları[67] IVF-embryo transferinde (ET) gebelik oranları ile perifoliküler kan akımı arasında pozitif ilişki olduğunu power doppler kullanarak ilk olarak bildirmişlerdir. Bhal ve arkadaşları[68] doppler usg ile yüksek düzeyde perifoliküler vaskülarite olan IUI sikluslarını tespit etmede kullanmış, böylece maturasyona uğrayan oositle birlikte folikülün oksijenasyon durumunu göstermiştir.



Şekil 27.2: *İntrauterin inseminasyonda (IUI) (başarı oranını etkileyen faktörler)*

Bu bulgular kan akımının iyi olduğu foliküllerde perifoliküler kan akımı ile gebelik oranları arasında pozitif korelasyon olduğunu (%57), kan akımının az olduğu durumlarda ise gebelik oranlarının önemli derecede azaldığını (%11) tekrar göstermiştir. İnseminasyon esnasında tüm foliküller yüksek kan akımı gösterdiğinde daha yüksek oranda çoğul gebelikler oluşmuştu. Bhal ve arkadaşları[69] ile Gregory ve arkadaşları[70] düşük kan akımı olan monofoliküler IUI siklusların gebelik elde edilemediği için çalışmalarında iptal etmişlerdi.

Antioksidan kullanımı Kültür ortamına reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyen maddelerin eklenmesi in vitro fertilizasyonla ilişkili oosit yaşlanmasının negatif etkilerini önlemektedir. (blastosit evresine kadar gebelik ürününün gelişmesini ve daha az parçalı hale gelmesini[71]) Reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunun in vivo olarak sperm-oosit birleşme testi ve fertilite üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu gösterilmiştir[72]. Şimdiye kadar antioksidanların IUI sikluslarında kültür ortamına eklenmesinin ya da diet takviyesi sonucu ortaya çıkabilecek muhtelif etkilerini araştıran bir çalışma yapılmamıştır.

Embriyo implantasyonunu etkileyen faktörler

Endometrial kalınlık /polipler. Endometrial kalınlık ve /veya spiral ve uterin arterlerin doppler incelemesi ne göre endometriumun trilaminar (üç tabakalı)görüntüsü IUI' da gebelik başarı şansını artırmaktadır[73,74]. Tedavi yetersiz endometrial kalınlık nedeni ile iptal edilmemelidir. Klomifen sitrat sikluslarında[76] etinilöstradiol kullanımı ümit vaat etmekte ancak bu gözlemlerin doğrulanması gerekmektedir. Eğer polip mevcut ise, IUI'dan önce polipektomi yapılması gebelik şansını artırmaktadır[77].

Kateter seçimi. IVF işleminde kateter tipi ve kateterin kolay geçebilmesinin etkisini değerlendirmek için pek çok çalışma yapılmıştır. Farklı kateterler karşılaştırıldığında sonuç açısından bir farklılık olmamasına rağmen, IVF'te[78,79] ultrason eşliğinde yapılan yumuşak kateter ile yapılan embryo transferi gebelik oranlarını artırabilmektedir[80-82]. Lavie ve arkadaşları[83] IUI da 2 farklı kateter kullanımının sonuçlarını karşılaştırmıştır. Bir kateter daha az travmatik olmasına rağmen (ultrasonla doğrulanmış) sadece gebelik oluşma şansında artmaya yol açmıştır. 2 farklı kateter kullanımını karşılaştıran diğer prospektif çalışma sonuçlarına göre, kateter tipi IUI'da başarı şansını etkilememektedir[84].

Erkek faktörleri

Laboratuar faktörleri. IUI için sperm örneklerinin hazırlanmasına gerek varmıdır? Ejekulat epididim, testis, prostat, seminal veziküller ve bulboüretral bezlerin sekresyonları içersinde dağılmış olan çeşitli kalite ve maturasyonda spermatozoadan oluşmaktadır. Taze sperm örneğinde aynı zamanda üriner sistem ve prostattan hücreler, lökositler ve ROS'de bulunmaktadır[85]. Hazırlık ve yıkama işlemleri ROS ve prostoglandinleri uzaklaştırmaktadır. IUI işlemi esnasında taze sperm kullanımının uterusta kramplara yol açabilmesi nedeni ile prostoglandinler uzaklaştırılmalıdır. Hazırlık işlemi ile morfolojik olarak normal ve hareketli spermler konsantre hale gelmekte bu da IUI'da daha iyi sonuçlar alınmasında esas teşkil etmektedir. En populer olanı swim-up, dansite gradient santrifüj işlemi ve Sephadax sütunlarının kullanımıdır.

Yoğunluğa göre santrifüj işlemi ile ayrılma işlemi ile daha fazla normal kromatin içeren, kromatin ve nükleer anomali düzeyinin daha az ve nükleer maturitesi artmış daha fazla spermatozoanın bulunması sağlanmaktadır[86-88]. Bu hazırlama tekniklerinin fekundite açısından birbirine üstünlüğü bakımından uyuşmayan veriler mevcuttur[89,90]. Bu tüm sperm yıkama ve hazırlama teknikleri ile in vivo konsepsiyon için gerekli en alt sınır olan ml de 1 milyondan fazla motil spermatozoa elde edilmesi gerçeği ile açıklanmaktadır ve spermatozoa sayısının daha fazla artması ekstra bir avantaj sağlamamaktadır. Cochrane gözden geçirmesine göre[91] herhangi bir spesifik sperm hazırlama tekniğinin daha etkili olduğunu öneren yeterli kanıtlar yoktur. Yoğunluk ve/veya swim–up ve /veya yıkama ve santrifüj tekniğinin sonuç parametreleri üzerindeki etkisini karşılaştıran etkili büyük çaplı, yüksek kaliteli, randomize kontrollü çalışmalar yoktur. Semen parametrelerini karşılaştıran çalışmalar yoğunluk esasına göre yıkama tekniğinin tercih edilmesini önermektedirler, bununla birlikte kesin sonuçlar elde edilememekte ve bu çalışmaların sınırlı olduğu gözönüne alınmalıdır.

Laboratuar faktörleri Sperm hazırlama esnasında faktörlerin eklenmesi. Pentoksifilin kallikrein, foliküler sıvı gibi maddelerin eklenmesinin sonuçları iyileştirebileceği kesin değildir ve kanıtlanmamıştır. Diğer taraftan sperm hazırlama tekniklerinin ROS üretimini artırarak ve seminal sıvıdan temizleyici maddeleri temizleyerek sperme zarar verebileceğinin farkında olunmalıdır. Motilite uyarıcısı olan pentoksifilin aynı zamanda spermatozoa tarafından

üretilen superoksit anyonu oluşumunu[92] azaltarak ROS temizleyici olarak da etki edebilir ve genital enfeksiyonu olan ve sigara içen ROS tarafından indüklenen hasara duyarlı hastaların tedavisinde etkili olabilir. Sperm hazırlanması esnasında spermatozoaların antioksidan içeren solüsyonlar ile muamele edilmesinin belirli IUI vakalarında gebelik oranlarını artırabileceğini araştırmak için daha fazla çalşmaların yapılması gerekmektedir. İki çift kör randomize çalışmada IUI işlemi için sperm hazırlanması esnasında platelet aktive edici faktörün (PAF) etkisi değerlendirilmiştir[93,94]. Bu çalışmalarda erkek faktör subfertilitesi olmayanlarda PAF ile tedavi edilen grupta önemli oranda gebelik oranlarında artış olduğu gösterilmiştir.

Misoprostol kullanımı Prospektif plasebo kontrollü çift kör çalışmada Brown ve arkadaşları[95] IUI esnasında intravajinal olarak prostoglandin E1 analoğu olan misoprostolün (400 mikrogram) kullanılmasının gebelik oranlarını artırdığını bildirmiştir. Bu bulgular 200 mikrogram misoprostolün kullanıldığı diğer bir çalışma ile desteklenmiştir[96]. Bu gözlemin arkasındaki gerçek ise muhtemelen bazı seminal içeriklerin muhtemelen de prostoglandinlerin fertilite üzerinde pozitif etkiye sahip olması ve bu maddelerin sperm hazırlama tekniklerine bağlı olarak ejekulattan elimine edilmesine bağlıdır.

Split ejekulat Split ejekulat tekniği ejekulatın ilk bölümündeki en hareketli ve canlı spermatozoayı konsantre etmektedir.Yıkanmış spermin kullanıldığı IUI da sonuçlar daha iyi olmasına rağmen bazı klinisyenler IUI'da ejekulatın bu kısmını kullanmaktadırlar[97].

Fallop tüplerinin sperm perfüzyonu (yüksek oranda sperm suspansiyonu) Fallop tüplerinin sperm perfüzyonunda (FSP), yüksek oranda sperm suspansiyonu intrauterin işlem esnasında insemine edilir.Bu idiopatik infertilite olgularında[98,99] ve donör inseminasyon programlarında[100] mükemmel sonuçlar vermektedir. Dondurma ve çözülme sonrasında semen kalitesi subfertil spermiogram ile benzer olması nedeni ile FSP ile erkek faktör subfertilite hastalarında iyi sonuçlar beklenebilmektedir. Bununla birlikte bu konunun doğrulanması gerekmektedir. Trout ve Kemmann[101] tarafından yapılan meta analizde FSP'nin sadece açıklanamayan infertilite olgularında HMG ile yapılan COH tedavisinde faydalı olduğunu göstermişti. Cantineau ve arkadaşları[102] Cohrane'a göre sistemik gözden geçirme yapmışlar ve FSP'nin açıklanamayan infertilite olgularında daha yüksek gebelik oranlarına ulaştığını bulmuşlardı.Diğer endikasyonlarda ise IUI ile karşılaştırıldığında FSP'nin daha etkili olmadığı ispatlanmıştır. Diğer yandan Biacchiardi ve arkadaşları[103] randomize, prospektif, cross over çalışmada açıklanamayan infertilite olgularında COH dan sonra FSP'nin IUI 'den daha az etkili olduğunu bulmuşlardı.

İlişkisiz döneminin etkisi Uzun süre ilişkiden kaçınma oligoozoospermik erkekte sperm konsantrasyonu üzerinde çok az etkili olmasına rağmen[106], ejekulat hacmini, sperm sayısı, sperm konsantrasyonu, hareketli total spermatozoa sayısını artırmaktadır[104,105]. Genk'te yapmış olduğumuz prospektif bir çalışmada ilişkiden kaçınma ph, canlılık, morfoloji, total veya grade A motilite veya DNA fragmantasyonu üzerinde etkiye sahip değildi. Kısa (24 saatlik) ilişkiden kaçınma periyodu kromatin kalitesini negatif olarak etkilemiştir[107]. IUI programlarında optimal ilişkiden kaçınma süresi çok önemli değildir ve muhtemelen belirli erkek subfertilite vakalarında önemlidir.

İmmunolojik erkek subfertilitesi Erkek subfertilitesinde antisperm antikorlarının klinik önemi belirgin değildir[108,109] ve sirküle olan antisperm antikorlarının düzeyi muhtemelen düşüktür[110,111]. Bununla birlikte pek çok çalışma sperm yüzeyel antikorları ile erkeğin fertilite potansiyeli arasında belirgin ilişki olduğunu göstermektedir[112-114].

1997 yılında erkek immunolojik subfertilite olgularında ilk tercih edilecek IUI ile IVF'in etkinliğini prospektif çalışma ile karşılaştırdık[16]. Bu çalışmanın amacı iki farklı tedavi şekli olan COH-IUI ile IVF'i birbiri ile karşılaştırmak idi. Hem IUI hem de IVF sperm yüzeyel antikorlarının olduğu uzun süreli subfertiliteye sahip belirli grup hastalarda beklenmeyen şekilde yüksek gebelik oranları bulunmuştur. COH-IUI ile IVF'i karşılaştıran kar zarar değerlendirmesi 4 kez yapılan IUI siklusu lehine idi. Bu nedenle IUI'ın erkek immunolojik subfertilitesinde ilk tedavi olarak kullanılabileceği sonucuna vardık. Pek çok fertilite merkezleri immunolojik erkek subfertilitesinde IVF/ICSI'yi[115,116] kullanmasına rağmen, spesifik endikasyonlarda IUI'ın gerçek değerini ortaya koyacak prospektif olarak yapılacak iyi organize çalışmaların yapılması zorunludur.

Diğer faktörler İnseminasyon sayısı.Teorik olarak hCG enjeksiyonundan sonra ovulasyonun senkronize olmayıp daha ziyade dalgalar şeklinde olmasından dolayı 2 kez ardışık inseminasyon yapıldığında gebelik oranlarının artması beklenebilecektir[117]. İki kez IUI (DIUI) yapılmasının diğer ca-

zip kılan neden ise yıpranma fenomeni olup burada IUI servikal mukus engelini bypass etmektedir. Doğal siklusta servikal mukus siklus ortasında rezervuar görevi görür ve bir kez yapılan IUI (SIUI) daha sonra salınabilecek oositlerin döllenememesi anlamına gelmektedir. Ransom ve arkadaşları[118] over stimulasyonunda hMG'nin kullanıldığı prospektif çalışmalarda DIUI'nin gebelik oranlarını artırdığını gösterememişlerdir. Bu sonuçlar daha önce bildirilen çalışmaların sonuçları ile uyuşmuyor idi[119]. Yazarlar DIUI uygulandığında (hCG den 18 ve 42 saaat sonra) siklus başına fekunditede önemli oranda artma olduğunu bulmuşlardı. Bununla birlikte Ng ve arkadaşları[120] SIUI ve DIUI arasında gebelik sonuçları açısından farklılık bulamamışlardır.

GIFT merkezi iki farklı over stimulasyonu kullanılarak yapılan bir ve iki kez yapılan IUI sikluslarını karşılaştıran randomize coss-over çalışma düzenlemişti. Bu çalışmada 113 çiftin 203 IUI siklusu takip edilmiştir. 156 siklusta (%76.5) erkek faktörü sorumlu idi. İnseminasyon sıklığını artırma klomifen sitrat-hMG-hCG süperovulasyonu sonucunda siklus fekundite oranında daha fazla artış göstermiş (0.30 karşı 0.13, p<00.5),ancak klomifen sitrat-hCG (0.13-0.12) sonrasında aynı artış gözlenmemişti[63]. Bu iki çalışmanın Cochrane değerlendirilmesinde, subfertil çiftlerde partnerin semeni ile yapılan DIUI'nın SIUI' ya göre önemli bir üstünlük[63] göstermemiştir[121]. Yazarlar bu gözden geçirmeye göre bu yaklaşım tarzını tavsiye edebilecek anlamlı bulgular olmadığını kabul ettiler. Bu rapora göre SIUI'nın DIUI ile karşılaştırıldığı geniş çaplı randomize kontrollü çalışmaların yapılması zorunludur.

Diğer faktörler IUI tedavi sikluslarının sayısı: Çeşitli çalışmalarda 3. ve 4.IUI sikluslarından sonra siklik fekundite oranlarında önemli oranda azalma olduğu bildirilmişti[122-128]. Diğer yardımla üreme yöntemleri ile karşılaştırıldığında diğer çiftler bu tedavi şeklinden fayda görmüyor gözükmektedir.

SONUÇLAR

IUI en azından bir tuba uterinanın açık olması ve ejekulatta 1 milyondan fazla spermatozoa olması koşulu ile pek çok subfertilite vakasında ilk tedavi seçeneği olarak önerilmelidir. Bu hasta gruplarında IVF ve ICSI gibi yardımla üreme teknikleri ile tedaviye başlamak bu tekniklerin daha invazif, pahalı ve genetik hastalıklar bakımından fazla riske sahip olması nedeni ile mantıklı bir yaklaşım tarzı değildir. IVF ve ICSI işlemlerinin olabildiğince en hızlı gebe kalma yöntemi olarak reklamını yapmak IUI'ın avantajlarını tamamen gözardı etmek anlamına gelmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alien NC, et al. Intrauterine insemination: a critical review. Fertil Sceril 1985; 44: 568
2. Aitken RJ, Clarkson 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
3. Goverde AJ, et al. Intrauterine insemination or in-vitro-fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. Lancet 2000; 355: 13
4. Philips Z, Barraza-LIorens M, Posnett J. Evaluation of the relative cost-effectiveness of treatments for infertility in the UK. Hum Reprod 2000; 15: 95
5. Garceau L, et al. Economic implications of assisted reproductive techniques: a systematic review. Hum Reprod 2002; 17:3090
6. Stone BA, et aJ. Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles. Am J Obstet Gynecol 1999; 180: 1522
7. Palermo G, et al. Pregnancies after mtracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17
8. Vernaeve V, et al. Reproductive decisions by couples undergoing artificial insemination with donör sperm for severe male infertility: implications for medical counselling. Int J Andtol 2005; 28: 22
9. Barratt C, et al. Gamete donation guidelines. The Corsendonk consensus document for the European Union. Hum Reprod 1998; 13: 500
10. Nijs M, Ombelet *W.* Cryopreservation of human sperm. Hum Fertil 2001; 4: 158
11. Cohlen BJ. Should we continue performing intrauterine inseminations in the year 2004? Gynecol Obstet Invest 2005; 59: 3
12. Peterson CM, et al. Ovulation induction with gonadotropins and intrauterine insemination compared widi in vitro fertilization and no therapy: a prospective, nonrandomized, cohort study and meta-analysis. Fertil Steril 1994; 62: 535
13. Collins JA, Burrows EA, Wilan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. Fertil Steril 1995:64:22
14. Ombelet W, et al. Artificial Insemination (AIH). Artificial insemination 2: using the husband's sperm. In Acosta AA, Kruger TF, eds. Diagnosis and Therapy of Male Factor in Assisted Reproduction. Carnforth: Parthenon Publishing, 1996: 397
15. Cohlen BJ, et al. Timed intercourse versus intrauterine insemination with or without ovarian hyperstimulation for subfertility in men. Cochrane Database Syst Rev 2000; (2): CD000360
16. Ombelet W, et al. Intrauterine insemination after ovarian stimulation with clomiphene citrate: predictive potential of inseminating motile count and sperm morphology. Hum Reprod 1997; 12: 1458
17. Ombelet W, et al. Semen quality and intrauterine insemination. Reprod Biomed Online 2003; 7: 485
18. Duran EH, et al. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. Hum Reprod Update 2002; 8: 373
19. Brasch JG, et al. The relationship between total motile sperm count and the success of intrauterine insemination. Fertil Steril 1994; 62: 150
20. van der Westerlaken LA, Naaktgeboren N, Helmerhorst FM. Evaluation of pregnancy rates after intrauterine insemination according to indication, age, and sperm parameters. J Assist Reprod Genec 1998; 15:359
21. Branigan EF, Estes MA, Muller CH. Advanced semen analysis: a simple screening rest to predict intrauterine insemination success. Fertil Steril 1999; 71:547
22. Miller DC, et al. Processed total motile count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. Urology 2002; 60: 497
23. Van Waart J, et al. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. Hum Reprod 2001; 7: 495
24. Horvath PM, ec al. The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulated women undergoing intrauterine insemination. Fertil Steril 1989; 52:288
25. Toner JP, et al. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial {intrauterine) insemination. Andrologia 1994; 27: 143
26. Campana A, et al. Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. Hum Reprod 1996; 11: 732
27. Lindheim SR, et al. Abnormal sperm morphology is highly predictive of pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. J Assist Reprod Genet 1996; 13: 569
28. Hauser R, et al. Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria. Andrologia 2001; 33: 13
29. Montanaro GM, et al. Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme. Andrologia 2001; 33: 135
30. Lee RK, et al. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. Int J Androl 2002; 25: 277
31. Lee VMS, et al. Sperm motility in the semen analysis affects the outcome of superovulation intrauterine insemination in the treatment of infertile Asian couples

with male factor infertility. Br J Obstet Gynaecol 2002; 109: 115

32. Dickey RP, et al. Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with World Health Organization threshold values for normal sperm. Fertil Steril 1999; 71: 684
33. Tartagni M, et al. Usefulness of the hypo-osmotic swelling test in predicting pregnancy rate and outcome in couples undergoing intrauterine insemination. J Androl 2002; 23: 498
34. Duran EH, et al. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. Hum Reprod 2002; 17: 3122
35. Zayed F, Lemon EA, Cooke ID. Comparison between stimulated in-vitro fertilization and stimulated intrauterine insemination for the treatment of unexplained and mild male factor infertility. Hum Reprod 1997; 12:2408
36. Van Voorhis BJ, et ai. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. Fertil Steril 2001; 75: 661
37. Comriaire F. Economic strategies in modern male subfertility treatment. Hum Reprod 1995; 10 (Suppl 1): 103
38. Dodson WC. Is superovulation and intrauterine insemination really an alternative to assisted reproductive technology? Semin Reprod Endocrinol 1995; 13:85
39. Robinson D, Syrop CH, Hammitt DG. After superovulation-intrauterine insemination fails: the prognosis for treatment by gamete intrafallopian transfer/pronuclear stage transfer. Fertil Steril 1992; 57: 606
40. Dodson WC, HaneyAF. Controlled ovarian hypersrimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. Fertil Steril 1991; 55: 457
41. Bergh T, Lundkvist O. Clinical complications during in-vitro fertilization treatment, Hum Reprod 1992; 7: 625
42. Rizk B, Smitz J. Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using GnRH agonists for IVF and related procedures. Hum Reprod 1992; 7:320
43. Ombelet W, Puttemans P, Brosens I. Intrauterine insemination: a first-step procedure in rhe algorithm of male subfertility treatment. Hum Reprod 1995; 10:90
44. Ombelet W, et al. Multiple gestation and infertility treatment: registration, reflection and reaction: the Belgian project. Hum Reprod Update 2005; 11:3
45. De Geyter C, De Geyter M, Nieschlag E. Low multiple pregnancy rates and reduced frequency of cancellation after ovulation induction with gonadotropins, if eventual supernumerary follicles are aspirated to prevenr polyovulation. J Assist Reprod Genet 1998; 15: 111
46. Albano C, et al. Avoidance of multiple pregnancies after ovulation induction by supernumerary preovulatory follicular reduction. Fertil Steril2001; 76: 820
47. Nuojua-Huttunen S, et al. Obstetric and perinatal outcome of pregnancies after intrauterine insemination. Hum Reprod 1999; 14: 2110
48. Wang JX, Norman RJ, Kristiansson P. The effect of various infertility treatments on the risk of preterm birth. Hum Reprod 2002; 17: 945
49. Gaudoin M, et al. Ovulation induction/intrauterine insemination in infertile couples is associated with low-birth-weight infants. Am J Obstet Gynecol 2003; 188:611
50. Ombelet W, et al. Perinatal outcome of 12021 singleton and 3)108 twin births after non-IVF assisted reproduction: a cohort study. Hum Reprod 2006; 21: 1025
51- Ombeiet W, et al. Pros and cons of IUI in male subfertility treatment. Reprod Biomed Online 2003; 7 (Compendium I): 66
52. Ombelet W, et al. Semen quality and intrauterine insemination. Reprod Biomed Online 2003; 7: 485
53. Crosignani PG, Walters DE. Clinical pregnancy and male subfertility; the ESHRE multicentre trial on the treatment of male subfertility. European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod 1994; 9: 1112
54. Steures P, et al. Prediction of an ongoing pregnancy after intrauterine insemination. Fertil Steril 2004; 82:45
55. Iberico G, et al. Analysis of factors influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. Eertil Steril 2004; 8: 1308
56. Hutd WW, et al. Comparison of intracervical, intrauterine, and intratubal techniques fot donot insemination. Fertil Steril 1993; 59: 339
57. Ripps BA, et al. Inttauterine insemination in fertile women delivers larger numbers of sperm to the peritoneal fluid than intracervical insemination. Fertil Steril 1994; 61:: 398
58. Williams DB, et al. Does intrauterine insemination offer an advantage to cervical cap insemination in a donör insemination program? Fertil Steril 1995; 63: 295
59. Oei ML, et al. A prospective, randomized study of pregnancy rates after transuterotubal and intrauterine insemination. Fertil Steril 1992; 58: 167
60. Guzick DS, ct al. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. N Engl J Med 1999; 340: 177
61. Ariel A, et al. Evaluation of clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin treatment: a prospective, randomized, crossover study during intrauterine insemination cycles. Fertil Steril 1999; 61:314

62. Cohlen BJ, et al. Controlled ovarian hypetstimula-tion and intrauterine insemination for treating male subfertility: a controlled study. Hum Reprod 1998; 13: 1553
63. Ombelet W, et al. Intrauterine insemination (IUI) following superovulation: pregnancy rates after single versus repeated inseminations. A prospective randomized study in Proceedings of the 11 th meeting of ESHRE. Hum Reprod (Abstract book 2) 1995; 10: 134
64. Cohlen BJ, et al. The pattern of the luteinizing hormone surge in spontaneous cycles is related to the probability of conception. Fertil Steril 1993; 60: 413
65. ZreikTG, et al. Prospective, randomized, cross-over study to evaluate the benefit of human chorionic gonadotrophin-timed versus urinary luteinizing hormone-timed inttauterine inseminations in clomiphene citrate-stimulated treatment cycles. Fertil Steril 1999; 71: 1070
66. Awonuga A, Govindbhai J. Is waiting for an endogenous luteinizing hormone surge and/or administration of human chorionic gonadotrophin of benefit in intmuterinc insemination? Hum Reprod 1999; 14: 1765
67. Chiu D, et al. Follicular vascularity - the predictive value of transvaginal power doppler ultrasonogra-phy in an in vitro fertilization program. A preliminary study. Hum Reprod 1997; 12: 191
68. Bhal P, et al. Perifotlicular vascularity as a potential variable affecting outcome in stimulated intrauterine insemination treatment cycles, a study using transvaginal powet Doppler. Hum Reprod 1999; 16: 1682
69. Bhal PS, et al. Perifollicular vascularity as a potential variable affecting outcome in stimulated intrauterine insemination tteatment cycles: a study using transvaginal power Doppler. Hum Reprod 2001; 16: 1682
70. Gregory L. Peri-follicular vascularity: a marker of follicular heterogeneity and oocyte competence and a predictor of implantation in assisted conception cycles. In Van Blerkom J, Gregory L, cds. Essential IVF. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004: Ch3
71. Tarin J, et al. Effects of maternal ageing and dietary antioxidant supplementation on ovulation, fertilisation and embryo development in vitro in the mouse. Reprod Nutr Dev 1998; 38: 499
72. Airken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays 1994; 16: 259
73. Tsai HD, et al. Artificial insemination; role of endometrial thickness and pattern, of vascular impedance of the spiral and uterine arteries, and of the dominant follicle. J Reprod Med 2000; 45: 195
74. Hock DL, et al. Sonogtaphic assessment of endometrial pattern and thickness Jn patients treated with clomiphene citrate, human menopausal gonadotropins and intrauterine insemination. Fertil Steril 1997; 68: 242
75. DC Geyter C, et al. Prospective evaluation of the ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1,186 infertile women. Fertil Steril 2000; 73: 106
76. Gcrli S, et al. Use of ethinyl estradiol to reverse the antiestrogenic effects of clomiphene citrate in patients undergoing intrauterine insemination: a comparative, randomized study. Fertil Steril 2000; 73:85
77. Perez-Medina T, et al. Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study. Hum Reprod 2005; 20: 1632
78. Wood EG, et al. Ultrasound-guided soft catheter embryo transfers will improve pregnancy rates in invitro fertilization. Hum Reprod 2000; 15: 107
79. Lindheim SR, Cohen MA, Sauer MV. Ultrasound guided embryo ttansfer significantly improves pregnancy rates in women undergoing oocyte donation. Int J Gynaecol Obstet 2000; 66: 281
80. Burke LM, ec al. Predictots of success after embryotransfer: experience from a single provider. Am J Obstet Gynecol 2000; 182: 1001
81. Ghazzawi IM, et al. Transfer technique and catheter choice influence the incidence of transcervical embryo expulsion and the outcome of IVF. Hum Reprod 1999; 14:677
82. Smith KL, et al. Does catheter type affect pregnancy rate in intrauterine insemination cycles? J Assist Reprod Genet 2002; 19: 49
83. Lavie O, et al. Ultrasonographic endometrial changes after intrauterine insemination: a comparison of two catheters. Fertil Steril 1997; 68: 731
84. Fancsovits P, et al. Catheter type does not affect the outcome of intrauterine insemination treatment: a prospective randomized study. Fertil Steril 2005; 83: 699
85. Sanmay S, Atasu T, Karacan I. The effect of intrauterine insemination on uterine activity. Int J Fertil 1990; 35: 310
86. Sakkas D, et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod 2000; 15: 1112
87. Hamrnadeh M, et al. Comparison of sperm preparation methods; effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. Int J Androl 2001; 24: 36
88. Nijs M, Ombelet W. Sperm analysis and preparation update. In Van Blcrkom J, Gregory L, eds. Essential IVF. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004: Ch 6
89. Ren SS, et al. Comparison of four methods for sperm preparation for IUI. Arch Androl 2004; 50: 139
90. Dodson WC, et al. A randomized comparison of the methods of sperm preparation for intrauterine insemination. Fertil Steril 1998; 70: 574

91. Boomsma CM, et al. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. Cochranc Database Syst Rev 2004; (3): CD004507
92. McKinney KA, Lewis SE, Thompson W. The effects of pentoxifylline on the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation in human spermatozoa. Andrologia 1996; 28: 15
93. Grigoriou O, et al. Effect of sperm treatment with exogenous platelet-activating factor on the outcome of intrauterine insemination. Fertil Steril 2005; 83: 618
94. Rondebush WE, et al. Platelet-activating factor significantly enhances intrauterine insemination pregnancy rates in non-male factor infertility. Fertil Steril 2004; 82: 52
95. Brown SE, Toner JP, Schnorr JA. Vaginal misoprostol enhances intrauterine insemination. Hum Reprod 2001; 16: 96
96. Barroso G, et al. A prospective randomized trial of the impact of misoprosto! (PgEl) on pregnancy rate after intrauterine insemination (IUI) therapy: a preliminary report. Ginecol Obstet Mex 2001; 69: 346
97. Goldenberg M, et al. Intra-uterine insemination with prepared sperm vs. unprepared split ejaculates. Andrologia 1992; 24: 135
98. Kahn JA, et al. Fallopian tube perfusion: first clinical experience. Hum Reprod 1992; 7: 19
99. Kahn JA, et al. Fallopian tube sperm perfusion (FSP) versus intra-uterine insemination (IUI) in the trearment of unexplained infertility: a prospective randomized study. Hum Reprod 1993; 8: 890
100. Kahn JA, et al. Fallopian tube sperm perfusion used in a donör insemination programme. Hum Reprod 1992; 7: 806
101. Trout SW, Kemmann E. Fallopian sperm perfusion versus intrauterine insemination: a randomized controlled trial and metaanalysis of the literature. Fertil Steril 1999; 71: 881
102. Cantineau AE, et al. Intrauterine insemination versus Fallopian tube sperm perfusion in non-tubal subferrility: a systematic review based on a Cochrane review. Hum Reprod 2004; 19: 2721
103. Biacchiardi CP, et al. Fallopian tube sperm perfusion versus intrauterine insemination in unexplained infertility: a randomized, prospective, crossover trial. Fertil Steril 2004; 81: 448
104. Matilsky M, et al. The effect of ejaculatory frequency on semen characteristics of normozoospermic and oligozoospermic men from an infertile population. Hum Reprod 1993; 8: 71
105. Pellestor F, Girardet A, Andreo B. Effect of long abstinence periods on human sperm quality. Int J Fertil Menopausal Stud 1994; 39: 278
106. Baker HW, et al. Factors affecring the variability of semen analysis results in infertile men. Int J Androl 1981; 4: 609
107. De Jonge C, et al. Influence of the abstinence period on human sperm quality. Fertil Steril 2004; 82: 57
108. Barratt GLR, et al. The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. Hum Reprod 1992; 7: 95
109. Jarow JP, Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. J Urology 1992; 148: 1805
110. Eggert-Kruse W, et al. Circulating antisperm antibodies and fertility prognosis: a prospective study. Hum Reprod 1989; 4: 513
111. Marshburn PB, Kutteh WH. The role of antisperm antibodies in infertility. Fertil Steril 1994; 61: 799
112. Adeghe J-HA. Male subfertility due to sperm antibodies: a clinical overview. Obstet Gynecol Surv 1992; 48: 1
113. Marson PL, et al. Effects of antisperm antibodies in seminal plasma upon sperm function. Int J Androl 1988; 11: 101
114. Acosta AA, et al. Fertilization efficiency of morphologically abnormal spermatozoa in assisted reproduction is further impaired by antisperm antibodies on the male partner's sperm. Fertil Steril 1994; 62: 826
115. Lombardo F, et al. Antisperm immunity in natural and assisted reproduction. Hum Rcprod Update 2001; 7: 450
116. Lombardo F, et al. Antisperm immunity in assisted reproduction. J Reprod Immunol 2004; 62: 101
117. Abbasi R, et al. Cumulative ovulation rate in human menopausal/human chorionic gonadotropin-treated monkeys: 'step-up' versus 'step-down' dose regimens. Fertil Steril 1987; 47: 1019
118. Ransom MX, et al. Does increasing frequency of intrauterine insemination improve pregnancy rates significantly during superovulation cycles? Fertil Steril 1994; 61: 303
119. Silverberg KM, et al. A prospective, randomized trial comparing two different intrauterine insemination regimens in controlled ovarian hyperstimulation cycles. Fertil Steril 1992; 57: 357
120. Ng EH, et al. A randomized comparison of three insemination methods in an artificial insemination program using husbands' semen. J Reprod Med 2003; 48: 542
121. Cantineau AE, Heineman MJ, Cohlen BJ. Single versus double intrauterine insemination in stimulated cycles for subfertilc couples: a systematic review based on a Cochrane review. Hum Reprod 2003; 18:941
122. Comhaire F, ct al. The effective cumulative pregnancy rate of different modes of treatment of male infertility. Andrologia 1994; 27: 217
123. Dodson WC, Haney AE. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. Fertil Steril 1991; 55: 457

124. Friedman AJ, et al. Life table analysis of intrauterine insemination pregancy rates for couples with cervical factor, male factor, and idiopathic infertility. Fertil Sterii 1992; 55: 1005
125. Kirby CA, et al. A prospective trial of intrauterine insemination of motile spermatozoa versus timed intercourse. Fertil Steril 1991; 56: 102
126. Nan PM, et al. Intra-uterine insemination or timed intercourse after ovarian stimulation for male subfertility. A controlled study. Hum Reprod 1994; 9: 2022
127. Plosker SM, Jacobson W, Amato P. Prediction and optimizing success in an intra-uterine insemination programme. Hum Reprod 1994; 9: 2014
128. Yang JH, et al. Two-day IUI treatment cycles are more successful than one-day IUI cycles when using frozen-thawed donör sperm. J Androl 1998; 19: 603

28

İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu: Mevcut Teknik ve Sonuçlar

André Van Steirteghem

Çeviri: *Mutlu Kilciler*[*]

GİRİŞ

İn vitro fertilizasyon'un (IVF) 1978[1] yılında Louise Brown'ın doğuşundan itibaren tubal ve endometriozise bağlı kadın infertilitesi ile açıklanamayan infertilite de etkili bir tedavi yöntemi olduğu ispatlanmıştır. IVF, erkek infertilitesi mevcut olan çiftlerde ise daha az etkili idi. İnseminasyon yapılan oositlerin normal fertilizasyon oranı son derecede düşük idi. Bu da daha az sayıda embriyo oluşması ve siklusların büyük kısmında transfer için yeterli sayıda embriyo olmaması anlamına gelmekte idi[2].

Böylece 1980'lerin sonlarında geleneksel IVF uygulanamayan hastalarda çeşitli yardımlı üreme teknikleri geliştirilmiş ve uygulamaya konulmuştur. İlk uygulanan yardımla üreme tekniklerinden olan parsiyel zona diseksiyonu (PZD) ve subzonal inseminasyon (SUZI) başarılı sonuçlar vermiştir. Ancak tüm sonuçlar değerlendirildiğinde PZD ve SUZI sonrası fertilizasyon oranları düşük ve değişken olup gebelik ve doğum oranları da çok düşük idi ve buda PGD ve SUZI'nin rutin klinik uygulamasını engelliyordu. Temmuz 1992'de çalışma grubumuz tek spermatozonun oosit içersine enjekte edildiği yardımla üreme tekniği olan intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrası oluşan embriyonun transferi ile oluşan ilk gebelikleri ve doğumu rapor etmişti[3]. Başlangıçta ICSI ile gözlemler fertilizasyonun ICSI ile SUZI'ye göre daha başarılı olduğunu ve transfer için ICSI'de daha fazla embriyo elde edilebildiğini göstermektedir[4]. Bu bulgular nedeni ile 1992 yılından itibaren bizim merkezimizde yardımla üreme yöntemi uygulanması gerektiğinde ICSI uygulanmıştır. Takiben yıllık olarak yapılan tedavi sikluslarının sayısındaki artış gibi dünyada ICSI'yi öneren merkez sayısında da artış olmuştur[6]. ICSI tüm dünyada ciddi oligoastenoteratozospermia, testiküler fonksiyon bozukluğu veya dışa akım kanalların obstrüksiyonuna bağlı infertilite tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır[7,8].

Bu bölümün ilk kısmında endikasyonlar vurgulanmakta, ICSI prosedürü ve sonuç parametreleri (fertilizasyon ve embriyo klivajı yanı sıra gebelik ve doğum) gözden geçirilmektedir. İkinci kısımda ise gebelik sonuçları ve ICSI sonrası doğan çocukların sağlığı gözden geçirilmektedir.

İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONUN MEVCUT UYGULAMASI

ICSI endikasyonları

ICSI, modifiye IVF prosedürlerinin (inseminasyon konsantrasyonun yüksekliği de dahil) kullanımını önemli oranda gölgede bırakmıştır. ICSI'da, her oositin fertilizasyonu için fonksiyonel genomu ve sentrozomu olan tek bir spermatozoa gerekmektedir. ICSI endikasyonları bozuk sperm morfolojisi ile

[*] Bursa Askeri Hastanesi, Kadın Doğum ve Hastalıkları Kliniği, Bursa.

sınırlı olmayıp, düşük sperm sayısı ve spermlerin hareketlerinin bozuk olduğu durumlarıda kapsar. ICSI'de aynı zamanda sekretuvar kanallar tıkalı olduğunda testisten yada epididimden alınan spermatozooda kullanılır. Eğer testiküler doku örneklerinden yeterli spermatozoa elde edilebiliyorsa testis yetmezliği nedeni ile oluşan azospermi ICSI ile tedavi edilebilir. Tablo 28.1'de ICSI endikasyonları özetlenmektedir[9,10]. Sperm DNA'sı gibi ekstra DNA kontaminasyonundan kaçınmak için, özellikle polimeraz zincir reaksiyonu teşhis için kullanıldığında, ICSI preimplantasyon genetik tanıda inseminasyon işlemi olarak kullanılır. İlk klinik uygulamasından önce, ICSI prosedürü Brüksel Vrje Üniversitesi Medical kampusu etik komitesi tarafından değerlendirilmiş ve uygun bulunmuştur. Tedaviye başlamadan önce çiftler, tedavinin çağdaş yönleri, ICSI tedavisi ile ilgili mevcut veriler, bugüne kadar ki geç dönemki muhtemel riskler konusunda bilgilendirildi. Hastalar prenatal teşhis olup olmaması ve doğan çocukların ileri doğru takibine iştirak açısından sorgulanmıştır[11].

ICSI prosedürü ve sonuçları

ICSI'de over stimulasyonu ve oosit toplanması geleneksel IVF tedavisi ile benzerdir. Pek çok vakada gonadotropin salıcı hormon agonist/antagonisti (GnRH) ile beraber üriner yada rekombinant gonadotropinler kullanılır. Ovulasyon indüksiyonu genellikle üriner human koryonik gonadotropini kullanılarak yapılır. (hCG). Çok sayıda siklusun gözden geçirilmesi nedeni ile ICSI sonuçları tahmin edilebilmektedir.Yaklaşık olarak 12 kümülüs-oosit kompleksleri (COCs) toplanmıştır. Kümülüs ooforus ve korona radiata hücreleri mekanik veya enzimatik işlemler ile çıkarılır. Mikroskopik olarak değerlendirme, ortalama olarak COC nin yaklaşık %95'inin intakt zona pellusidalı oosit, COC nin %82'si tek polar cisim içeren metafaz II oosit, COC'nin %10'u germinal vezikül aşamasında oosit ve %3'ü de metafaz I oositleri içerdiğini ortaya koymaktadır. ICSI sadece metafaz II oositlerde uygulanmaktadır[12].

ICSI işlemi için oosit, tutucu pipet ile hareketsiz hale getirilir; tek spermatozoanın aspirasyonu için iç çapı 6 mikrometre olan enjeksiyon pipeti kullanılır. Bu pipetler ticari olarak mevcut olup aynı zamanda laboratuarda da yapılabilmektedir. Aspirasyondan önce sperm polivinil prolidone ile hareketsiz hale getirilir. Morfolojik olarak normal spermin kuyruk kısmı ilk girecek şekilde pipet içerisine aspire edilir. Aynı zamanda spermin hareketsizleştirilmesi kuyruğunun enjeksiyon pipeti ile ezilmesi ile de başarılabilmektedir. Enjeksiyon pipeti zona pellusida tabakasından ilerletilir ve oosit membranı stoplazmaya doğru birinci polar cisimden uzakta olacak pozisyonda geçilir.

Tablo 28.1: *İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu endikasyonları*

Ejekule spermatozoa
Oligozoospermi
Astenooozospermi (%100 hareketsiz spermatozoa
Teratozoospermi (Kesin kriterlere göre %4 den az normal morfoloji
Yüksek titrede antisperm antikorları
Konvansiyonel in vitro fertilizasyon sonrası tekrarlayan fertilizasyon başarısızlığı
Remisyondaki kanser hastaların kendisinden alınan dondurulmuş sperm
Ejekülasyon bozuklukları (elektroejekülasyon, retrograd ejekülasyon)
Epididimal spermatozoa
Vaz deferenslerin konjenital bilaterl yokluğu (CBAVD)
Young sendromu
Başarısız vazoepididimostomi işlemi
Başarısız vazovazostomi
Her iki ejekülator kanalın obstrüksiyonu
Testiküler spermatozoa
Epididimal sperm için olan tüm endikasyonlar
Fibrozis nedeni ile başarısız epididimal sperm elde edilmesi
Testiküler yetersizlik nedeni ile olan azospermi (maturasyon duraklaması, germ hücre aplazisi)
Nekroozospermi

Ejekulattaki sperm ile yapılan ICSI'den sonra, enjeksiyon yapılan oositlerin 2/3'ünden fazlası normal olarak fertilize olur. Obstruktif olmayan azospermi de cerrahi olarak elde edilen spermle fertilizasyon oranı ejekulattaki spermle olana göre düşük olmasına rağmen yine de %50'den fazladır[13,14]. ICSI sonrası normal olarak fertilize olan oositlerin gelişimi IVF'e benzer şekilde değerlendi-

rilmiştir. Fertilize olan oositlerin %80'inden fazlası transfer için yeterli morfolojik kalitededir. Tüm sperm çeşitleri için, normal fertilize olan oositlerden transfer yada dondurulan embriyoların oranı %60 ila %65 arasındadır. Obstruktif olmayan azospermide normal fertilizasyon oluşumunda bozukluk vardır. Aynı şekilde obstruktif olmayan azospermide tekrarlanan cerrahi nedeni ile testiküler doku hasarlanabilmektedir[16].

ICSI'den sonra fertilizasyonun oluşmaması çok az sayıda oosit mevcut bulunmasına, total hareketsiz sperm mevcut olmasına, tüm spermlerde akrozom olmaması ve/veya tüm oositlerin anormal morfolojiye sahip olması veya injeksiyon esnasındaki direkt hasarlanmaya bağlı olarak oluşmaktadır. Fertilizasyon sıklıkla daha sonraki sikluslar da oluşmaktadır[17,19]. IVF/ICSI kayıtlarındaki verilere göre, yardımla üreme sikluslarının önemli kısmında fertilizasyon işlemi olarak ICSI uygulanır. Dünyada pek çok çalışma grubu sperm parametreleri normal olsa bile, geleneksel IVF'den kaçınmakta ve ICSI'yi standart işlem olarak sık kullanmaktadır[7,20]. Tablo 28.2'de gösterildiği şekilde, Avrupa IVF ve ICSI[7] kayıtlarından elde edilen verilere göre ICSI grubunda IVF ile karşılaştırıldığında başlatılan her siklus başına oosit toplama oranları aynı, her oosit toplanması işlemi sonrası daha fazla embriyo transferi ve her embriyo transferi içinde benzer sayıda gebelik sayıları bulunmuştur. ICSI grubunda hastanın oosit toplama aşamasına gelmesi, kadın eşin fertilitesinin bozulmamış olduğu gerçeğini göstermektedir. ICSI grubunda daha az oranda beklenmeyen fertilizasyon yetersizliği; ancak embriyolar elde edilebiliyorsa, ICSI ile IVF ile aynı oranda gebelik oranları elde edilmektedir[21].

Tablo 28.2: *Avrupada 2001 yılında yapılan in vitro fertilizasyon (IVF) ve İntrastoplazmik enjeksiyon (ICSI) sonuçları*

	IVF	ICSI
Tedavi siklusları (n)	120946	114378
Aspirasyonlar (n)n	107823	103538
Aspirasyonlar/başlatılan siklus (%)	89.1	90.5
Embriyo transferleri (n)	93482	95919
Embriyo transferleri/aspirasyonlar (%)	86.7	92.6
Gebelikler/embriyo transferleri (%)	29.0	28.3

Orta derecede Oligoastenoazospermili (OAT) hastalarda kardeş oositlerin meta analizinde, ICSI' den sonra fertilizasyon şansı IVF'e göre göre 3.9 kat daha fazladır. IVF sonrasında bir tam fertilizasyon yetersizliğini tedavi etmek için 3 kez tedavi işlemi gerekebilmekte, bu da orta derecede OAT'de fertilizasyon yetersizliğini önlemek için geleneksel IVF yerine 3 ICSI yapılması gerektiğini göstermektedir[22]. İngiltere'de yapılan yapılan randomize kontrollü bir çalışmada erkek faktörü bulunmayan subfertil 415 çiftin 435 tedavi siklusunda (IVF, n=224; ICSI, n=211) implantasyon oranları ICSI ye göre IVF grubunda daha fazla idi (95/318 (%30) vs. 72/ 325 (%22) rölatif risk (RR) 1.35 (%95 güvenlik aralığı (CI)1.04-7.6). Her siklus için gebelik oranları IVF sonrası 72 (%33'e karşı 53 (%26) daha fazla idi. Yazarlar bu sonuçlara göre erkek faktörünün sorumlu olmadığı subfertil hastalarda ICSI'nin IVF'e göre bir avantajı olmadığı sonucuna varmışlardı. Yazarlar ICSI'nin sadece ciddi erkek faktör infertilitesi olan vakalarda uygulanmasını desteklemektedirler[20,23]. ICSI'nin tüm yardımla üreme sikluslarında tedavi seçeneği olması önerilmektedir. Eğer bu öneri daha ileri çalışmalar yapılmadan benimsenirse laboratuar zamanının gereksiz harcanmasına, medikal kaynaklar ve her şeyden önemlisi gametlerin doğal seleksiyon mekanizmasının by pass edilmesi ve tekniğin kendisinin invazifliğinden dolayı ciddi sonuçlar ortaya çıkarabilir[24].

DOĞAN ÇOCUKLARIN SAĞLIĞI VE SONUÇLAR

Tüm yardımla üreme teknikleri (ART) içersinde en önemli sonuç parametresi özellikle tek bir bebeğin doğumunda daha belirgin olmak üzere ART ile doğan bebeğin sağlık durumudur[25]. Uzun yıllar süren ART uygulamalarına rağmen ovulasyon indüksiyonu sonrasında planlı ilişki yada inseminasyon sonrasındaki gebelik ve doğum komplikasyonları açısından risk hakkında bilgi vermek mümkün değildir. Sadece IVF ve ICSI çalışmalarından risklerin değerlendirilebilmesi için veriler elde edilebilir. Bunlara rağmen IVF ve ICSI çalışmalarının dizaynında ART işleminin kendisinin mi yoksa infertilitenin altta yatan nedeninin mi sonuç parametrelerini etkilediği konusunda belirsizlikler vardır[26]. Burada ART uygulamalarının çeşitli yönleri gözden geçirilmektedir. Bunlar arasında gebelik komplikasyonları, major malformasyonlar ve kötü perinatal sonucun muhtemel sebepleri yanı sıra ART'ye bağlı çoğul gebelikler gözden geçirilmektedir.

Gebelik komplikasyonları

IVF ile doğan tekiz bebeklerin perinatal sonuçları yeni yapılmış olan meta-analizde değerlendirilmiştir[27]. 1978 ile 2002 yılları arasında yapılmış olan çalışmada 12283 IVF ve ICSI gebelikleri içeren grup ile spontan olarak oluşan 1.9 milyon tekiz gebelik grubu anne yaşı ve pariteye göre karşılaştırılmıştır. Spontan gebelikler ile karşılaştırıldığında, IVF ve ICSI gebelikleri perinatal mortalite, erken doğum, düşük doğum ağırlığı, çok düşük doğum ağırlığı ve gestasyonel yaşa göre küçük olma gibi perinatal sonuç açısından önemli oranda risk artışı göstermekte idi. ART sonrası oluşan tekiz gebeliklerde erken doğum, spontan erken doğum, plasenta previa, gestasyonel diabet, preeklampsi ve neonatal yoğun bakım ünitesine başvuru oranları artmış idi. IVF yapılacak hastalara bu kötü perinatal sonuçlar konusunda bilgi verilmeli ve obstetrisyenler bu gebelikleri yüksek riskli gebelik olarak takip etmelidirler.

Helmerhorst ve arkadaşlarının ART sonrası oluşan tek ve ikiz gebeliklerin perinatal sonuçlarının sistematik değerlendirmesi yukarıdaki meta analizdeki tek gebeliklerde ortaya çıkan verileri desteklemiştir[28]. Bu sistematik gözden geçirmede 1985 ve 2002 yılları arasında yayınlanmış olan 17 karşılaştırma yapılmış, 8 tane de karşılaştırma yapılmamış 25 çalışmayı içermekte idi. Bu inceleme tek gebelikler açısından çok erken doğum (32 haftadan önce) ve erken doğum (37 hafta) riskinde önemli oranda artmayı göstermiştir. Aynı zamanda çok düşük doğum ağırlığı (1500 gr'dan az), düşük doğum ağırlığı (2500 gr'dan az), gestasyonel yaşa göre küçük olma, sezaryen oranı, yeni doğan bakım ünitesine başvuru rölatif riskinde de artış saptanmıştır. Karşılaştırma yapılmış ve yapılmamış çalışmalar da aynı sonuçları vermiştir. Karşılaştırma yapılmış yada yapılmamış ikiz gebeliklerde yukarıdaki sonuç parametreleri ART ve kontrol grubunda benzerdi. Spontan ikiz gebeliklere göre yardımla üreme tekniği sonucu oluşan ikiz gebeliklerde perinatal mortalite oranı daha düşük idi.

Major malformasyonlar

IVF yada ICSI sonrası major konjenital malformasyon riskinin artıp artmadığı yeni yapılmış 2 meta-analizde gözden geçirilmiştir[29,30]. Hansen ve arkadaşlarının[29] yaptığı meta-analizde IVF ve ICSI'de genel olarak risk artımı gösterilmiştir[29]. Aynı zamanda IVF sonrası doğan tekiz çocuklar yada ICSI tekiz çocukları ayrı ayrı değerlendirildiğinde sonuç aynı idi. Major doğumsal defektler açısından risk 1.32 idi (%95 sınırları içersinde 1.20-1.45).

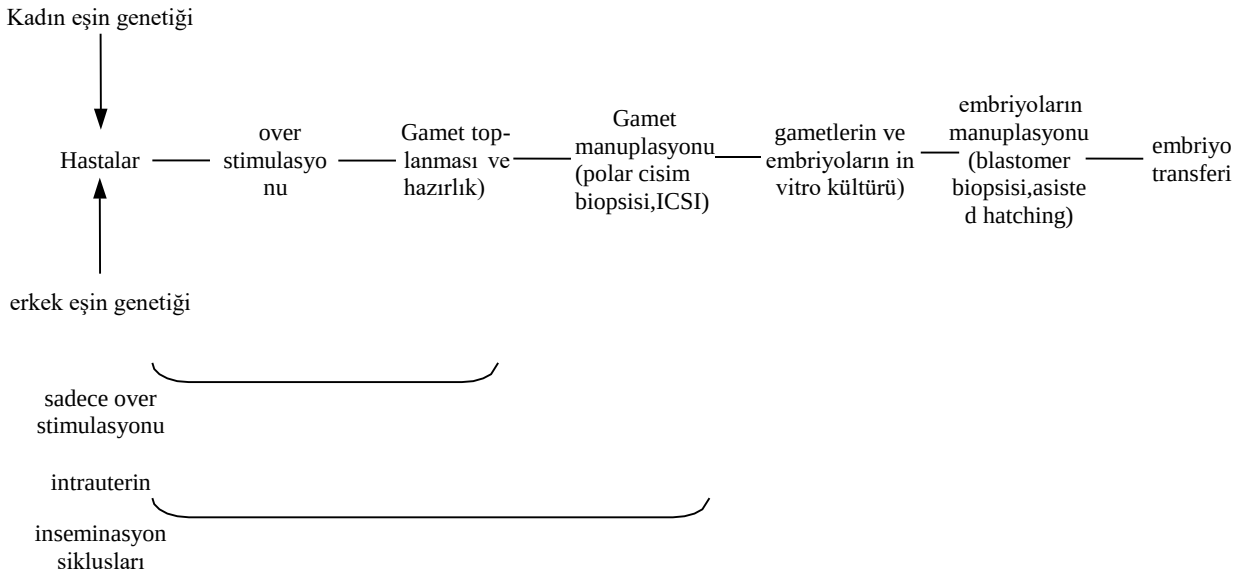
Lie ve arkadaşları[31] tarafından yapılan metaanalizde, 5935 ICSI sonrası doğan çocuklar ile 13086 konvansiyonel IVF çocukları major malformasyonlar açısından karşılaştırılmıştır. ICSI sonrası major malformasyon riski 1.3 kat artmış olarak bulunmuştur (%95 sınırları içersinde 0.97-1.28).

Rimm ve arkadaşları[30] yapılan meta-analizde spontan gebelik sonrası doğan çocuklar ile karşılaştırıldığında IVF ve ICSI çocuklarında major malformasyon riskinin arttığını doğrulamaktadır. IVF ve ICSI birbiri ile karşılaştırıldığında aralarında risk bakımından farklılık yok idi.

ICSI (n=540), IVF (n=538) ve spontan gebeliği (n=437) takiben doğan bebeklerin 5 yaşındaki fiziksel sağlığını değerlendiren çok merkezli kohort çalışmasında[32], doğal gebelik ile karşılaştırıldığında ICSI için risk oranı 2.77 (%95 1.41-5.46), IVF için 1.80 (0.85-3.81) olduğunu göstermiştir. Sosyodemografik faktörler sonucu etkilememiştir. ICSI grubunda gözlenen yüksek risk kısmi olarak erkeklerin ürogenital sistemindeki konjenital bozuklukların artışına bağlıdır. Ayrıca IVF ve ICSI çocuklarında daha yüksek oranda çocukluk dönemi hastalıkları, cerrahi operasyon, medikal tedavi ve hastaneye başvuru durumu gözlenmiştir. Bu çocukların takip edilmesi önemli olacaktır. Ludwig[33] tarafından bildirildiği şekilde, çeşitli ART işlemleri sonrasında oluşabilen major malformasyon oranının fertil çiftlerdeki spontan gebelikler ile karşılaştırılmasında belirsizlikler vardır. Bu durum özellikle over stimulasyonu ve intrauterin inseminasyonda belirgindir. Bu çalışmaların major kısıtlayıcı tarafları ise kontrol kohort grubunun olmaması, belirgin tanımların olmadığı tarihi kontrol grubunun olmaması ve kontrol ve çalışma gruplarında bilgi toplanmasında problemlerin olması ve major malformasyon teriminin tanımlanmasındaki sıkıntılardır[34].

Perinatal sonucun kötü olmasının muhtemel nedenleri

Ludwig[35] tarafından gösterildiği şekilde ART tedavisinin farklı aşamalarında etkili olan faktörler perinatal sonucun kötü olmasında etkili olabilir (Şekil 28.1).



Şekil 28.1: *Over stimulasyonu ve yardımla üreme tedavilerinin çeşitli evrelerindeki muhtemel etkileşimler. ICSI, intrastoplazmik sperm enjeksiyonu..35.referansın izni ile)*

Kadın yada erkek eşin genetiği sonucu etkileyebilir. İnfertil kadın ve erkeklerde daha yüksek oranda yapısal karyotip anormalliklerinin olduğu belirgin şekilde ortaya konmuştur. Pek çok çalışma anormal spermlerin daha fazla kromozom anomalilerine sahip olduğunu göstermiştir. 1298 ICSI çiftinin genetik danışma için görüldüğü bir çalışma grubunda bu çocukların 557'sinde genetik risk artımı olduğu sonucuna varılmıştır[12]. Bu artmış risk anne yada baba yaşına, kromozomal aberasyonlara, monogenik veya multifaktöryel hastalık ve aynı ailenin üyesi olma durumuna bağlıdır. İnfertil erkeklerin %5'inden daha azında ve test edilen kadınların %1.5'de anormal karyotip mevcut idi.

ART den sonra fetal karyotipin değerlendirilmesinde sadece ICSI için sistemik veriler mevcuttur[36].1586 fetal karyotip sonuçları artan fetal riskin ebeveynlerdeki kromozomal anormalliler ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Pek çok vakada (17/22) baba tarafından geçiş olmakta idi. Önemli oranda yeni oluşmuş anomaliler mevcut idi (%1.6), fakat kesin risk düşük idi. Sperm konsantrasyonu 20 milyon altında ve sperm hareketlerinde bozukluk olduğunda daha fazla oranda anomali gözlenmiştir.

ICSI işleminin konvansiyonel IVF'e göre daha invazif olmasına rağmen ICSI ve IVF'in[29-31,37] arasında sonuç bakımından farklılık yok idi. Bu rhesus maymunlarında IVF ile karşılaştırıldığında ICSI den sonra fertilizasyon anormalliklerinin olması gözlemi ile tezatlık oluşturmaktadır[38].

Teorik olarak, gametlerin hazırlanması ve manuplasyonu, in vitro kültürü, blastomer biopsisi ve assisted hatching gibi gamet ve embriyo manuplasyonları embriyoların yapısını ve bu da sonuçta fetus ve çocuğun sağlığını etkileyebilir. Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE)'nin preimplantasyon genetik teşhis konsorsiyumunda[39] yapıldığı şekilde, pek çok ülkeden IVF ve ICSI sonrası doğan bebeklerin verilerinin toplanması için çaba gösterilmelidir. IVF laboratuarında sıkı kalite kontrolü (kesin sıcaklık kontrolü) sonuç üzerindeki etkisi nedeni ile önemli olup optimum sınırlarda tutulmalıdır.

Yeni bir makalede ART ile doğan bebeklerde imprinting (yazılım) bozukluklarının olduğunu gösteren vaka sunumları ve vaka-kontrol çalışmaları yayımlanmıştır. Bu vakalar Angelmanın sendromu[40] ve Beckwith-Wiedeman Sendromudur[41,42]. Bu imprinting bozuklukları riskinin kesin riski düşük olup, bugüne kadar bu artmış imprinting bozukluklarının nedeni bilinmemektedir.

Buck Louis ve arkadaşlarının[26] özetlediği şekilde tüm sonuçları sınırlayıcı olan kontrol grubunun fertil, çalışma grubunun ise infertil olmasıdır. Bu yüzden karşılaştırmaların subfertil grupta ART gebelikleri ve spontan gebelikler olarak yapılması gerekmektedir. Gebelik komplikasyonları açısından İngiltere'de[43] yapılan bir çalışma gebeliğin spontan yada infertilite tedavisi sonucunda olduğuna bakmaksızın fertil grup ile karşılaştırıldığında idiopatik

infertil grupta daha fazla oranda ablatio plasenta, preeklampsi ve sezaryen riskinin olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde gözlemler Amerika, Danimarka ve İsveç'te de yapılmıştır[44-47]. Riskin neden arttığı sorusu açıklanamamıştır. Bu risk in vitro kültür ortamına bağlı olabilir ya da infertilitenin bizzat kendisinden kaynaklanan risk artışı nedeni ile olabilir. İn vitro yapılan işlemin etkisini değerlendirmek için, malformasyon riskinin saptanabilmesi için over stimulasyonunu tek başına veya inseminasyon ile beraber olacak şekilde karşılaştırılır.

ART sonrası çoğul gebelikler

Farklı ART işlemleri sonrasında risk artışına yol açan en önde gelen faktörün çoğul gebelik ve doğum olduğuna dair kanıtlarda artış vardır. Bu durum ovulasyon indüksiyonu, inseminasyonla birlikte yada tek başına over hiperstimulasyonu ve IVF veya ICSI içinde geçerlidir[48]. IVF-ICSI ile doğan çocukların sayısının yaklaşık 2 milyona yaklaştığı hesaplanmıştır. Bu olumlu gözlem bu çocukların en azından yarısının çoğul gebeliklerden olması ile gölgelenmektedir. IVF ve ICSI'ya bağlı çoğul gebelikler birden fazla embriyonun transferine bağlıdır. Çoğul gebelik ve doğumlar sadece gebelik ve doğum esnasında problem yaratmamakta, hayatın ileri dönemlerinde de problemler yarattığına dair yaygın kanıtlar vardır[48]. Bu yüzden tüm infertilite tedavilerinde çoğul ART gebeliklerinin önlenmesi başlıca öncelik olmalıdır. Tek embriyo transferinin bu çoğul gebelik epidemisine cevap olması aşikardır.

KAYNAKLAR

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the re-implantation of a human embriyo. Lancet 1978; 2: 366
2. Tournaye H, ec al. Comparison of in-vitro fertilization in male and tubal infertility: a 3 year survey. HumReprod 1992; 7: 218
3. Palermo GP, et al. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17
4. Van Steirteghem AC, et al. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod 1993; 8: 1055
5. Van Steirteghem AC, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993; 8: 1061
6. Tarlatzis BC, Bill H. Intracytoplasmic sperm injection: survey of world results. Ann NY Acad Sci 2000; 900: 336
7. Nybo Andersen A, et al. Assisted reproductive technology In Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod 2005; 20: 1158
8. Wright VC, et al. Division of Reproductive Health, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Assisted reproductive technology surveillance - United States, 2002. MMWR Surveill Summ 2005; 54: 1
9. De Vos A, Van Steirteghem A. Gamete and embriyo manipulation. In Strauss JF, Barbieri R, eds. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology; Physiology, Pa tho physio logy, and Clinical Management. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004: 875
10. Devroey P, Van Steirteghem A. A review often years experience of ICSI. Hum Reprod Update 2004; 10: 19
11. Bonduelle M, et al. Pregnancy: prospective follow-up study of 55 children born after subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1994; 9: 1765
12. Bonduelle M, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. Hum Reprod 1999; 14 (Suppl 1): 243
13. Joris H, et al. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. Hum Reprod 1998; 13 (Suppl 1): 76
14. Van Steirteghem AC, et al. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13 (Suppl 1): 134
15. Vernaeve V, et al. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with non-obstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. Fertil Steril 2003; 79: 429

16. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of cesticular sperm extraction. Hum Reprod 1997; 13: 1688
17. Liu J, et al. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. Hum Reprod 1995; 10: 2630
18. Staessen C, et al. One year's experience with elective transfer of two good quality embriyos in the human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection programmes. Hum Reprod 1995; 10: 3305
19. Vandervorst M, et al. Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997; 12: 2429
20. Bhattacharya S, et al. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. Lancet 2001; 357: 2075
21. Staessen C, et al. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. Hum Reprod 1999; 14: 2474
22. Tournaye H. Management of male infertility by assisted reproductive technologies. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2000; 14: 423
23. Van Steirteghem A, Collins J. Evidence-based medicine for treatment: an in vitro ferrilizacion trial. Semin Reprod Med 2003; 21: 49
24. Oehninger S. Place of intracytoplasmic sperm injection in management of male infertility. Lancet 2001; 357: 2068
25- Wennerholm UB, Bergh C. What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Singleton live births should also include preterm births. Hum Reprod 2004; 19: 1943
26. Buck Louis GM, et al. Research hurdles complicating the analysis of infertility treatment and child health. Hum Reprod 2005; 20: 12
27. Jackson RA, et al. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a metaanalysis. Obstet Gynecol2004; 103: 551
28. Helmerhorst FM, et al. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. Br Med J 2004; 328: 261
29. Hansen M, et al. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects - a systematic review. Hum Reprod 2005; 20: 328
30. Rimm AA, et al. A metaanalysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. J Assist Reprod Genet 2004; 21: 437
31. Lie RT, et al. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis. Int J Epidemiol 2005; 34: 696
32. Bonduelle M, et al. A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. Hum Reprod 2005; 20:413
33. Ludwig M. Development of children born after IVF and ICSI. Reprod Biorned Online 2004; 9: 10
34. Kurinczuk JJ, Bower C. Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. BrMedJ 1997; 315: 1260
35- Ludwig M. Is there an increased risk of malformations afer assisted reproductive technologies? Reprod Biomed Online 2005; 10 (Suppl 3): 83
36. Bonduelle M, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. Hum Reprod 2002; 17: 2600
37- Bonduelle M, et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). Hum Reprod 2002; 17:671
38. Hewitson L, et al. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. Nat Med 1999; 5:431
39. Sermon K, ct al. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. Hum Reprod 2005; 20: 19
40. Ludwig M, et al. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. J Med Genet 2005; 42: 289
41. Chang AS, et al. Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. Fertil Steril 2005; 83: 349
42. Halliday J, et al. Bcckwich-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. Am J Hum Genet 2004; 75: 526
43. Pandian Z, Bhattacharya S, Templeton A. Review of unexplained infertility and obstetric outcome: a 10 year review. Hum Reprod 2001; 16: 2593
44. Williams MA, et al. Subfertility and the risk of low birth weight. Fertil Steril 1991; 56: 668
45. Henriksen TB, et al. Time to pregnancy and preterm delivery. Obstet Gynecol 1997; 89: 594
46. Basso O, et al. Subfecundity as a correlate of preeclampsia: a study within the Danish National Birth Cohort. Am J Epidemiol 2003; 157: 195
47. Ghazi HA, Spielberger C, Kallen B. Delivery outcome after infertility - a registry study. Fertil Steril 1991; 55:726
48. Fauser CJM, Devroey P, Macklon NS. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. Lancet 2005; 365: 1807

29

İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu için Sperm Elde Etme Teknikleri

Valérie Vernaeve, Herman Tournaye

Çeviri: *Mete Kilciler*[*]

GİRİŞ

1992'de tanımlandığından beri, intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ciddi erkek infertilitesinin tedavisini dramatik bir şekilde değiştirmiştir[1]. Bu teknik ilk tanımlandığı dönemlerde ağır oligoastenoteratozoosperminin (OAT) tedavisi için kullanılmıştır. Daha sonra, vaz deferens obstrüksiyonundan dolayı azospermisi olan hastalarda veya obstrüktif azospermisi olup cerrahi tedavide başarısız olunan olgularda bir tedavi seçeneği olmuştur. Hem epididimal hem de testiküler sperm başarı ile kullanılmıştır[2-4]. Daha sonraları ise ciddi testiküler yetmezliği olan hastaların testislerinden alınan spermler de başarı ile kullanılmış ve kullanılmaktadır[5-8].

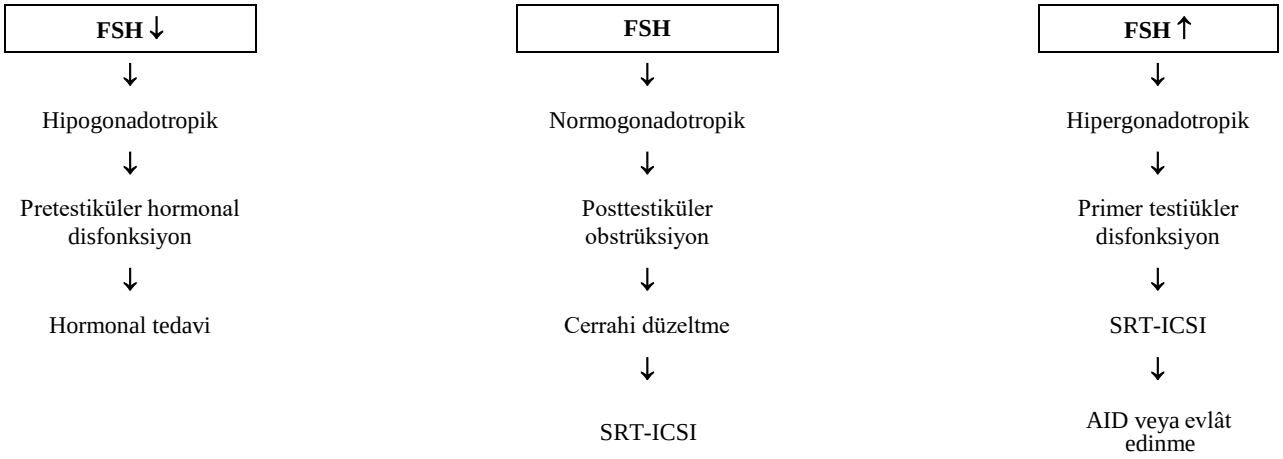
Dünya sağlık örgütüne (WHO) göre, azospermi tanısı en az iki semen örneğinin değerlendirilmesi ile yapılmalıdır[9]. İlk semen analizinde azospermi tanısı konulan 454 erkeğin 2. semen analizlerinde 23'ünde oligozoospermi olduğu tespit edilmiştir[10]. Hatta standart guidelinelere göre yapılan semen analizinde spermatozoa olmadığı görülen hastaların ejekülatlarında bile 15 dakika 1000 g de santrifüj edildikten sonra spermatozoa görülebildiği bildirilmiştir. Ron-El ve arkadaşları[11] azospermili 49 hastanın 17'sinde (%35) bu teknikle spermatozoa elde etmiş ve bu spermatozoaları ICSI'de kullanmışlardır. Bundan dolayı özellikle non-obstrüktif azospermisi (NOA) olan hastalarda testise herhangi bir müdahale yapmadan önce semenin bu tarif edildiği şekilde ayrıntılı incelenmesi önemlidir.

Fertilite problemi olan erkeklerin aşağı yukarı %8'inde azospermi mevcuttur[10]. Bu, genital sistem obstruksiyonundan, spermatogenezis yetersizliğinden veya hipogonadotropik hipogonadizmden dolayıdır. Hipogonadotropik hipogonadizm oldukça nadirdir: Bir çalışmada 3555 subfertilite veya infertilite nedeniyle male faktör olan hastaların sadece 2 tanesinde gözlenmiştir[10]. Hipogonadizme sekonder azospermi çok nadir olduğu için obstrüktif azospermi (OA) ve (NOA) terimleri çok sıklıkla kullanılır. 102 azospermili hastanın olduğu bir çalışma sonuçlarına göre olguların %46'sında obstrüksiyon bulgusu olmadan primer testiküler yetmezlik, %13'ünde 47XXY Klinefelter's sendromundan dolayı primer testiküler yetmezlik ve %14'ünde obstrüksiyon ve beraberinde testis biyopsisinde normal spermatogenez, %27'sinde ise vazografi dahil yapılan tüm klinik çalışmalarda obstrüksiyon bulgusunun olmadığı bununla beraber normal spermatogenezin olduğu görülmüştür[12]. Bu sonuçlar gösterdi ki klinik bulguları, histopatolojik testlerle kombine etmek doğru tanı koymak için tek yoldur.

Obstrüktif azospermili hastanın testis histolojisinde normal spermatogenez veya hipospermatogenez görülür[13]. NOA'de testis histolojisinde fokal spermatogenezli veya fokal spermatogenezsiz maturasyon arresti, fokal spermatogenezli veya fokal spermatogenezsiz germ hücre aplazisi (sertoli cell only sendromu) veya tübüler skleroz ve atrofi görülür.

[*] GATA Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.

Azospermiden dolayı infertiliteye terapotik yaklaşım şekil 29.1'de görülmektedir.



Şekil 29.1 *Azospermi tedavisi. FSH, folikül stimüle edici hormon; SRT, sperm iyileştirme tekniği; ICSI, intrastoplazmik sperm enjeksiyonu; AID, donor spermle artifisiyel inseminasyon*

OBSTRÜKTİF AZOSPERMİLİ HASTALARDA CERRAHİ SPERM ELDE ETME

OA'de epididim sperm elde etmek için uygun bir yerdir. Motil epididimal spermde çok düşük seviyede DNA hasarı görülür ve kriyopreservasyon için yeterli sayıda sperm elde edilebilir[14]. ICSI'de taze ya da dondurulmuş epididimal spermatozoa kullanılmasının sonuç açısından bir farkı yoktur[15]. Epididimal sperm elde etmek için farklı teknikler mevcuttur. Ana teknikler mikrocerrahi ile epididimal sperm aspirasyonu (MESA) ve perkütan epididimal sperm aspirasyonu (PESA)'dır. Bu tekniklerden PESA daha çok kullanılmaktadır. Bununla beraber obstrüksiyonun sebebi ya da bölgesi bilinmiyorsa, skroal eksplorasyon tavsiye edilmektedir. Bu prosedürün diagnostik değeri olduğu gibi, epididimovazostomi veya vazovazostomi gibi rekonstrüktif cerrahi yapılmasına da olanak sağlar[16]. Eğer rekonstrüksiyon uygun değilse, MESA, eksplorasyon esnasında da yapılabilir ve bolca epididimal sperm elde edilebilir ve sonraki kullanımlar için dondurulabilir. Mikrocerrahi ile rekonstrüksiyon mümkün değilse veya endike değilse PESA yapılmalıdır. Bu prosedür MESA'dan daha invaziftir ve lokal anestezi altında hasar verir ve fibrozise sebep olabilir, fakat rekonstrüksiyonun uygun olmadığı yerde bu konu önemli değildir. Elde edilen spermatozoa sayısı MESA ile elde edilenden daha az olabilir ve teşebbüslerin %20'si başarısız olur ve MESA veya testiküler sperm elde etme gerekebilir[20,21]. OA'li vakalarda, ince iğne aspirasyonu (FNA) ile testiküler sperm kolayca elde edilebilir, bu teknikle normal spermatogenezisli erkeklerde sperm elde etme başarı oranı yüksektir[22]. Bununla beraber OA'li vakalarda bile kriyopreservasyon yapılabilecekse ve epididimal sperm elde edilemediği durumlarda testiküler sperm elde etme (TESE) tekniği FNA'ya tercih edilmelidir. Eğer testiküler aspirasyon daha geniş çaplı bir iğne ile yapılırsa, doku silindirleri elde edilebilir ki bu da kriyopreservasyonu kolaylaştırır[23,24]. Maalesef bu alternatif teknikler lokal anestezi gerektirdiğinden FNA'dan daha az tercih edilirler.

NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİLİ HASTALARDA CERRAHİ SPERM ELDE ETME

Önceden başarılı bir şekilde sperm elde etmeyi tahmin edebilir miyiz?

TESE, NOA'li hastalardan sadece %50'sinde başarılı olmaktadır bu yüzden cerrahi prosedürün başarısını önceden tahmin edebilmek çok önemlidir[25]. Azospermik hastalardan testiküler sperm elde edilerek yapılan ICSI için tedavi her iki partnerle beraber yapılır, mesela erkeğe testiküler sperm elde etmek için cerrahi yapılırken, kadına da ovarian stimulasyon ve oosit elde etme işlemi

yapılır. ICSI'de sperm elde edememe durumunda önemli psikolojik ve maddi problemler ortaya çıkar. Tahminlerin temelinde objektif bir değerlendirme çifte ve hekime gerçekçi bekleyişler sunabilir.

Tournaye ve arkadaşları[25] en az bir semen analizinde en az bir spermatozoa mevcudiyeti, maksimum testis volumü, FSH seviyesi ve random alınan testis biyopsisi histolojisinde spermatozoa varlığı gibi farklı potansiyel parametrelerin prediktif değerlerinin olup olmadıklarını araştırdılar. Ve bu parametrelerin hiçbirisinin TESE prosedürünün sonucunu tahmin etmede kullanılamayacağını bildirdiler. Semen analizindeki bulgular en zayıf prediktif parametrelerdir ve histolojide spermatozoanın bulunması TESE esnasında sperm elde etme tahmini için klinik değeri olan tek parametredir. Ezeh ve arkadaşları[26] da yaptıkları çalışma ile bu bulguları doğruladılar ve erkeğin yaşının, vücut kitle oranının, LH, FSH seviyeleri veya testis hacminin TESE'nin başarısını önceden tahmin etmede kullanılamayacağını bildirmişlerdir. Ayrıca testis histolojisinde spermatid varlığının görülmesinin en iyi prediktör olduğunu gördüler. Diğer bir çok çalışmalar da bu bulguları doğruladılar[27-30]. Sertoli hücrelerinin bir ürünü olan inhibin B'nin prediktif değeri de araştırılmıştır[31]. Bu hormonun da yalnız başına ya da FSH ile NOA'li erkeklerde sperm varlığını önceden tahmin etmede faydalı olmadığını bildirdiler.

Brandell ve arkadaşları[32] genetik markırların prediktif etkisinin gücünü araştırdılar. Onlar, başarısız TESE gösteren Y kromozomundaki mikrodelesyondan dolayı faktör b (AZFb) azospermisi bulunan hastalardaki seriyi yayınladılar. Maalesef NOA'li hastaların sadece %5'inde genelde AZFc bölgesinde Yq mikrodelesyonu olduğunu gördüler. Amer ve arkadaşları[33] ise semen içerisinde May-Gründwald-Giemsa boyası ile yuvarlak spermatidlerin bulunmasının başarılı testiküler sperm elde edebilme için kuvvetli bir prediktör olduğunu bildirdiler. Diğer otörler ise seminal plazmadaki antimüllerian hormon seviyelerinin, testiküler dokudaki telomeraz aktivitesinde olduğu gibi, sertoli cell only sendromlu olgularda spermatid bulunması için bir prediktör olabileceğini vurguladılar[34-36]. Hatta 2D'nin 4D'ye oranı da başarılı sperm elde edebilme için bir prediktör olduğu bildirildi[37]. Bu çalışmanın sonucuna göre sperm elde etmede başarısız olunan NOA'li hastalarda başarılı olunanlara göre 2D/4D oranında sol tarafta anlamlı derecede bir azalma olduğu görüldü. Böylece hali hazırda elde edilebilen parametrelerin bazılarıyla, sperm elde edebilme başarısı önceden tahmin edilebilir fakat bu her hasta için geçerli değildir.

Açık biyopsi ile mi yoksa ince iğne aspirasyon biyopsisi ile mi testiküler sperm elde edilmelidir?

NOA'li vakalarda (nonmozaik Klinefelter sendromlu hastalar ile kriptorşidizm hikayesi olan hastalar dahil) sperm, açık TESE yapılan hastaların aşağı yukarı yarısında elde edilir[25,38,39]. Açık biyopside hematom inflamasyon ve devaskülarizasyon gibi yan etkiler görülebilir[40-42]. Netice olarak FNA gibi daha az invazif teknikler defektif spermatogenezi olan hastalarda kullanılabilir. 1996'da Lewin ve arkadaşları[43] maturasyon arresti olan hipergonadotropik azospermili bir erkekte FNA ile elde edilen spermle yapılan ICSI neticesinde doğumla gerçekleşen bir vaka raporu yayınladılar. 85 çift üzerinde açık cerrahi yapılan prospektif bir çalışmada bu tekniğin uygulanabilirliği konfirme edildi ve prosedürün %58.5'inde sperm elde edildi[44]. Aynı grup tarafından ilk FNA'da sperm elde etmenin yüksek prediktif değeri olduğu raporlandı[45]. Başka iki grup NOA'li hastalarda bu tekniğin gerçekleştirilebileceğini gösterdiler[18,46]. Bununla beraber diğer gruplar bu sonuçları doğrulamadılar. Friedler ve arkadaşlarınca yapılan kontrollü bir çalışmada[47] görüldü ki FNA ile sperm elde etme NOA'li hastalarda TESE'den daha az etkili bir metotdur. FNA'da sperm elde etme oranı %11 iken TESE'de %43'dür. Diğer iki kontrollü çalışmalarda açık biyopsi ile karşılaştırılınca multipl iğne biyopsilerinde anlamlı derecede daha çabuk iyileşme oranı olduğu raporlandı[48,49]. NOA tanımındaki farklılıklar nedeniyle, histopatolojiye bakılmadan sadece klinik verilerle seçilen hipospermatogenezisli hastalardan dolayı bu çelişkili bulgular bulunmuş olabilir.

Multipl testis biyopsisi mi yoksa tek testis biyopsisi mi?

NOA'li hastalarda tüm testisin içinde spermatogenez dağılımının multifokal olduğunu varsaydıklarından bazı otörler testiküler fonksiyondaki yan etkilerinden kaçınmak için sadece tek bir biyopsi almayı uygun görürler[50,51]. Tek bir testis biyopsisinde spermatozoanın bulunmaması, testisin geri kalanında spermatozoa olmayacağı anlamına gelmez[52]. Bundan dolayı

yüksek başarı oranı elde etmek için multibl biyopsi önerilebilir[6,53]. Havser ve arkadaşları[54] NOA'li hastaların %46'sında spermatozoanın ancak multibl biyopsilerle elde edilebileceğini yayınladılar.

Mikrocerrahi ile mi yoksa konvansiyonel yolla mı testiküler sperm elde edilmeli?

Testiküler hasar riskini mümkün olduğu kadar minimal düzeye indirmek, sperm elde etme oranını artırmak ve laboratuvarda sperm elde etme için çalışma ihtiyacını azaltmak için ameliyatta mikroskop veya görüntüyü büyütücü optiklerin kullanımı önerilmektedir[55-57]. Bu tekniklerin sonuçları, sertoli cell only sendromunda olduğu gibi, çok önemli olan spermatozoa içeren tübüller daha büyük gösterildiğinden cesaret vericidir[55,57,58]. Bununla beraber maturasyon arrestinde olduğu gibi, büyümüş tübülleri olmayan vakalarda bu tekniklerin iyileşme oranını artırıp artırmadığı belirgin değildir. Bu öneriyi gold standart olarak kabul etmeden önce iyi tanımlanmış ve seçilmiş NOA'li hastalarda yapılacak randomize prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaç kez TESE prosedürü yapılmalı?

Literatürde, TESE prosedürlerinin tekrarının sonuçları hakkında bilgi veren yayınlar azdır. Schlegel ve arkadaşları[40] TESE'nin 6 ay veya daha fazla aralıklarla tekrarlanmasını önermişlerdir çünkü daha kısa aralıklarla yapıldığında sperm recovery oranları %80'den %25'lere düşmektedir. Amer ve arkadaşları[53] ise 3 aydan daha kısa aralıklarla TESE yapılanlarda, sperm recovery oranını %75, 3 ay ve daha uzun aralıklarla TESE yapılanlarda ise sperm recovery oranının %94.7 olduğunu bildirdiler. Diğer bir yayında ise TESE prosedürünü 2-5 kez yapmanın sonuçları değerlendirildi. Bu çalışmada tekrarlayan TESE prosedürlerinde, 4. tekrara kadar gebelik oluşabildiği fakat 5.'de gebelik oluşmadığı görülmüştür[59].

TESTİKÜLER SPERM KULLANILMASI SONRASINDA ICSI SONUÇLARI

Obstrüktif azospermili hastalarda, epididimal sperm kullanılması sonrasında fertilizasyon oranları ve hamilelik sonuçları ejaküle sperm kullanılarak ICSI uygulananlara benzemektedir[60]. Dahası, spermatogenezisi normal olan hastalardan alınan testiküler sperm kullanılarak yapılan ICSI sonrası hamilelik oranları epididimal spermatozoa kullanılarak uygulanan ICSI sonrası elde edilen hamileliklerle kıyaslanabilir olduğu gösterilmiştir [61-62]. Dondurulup çözülen epididimal spermatozoa kullanımı sonrasında ICSI sonuçları çoğu raporda taze elde edilen spermatozoa kullanılanlarla kıyaslanabilir[15,62-66].

Epididmal spermatozoaya göre, taze ya da dondurulup çözülen spermatozoa kullanılarak yapılan ICSI sonuçları dahi kıyaslanabilir[67,68]. Bununla birlikte, dondurulup çözülen testiküler sperm kullanılan küçük bir çalışmada sonuçlar anlamlı oranda düşüktür [69]. Bu yüzden OA'li erkeklerde, taze veya donmuş epididimal veya testiküler sperm arasındaki tercihin oturmuş tıbbi zeminden ziyade elverişliliğe dayanacağı sonucunu çıkarabiliriz.

NOA'li erkeklerde testiküler sperm kullanılan ICSI sonuçları hakkında birtakım yayınlar basılmıştır. Genellikle küçük serilerle çalışılan çoğu çalışmalar, azospermisi primer testiküler yetmezlikten kaynaklanan hastalarda kabul edilebilir fertilizasyon ve hamilelik oranları bildirilmiştir [8,44,51,70-77]. Diğer çalışmalar OA ile kıyaslandığında kabul edilebilir hamilelik oranları fakat düşük fertilizasyon oranları saptamıştır[78-81]. Ubaldi ve ark[83]. OA veya ejaküle sperme kıyasla NOA'de kabul edilebilir fertilizasyon ve hamilelik oranları bulmuş fakat NOA'li hastalarda implantasyon oranlarında önemli azalma saptamıştır. Ghazzawi ve ark. [84] NOA çiftler arasında, yüksek fertilizasyon ve hamilelik oranları fakat düşük canlı doğum oranı ile sonuçlanan yüksek abortus oranı bulmuştur.

Diğer otörlerde bu hasta popülasyonunda düşük fertilizasyon ve/veya hamilelik oranları saptamıştır[85-92]. Güncel bir meta-analiz NOA ile kıyaslandığında OA'li erkeklerde anlamlı gelişmiş fertilizasyon oranı (rölatif risk (RR) 1.18, emniyet aralığı (CI) %95 1.13-1.23) ve klinik hamilelik oranı (RR 1.36, CI %95 1.10-1.69) ile birlikte devam eden hamilelik oranında anlamsız artma göstermiştir[62]. Bu meta-analiz iki grup arasında implantasyon oranı ya da düşük yapma oranının ikisinde de bir fark bulamamıştır. Yayınlanmış raporlar arasında ki bu farklılıklar incelenen hasta popülasyonunun heterojenitesi gösterilerek kolayca açıklanabilir. Bu raporların çoğunda, hasta seçimi hazırlık biopsisi sonrasında yapılmıştır[44,73-75,77,79,84,85,89]. Bazı serilerde, NOA'li hastaların büyük

grubu testiküler histolojide hipospermatogenezis göstermiştir [44,72-75,83]. Bu yayınlardan bazıları küçük vaka-serileri ile uğraşmıştır[7,8,70,85,86,88,89]. NOA tanımlaması sıklıkla net olmayıp sadece klinik parametrelere dayanmaktayken geçerli bir histolojik tanı mevcut değildir [78,81,87,90].

Nicopoullos ve ark'nın meta-analizinde[62] yer almayan büyük bir çalışma, iyi tanımlanmış (klinik ve histolojik) NOA'li 235 hastada 306 siklusun ardışık serilerinin sonuçlarını analiz etmiştir[93] . Kontrol grubu normal spermatogenezisi olan 360 azospermik erkekte uygulanan 605 siklusu kapsamaktadır. Bu daha büyük serilerde, NOA'li erkekler ile OA'li erkekler kıyaslandığında anlamlı düşük fertilizasyon oranları %48.5 ve %59.7 saptanmıştır. Klinik implantasyon oranı ve siklus başına klinik hamilelik oranının ikisi de OA ile kıyaslandığında NOA grubunda anlamlı olarak düşüktür: sırasıyla %8.6 vs %12.5 ve %15.4 vs %24. eğer bu seriler meta-analize dahil olsaydı, tartışma muhtemelen daha farklı olacaktı. Üstelik meta-analiz aynı hasta serileriyle ilişkili farklı yazıları dikkate almaktadır (aynı grubun genişletilmiş hasta serilerinden tekrarlanan yayınlar).

Hastalara daha uygun tavsiyelerde bulunmak için Osmanoğlu ve ark.[94], NOA'li azospermik erkeklerden testiküler spermle ICSI'ye giden çiftlerde hayat-tablo istatistiği hesaplamıştır. Üç siklustan sonra baba olmanın beklenen ihtimali, %31 olan NOA grubuna kıyasla OA grubunda %48 olarak gözlenmiştir. Bu bulgular ICSI sonrası NOA hastalarında OA hastalarından daha kötü gerçekleştiği bulgusunu doğrulamaktadır.

Başlangıçta, ICSI'ye giden NOA'li hastalarda esas olarak taze testiküler sperm kullanılmaktaydı. Donmuş testiküler sperm teorik olarak çok sayıda biyopsiyi gereksiz hale getirmekteydi. Tüm NOA hastalarında TESE başarılı olamadığı için, önce testiküler biyopsi alıp dokuları sonra kullanım için dondurmak çoğu NOA'li çiftlerin bayan eşlerinde anlamsız ovaryan stimülasyonu engelleyebilir. Bunun yanında, literatürde azospermik hastaların bu özel alt grubuna yönelen yetersiz bilgi vardır[95-99]. Güncel bir çalışma, 69 histolojik olarak tanımlanmış NOA'li hastada dondurulup çözülen testiküler spermle planlanmış ICSI siklusunun sonuçlarını değerlendirmiştir[100]. Sonuçlar taze testiküler sperm kullanılarak yapılan ICSI sonuçları ile kıyaslanabilir: dondurulup çözülen ve taze testiküler sperm kullanılan sikluslarda sırasıyla embriyo transferi başına hamilelik oranları %25 ve %17.9 dur. Yerine konan embriyo başına implantasyon oranı %11.3 ve taze testiküler sperm kullananda %8.6 idi. Dondurulup çözülen spermatozoa ile daha iyi sonuçlara doğru gözlenen eğilim hasta seçimi ile açıklanabilir: dondurulup çözülen grup testiküler biyopsi kalitesi kriyoprezervasyona müsade eden yeterlilikte olan hasta alt grubunu temsil etmektedir.

Bununla birlikte testiküler örneklerin başlangıçta dondurulmasını içeren yaklaşım, en az bir spermatozoon gözlemlenen tüm doku örnekleri dondurulduğu zaman önemli bir dezavantaja sahiptir. Böyle hastaların yaklaşık %20'sinde ICSI için hiç spermatozoa geri alınamaz. Hala böyle çiftlerin çoğunluğunda başarılı taze geri alımı uygulanabilir. Hastalar, ne zaman başarılı olarak spermatozoa bulunursa sonrasında kriyo-prezervasyon uygulanan ön biyopsi hakkında, özellikle spermatozoa sayısı sınırlı ise bilgilendirilmelidir.

TESE-ICSI SONRASI ELDE EDİLEN HAMİLELİKLER VE ÇOCUKLAR

Ciddi testiküler yetmezlikli hastalarda gözlemlenen düşük fertilizasyon ve hamilelik oranları için mümkün olan bir açıklama immatür gametlerin kullanımı olabilir. Sonuç olarak, özellikle NOA'de TESE-ICSI sonrası çocuk doğumunda muhtemel yan etkilere ilişkin kaygılar vardır. NOA'li erkeğin spermatozoasının daha yüksek kromozomal anöploidi oranları gösterdiği bilinmektedir[101-104]. Dahası hem NOA hem de OA'dan elde edilen embriyolarda anöploidi sıklığı çok yüksektir, sırasıyla %53 ve %60[105] . Genomik baskının da inkomplet veya eksik olabileceği varsayıl-maktadır[106]. Sonuç olarak, NOA'li erkeklerden alınan testiküler spermatozoa kullanımı Hollanda'da yasaklanmıştır.

Şimdiye kadar testiküler sperm kullanılan ICSI sonrası çocuk doğumunun obstetrik ve neonatal sonuçlarına ve testiküler sperm ile elde edilen ICSI hamileliklerinin OA ve NOA arasında farklı olmadığının kayıtlarına az sayıda yayın odaklanmıştır. Biz bu yüzden klinik ve histolojik olarak tanımlanmış NOA'li erkeklerden alınan testiküler spermin kullanıldığı ICSI sonrası 61 çocuk doğumuyla ilgili 70 hamilelik ve neonatal bilginin sonuçlarını inceledik[107]. Sonuçlar OA'li erkeklerde TESE sonrası 204 hamilelik ve 196

çocuk doğumu sonuçları ile kıyaslandı. İki grup arasında hamilelik sonuçları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. İki grup arasında çocuk doğum ağırlığı veya erken perinatal mortalite oranlarına ilişkin bir farklılık gözlenmedi. NOA'li erkeklerin testiküler spermleri ile elde edilmiş canlı doğan çocukların %4'ünde major malformasyon varken, bu oran OA'li erkeklerin çocuklarında %3 idi.

Bu oranlar ejaküle sperm kullanılan ICSI çocuklarında gözlemlenen oranlarla kıyaslanabilir. Bu daha sonradan aynı metodoloji ve tanımlamaları kullanan ve major malformasyon oranlarının %3.4 olarak bulunduğu bir çalışmadır[108]. Diğer grupların ikisi de testiküler sperm kullanılması sonrasında artmış malformasyon oranlarından bahsetmemektedir[79,109.110]. Bu çalışmalarda, bunun yanında, testiküler sperm alt grupları küçüktü ve malesef obstrüktif ve non-obstrüktif azospermi arasında bir ayrım yapılmamaktaydı. Sadece Palermo ve ark.'nın[79] raporunda aynı zamanda bu ayırım yapılmakla beraber bunun azospermi tipinin kategorize edilmesinde önemli önkoşul olan histopatolojiye dayandırılıp dayandırılmadığı açık değildir[111]. Şimdiye kadar, bu sınırlı bilgiden, hamilelik ve çocuk sonuçları anlamında neticelerin oldukça güven verici olduğu sonucunu çıkarabiliriz. Bununla birlikte, yayınlanmış çalışmalar ancak az hasta sayısı içerdiği için ileri çalışmalar mutlaka önerilmektedir.

TESTİKÜLER SPERM EKSTRAKSİYONUNUN YAN ETKİLERİ

Spermatogenezis yaklaşık 74 gün süren bir olaydır, ve toksik etkilere, ısıdaki minör değişikliklere yüksek oranda duyarlıdır. Testiküler cerrahiyi takiben testisteki inflamatuar değişikliklerin böylece yan etkisi olabilir. Schlegel ve Su'ya göre[40], testiküler biopsi geçirmiş hastaların %82'si skrotal ultrasonda, TESE sonrası 3 ay süre geçse bile inatçı hematom ve/veya inflamasyon gibi intratestiküler anormallik göstermektedir. Bu ultrason anormalliklerinin çoğunluğu TESE sonrası altı ay içinde çizgisel skar veya kalsifikasyon bırakarak düzelir [40-42]. Çok sayıda, kör yapılan testiküler iğne aspirasyonlarının testiküler damarların ortaya konarak yapıldığı açık biyopsilerden daha az risk taşıdığıyla ilgili az kanıt vardır. Mikrocerrahi sperm alma yöntemlerinin kullanımı, testise elde olmayan vasküler yaralanma riskini en aza indirebilir[57,112]. Ancak bunun incelenmesi gerekmektedir.

Diğer bir kaygı da testis biyopsisi sonrası antijenik stimülasyon oluşmasıdır. Hjort ve ark.[113] serumlarının incelenmesinden 10 gün ila 5 hafta öncesinde testiküler biyopsi uygulanmış hastaların %31'inde antisperm antikorlarının varlığını bulmuştur. Bununla birlikte Komori ve ark.[114], NOA hastalarında TESE öncesi ve bir yıl sonrasında antisperm antikorların var olduğunu, yeni antisperm antikor formasyonu meydana gelmediğini bulmuştur.

Bir araştırma, 15 hastada çok sayıda testiküler biyopsi sonrası serum testosteron konsantrasyonlarını değerlendirmiştir. Cerrahi sonrası altıncı ayın sonuna kadar testosteron değerlerinde anlamlı azalma gözlemlenmiştir. Testosterondaki düşüşün, bir yıllık takipte tamamen olmasa da geri dönüşümlü olduğu bulunmuştur[115]. Bununla birlikte diğer iki çalışmada testosteron seviyesindeki bu düşüş gösterilememiştir. Komori ve ark.[114] NOA hastalarında geleneksel çok sayıda TESE veya mikrodiseksiyon TESE öncesinde ve 1, 6, 12 ay sonrasında serum testosteron konsantrasyonlarını tahlil etmiştir. Her iki gruptaki tüm hastalarda serum total ve serbest testosteron konsantrasyonlarında anlamlı bir postoperatif azalma bulmamışlardır. Schill ve ark.'nın[42] bir çalışmasında bazal testosteronun işlem öncesi ve sonrası 18 aya kadar uzanan değerleri çalışılmıştır. Testiküler biyopsi öncesi ve sonrası testosteron değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulmamışlardır. Bu bilgiler testiküler biyopsilerin kan testosteron seviyeleri üzerine negatif etki yapmasının mümkün olmadığını ileri sürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Palermo G, et al. Pregnancies after mtracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17
2. Tournaye H, et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. FertilSteril 1994; 61: 1445
3. Craft I, Bennctt V, Nicholson N. Fertilizing ability of tesricular spermatozoa [Letter]. Lancet 1993; 342: 864
4. Schoysman R, et al. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. Lancet 1993; 342:1237
5. Devroey P, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1995; 10: 1457
6. Tournaye H, et al. Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1995; 10 (SuppI 1): 115
7. Silber S, et al. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. Fertil Steril 1996; 55: 110
8. Schlegel PN, et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia. Urology 1997; 49: 435
9. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999
10. World Health Organization. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. Results of a World Health Organization Multi-centre Study. Int J Androl 1987; 7 (Suppl): 1
11. Ron-El R, et al. Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1997; 12: 1222
12. Matsumiya K, et al. Clinical study of azoospermia. Int J Androl 1994; 17: 140
13. Jow WW, et al. Motile sperm in human testls biopsy specimens. J Androl 1993; 14: 194
14. Ramos L, et al. Assessment of DNA fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with obstructive azoospermia. Fertil Steril 2002; 77: 233
15. Tournaye H, et al. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. Hum Reprod 1999; 14:90
16. Heidenreich A, Altmann P, Engelmann UH. Micorsurgical vasovasostomy versus microsurgical epididymal sperm aspirarion/testicular extraction of sperm combined with intracytoplasmic sperm injection. A cost-benefit analysis. Eur Urol 2000; 37: 609
17. Tsirigotis M, et al. Cumulative experience of percutaneous epididymal sperm aspiration {PESA) with intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Gener 1996; 13: 315
18. Rosenlund B, et al. A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men witb azoospermia. Hum Reprod 1998; 13: 1266
19. Gorgy A. The efficacy of local anesthesia for percutaneous epididymal sperm aspiration and testicular sperm aspiration. Hum Reprod 1998; 13: 646
20. Girardi SK, Schlegel PN. Techniques for sperm recovery in assisted reproduction. Reprod Med Rev 1999; 7: 131
21. Lin YM, et al. Percutaneous epididymal sperm aspiration versus microsurgical epididymal sperm aspiration for irreparable obstructive azoospermia - experience with 100 cases. J Formos Med Assoc 2000; 99: 459
22. Tournaye H, ct al. Fine needle aspiration versus open biopsy for testicular sperm recovery: a controlled study in azoospermic patients with normal spermatogenesis. Hum Reprod 1998; 13: 901
23. Sheynkin YR, et al. Controlled comparison of percutaneous and microsurgical sperm retrieval in men with obstructive azoospermia. Hum Reprod 1998; 13: 3086
24. Tuuri T, et al. Testicular biopsy gun needle biopsy in collecting spermatozoa for intracytoplasmic injection, ctyopreservation and histology. Hum Reprod 1998;14:1274
25. Tournaye H, et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? Hum Reprod 1997; 12: 80
26. F.zeh UIO, et al. Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1999; 14: 1005
27. Chen CS, et al. Reconsideration of testicular biopsy and follicle-stimulating hormone measurement in the era of intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia? Hum Reprod 1996; 11: 2176
28. Mulhall JP, et al. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with non-obstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. Urol 1997; 49: 91
29. Seo JT, Ko Wf. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. Int J Androl 2001; 24: 306
30. Schulze W, Thorns F, Knuth UA. Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. Hum Reprod 1999; 14 (Suppl 1):82
31. Vernaeve V, et al. Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 2002; 17: 971

32. Brandell RA, 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
33- Amer M, et al. May-Grunwald-Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate: a simple predictive parameter for successful testicular sperm retrieval. Hum Reprod 2001; 16: 1427
34. Fenichel P, et al. Anti-Mullerian hormone as a seminal marker for spermatogcnesis in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1999; 14: 2020
35. Yamamoto Y, et al. Morphometric and cytogenetic characteristics of testicular germ cells and Sertoli cell secretory function in men with non-mosaic Klinefelter's syndrome. Hum Reprod 2002; 17: 886
36. Schrader M, et al. Telomerase activity and expression of telomerase subunits in the testicular tissue of infertile patients. Fertil Steril 2000; 73: 706
37. Wood S, et al. The ratio of second to fourth digit length in azoospermic males undergoing surgical sperm retrieval: predictive value for sperm retrieval and on subsequent fertilization and pregnancy rates in IVF/ICSI cycles. J Androl 2003; 24: 871
38. Vernaeve V, et al. Can biological or clinical parameters predict testicular sperm recovery in 47,XXY Klinefelter's patients? Hum Reprod 2004; 19: 1135
39. Vernaeve V, er al. Testicular sperm recovery and 1CSI in patients with non-obstructive azoospermia with a history of orchidopexia. Hum Reprod 2004; 19: 2307
40. Schlcgcl P, Su L. Physiological consequences of testicular sperm extraction. Hum Reprod 1997; 12: 1688
41. Ron-El R, et al. Serial sonography and colour flow doppler imaging following testicular and epididy-mal sperm extraction. Hum Reprod 1998; 13: 3390
42. Schill T, et al. Clinical and endocrine follow-up of patients after testicular sperm extraction. Fertil Steril 2003; 79: 281
43. Lewin A, er al. Delivery following intracytoplasmic injection of mature sperm cells recovered by testicular fine needle aspiration in a case of hyper-gonadotropic azoospermia due to maturation arrest. Hum Reprod 1996; 11:769
44. Lewin A, et al. Testicular fine needle aspiration: the alternative method for sperm retrieval in non- obstructive azoospermia. Hum Reprod 1999; 14: 1785
45. Fasouliotis SJ, et al. A high predictive value of the first testicular fine needle aspiration in patients with non-obstructive azoospermia for sperm recovery at the subsequent attempt:. Hum Reprod 2002; 17: 139
46. Westlander G, et al. Sperm retrieval, fertilization, and pregnancy outcome in repeated testicular sperm aspiration. J Assist Reprod Genet 2001; 18: 171
47. Friedler S, et al. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men. with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1997; 12: 1488
48. Ezeh UI, Moore HD, Cooke ID. A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1998; 13:3075
49. Tournaye H. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: which method is to be preferred? Hum Reprod 1999; 14: 71
50. Silber SJ, et al. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. Hum Reprod 1995; 10; 148
51. Silber SJ, et al. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. Hum Reprod 1997; 12: 2422
52. Gottschalk-Sabag S, et al. Is one testicular specimen sufficient for quantitative evaluation of spermatogenesis? Fertil Steril 1995; 64: 399
53. Amer M, et al. Testicular sperm extraction: impact of testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and optimal time for repetition. Hum Reprod 1999; 14: 3030
54. Hauser R, et al. Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia: is it necessary? Hum Reprod 1998; 13:3081
55. Schlegel E Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod 1999; 14: 131
56. Mulhall JP. The utility of optical loupe magnification for testis sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. J Androl 2005; 26: 178
57. Amer M, et al. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations. Hum Reprod2000; 15:653
58. Tsujimura A, et al. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. Hum Reprod 2002; 17: 2924
59. Friedler S, et al. Outcome of first and repeated testicular sperm extraction and ICSI in patients with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 2002; 17: 2356
60. Meniru GI, et al. Studies of percutaneous epididy-mal sperm aspiration (PESA) and intracytoplasm ic sperm injection. Hum Reptod Update 1998; 4: 57
61. Nagy 2, et al. Compatison of fertilization, embryo development and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculated, ftesh and frozen—thawed epididymal and testicular spermatozoa. Fertil Steril 1995; 63: 808
62. Nicopoullos JD, et al. Use of surgical sperm rettieval in azoospermic men: a meta-analysis. Fettil Steril 2004; 82: 691
63. Janzen N, et al. Use of electively cryopreserved microsurgically aspirated epididymal sperm with IVF

and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2000; 74: 696
64. Cayan S, et al. A comparison of ICSI outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples. Hum Reprod 2001; 16: 495
65. Griffiths M, et ai. Should ctyopreserved epididymal or testicular sperm be recovered from obstructive azoospermic men for ICSI? Br J Obstet: Gynaecol 2004; 111: 1289
66. Lin YH, et al. Intentional cryopreservation of epididymal spermatozoa from percutaneous aspiration for dissociated intracytoplasmic sperm injection cycles. Acta Obstet Gynecol Scand 2004; 83: 745
67. Haberrnann H, et al. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with ftesh or frozen-thawed testicular spermatozoa. Feral Steril 2000; *5:* 955
68. Gil-Salom M, et al. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Mol Cell Endocrinol 2000; 27: 15
69. De Croo I, et al. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 1893
70. Devroey P, et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1996; 11: 1015
71. Madgar I, et al. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm extracted from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. Fertil Steril 1998; 69: 1080
72. Su LM, et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. J Urol 1999; 161: 112
73. Mercan R, Urman B, Alatas C. Outcome of testicular sperm retrieval procedures in non-obstructive azoospermia: percutaneous aspiration versus open biopsy. Hum Reprod 2000; 15: 1548
74. Bukulmez O, et al. The origin of spermatozoa does not affect intracytoplasmic sperm injection outcome. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001; 94: 250
75. Sousa M, et al. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. Hum Reprod 2002; 17: 1800
76. Windt ML, et al. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in men with azoospermia. J Assist Reprod Genet 2002; 19: 53
77. Levine LA, Dimitriou RJ, Fakouri B. Testicular and epididymal percutaneous sperm aspiration in men with either obstructive or nonobstructive azoospermia. Urology 2003; 62: 328
78. Abouighar MA, et al. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperrn. Fertil Steril 1997; 68: 108
79. Palermo GD, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. Hum Reprod 1999; 14: 741
80. De Croo I, et al. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 2000; 15: 1383
81. Balaban B, et al. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. Hum Reprod 2001; 16: 125
82. Ghanem M, et al. Comparison of the outcome of intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia in the first cycle: a re- port of case series and meta-analysis. Int J Androl 2005; 28: 16
83. Ubaldi F, et al. Reproductive capacity of spermatozoa from men with testicular failure. Hum Reprod 1999; 14: 2796
84. Ghazzawi IM, e: al. Comparison of the fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13: 348
85- Kahraman S, et al. High implantation and pregnancy rates with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1996; 11: 673
86. Fahmy I, et al. Intracytoplasmic sperm injection using surgically tetrieved epididyma! and testicular spetmatozoa in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. Int J Androl 1997; 20: 37
87. Mansour RT, et al. Intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1997; 12: 1974
88. Monzo A, et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients: stressing the liaison between the urologist and reproductive medicine specialist. Urology 2001; 58: 69
89. Goker EN, et al. Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002; 104: 129
90. Pasqualotto FF, et al. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. J Urol 2002;167:1753
91. Schwarzer JU, et al. Male factors determining the outcome of intracytoplasmic sperm injection with epididymal and testicular spermatozoa. Androiogia 2003; 35: 220
92. Schwarzer JU, et al. Sperm retrieval procedures and intracytoplasmatic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. Urol Int 2003; 70: 119
93. Vernaeve V, et al. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men

with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. Fertil Steril 2003; 79: 529
94. Osmanagaoglu K, et al. Cumulative delivery rates after inttacytoplasmic sperm injection in women older than 37 years. Hum Reprod 2003; 17: 940
95. Friedler S, et al. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia: a comparative study. Fertil Steril 1997; 68: 892
96. Dates RD, et al. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1997; 12:734
97- Ben-Yosef D, et al. Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1999; 14: 1794
98. Gianaroli L, et al. Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular tissue as an alternative to repeated surgical openings in the treatment of azoospermic men. Hum Reprod 1999; 14: 1034
99. Kupker W, et al. Use of frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2000; 73: 453
100. Verheyen G, et al. Should diagnostic testicular sperm retrieval followed by cryopreservation for later ICSI be the procedure of choice for all patients with non-obstructive azoospermia? Hum Reprod 2004; 19:2822
101. Bernardini L, et al. Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculated, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. Hum Reprod 2000; 15:2165
102. Martin RH, et al. Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with nonobstructive azoospermia. Hum Reprod 2000; 15: 1121
103. Levron J, ct al. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in-vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2001; 76: 479
104. Mateizel I, et al. Fish analysis of chromosome X, Y and 18 abnormalities in testicular sperm from azoospermic patients. Hum Reprod 2002; 17: 2249
105. Platteau P, et al. Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 2004; 19: 1570
106. Tcsarik J, Mendoza C. Genomic imprinting abnormalities: a new potential risk of assisted reproduction. Mol Hum Reprod 1996; 2: 295
107. Vernaeve V, et al. Pregnancy outcome and neonatal data of children born after ICSI using testicular sperm in obstructive and non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 2003; 18: 2093
108. Bonduelle M, et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). Hum Reprod 2002; 17: 671
109. Wennerholm U-B, et al. Obstetric outcome of pregnancies following ICSI, classified according to sperm origin and quality. Hum Reprod 2000; 15: 1189
110. Ludwig M, Katalinic A. Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study. Reprod Biomed Online 2002; 5: 171
111. Tournaye H. Gamete source and manipulation. In Vayena E, Rowe P, Griffin D, eds. Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction: a WHO Report. Geneva: World Health Organization, 2002: 83
112. Okada, et al. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. J Urol 2002; 168: 1063
113. Hjort T, Husted S, Linnet-Jepsen P. The effect of testis biopsy on autosensitization against spermatozoal antigens. Clin Exp Immunol 1974; 18: 201
114. Komori K, et al. Serial follow-up study of serum testosterone and antisperm antibodies in patients with non-obstructive azoospermia after conventional or microdissection testicular sperm extraction. Int J Androl 2004; 27: 32
115. Manning M, Junemann KP, Alkcn P. Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospcrmic men. Lancet 1998; 352: 37

30

Sperm Tarafından Hyaluronik Asidin Bağlanması: Erkek Fertilitesinin Değerlendirilmesi ve İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu için Sperm Seçimi

Gabor Huszar, Atilla Jakab, Ciler Celik-Özenci, G Leyla Sati

Çeviri: *Halilibrahim Çam*[*]*, Mehmet Öder*[**]

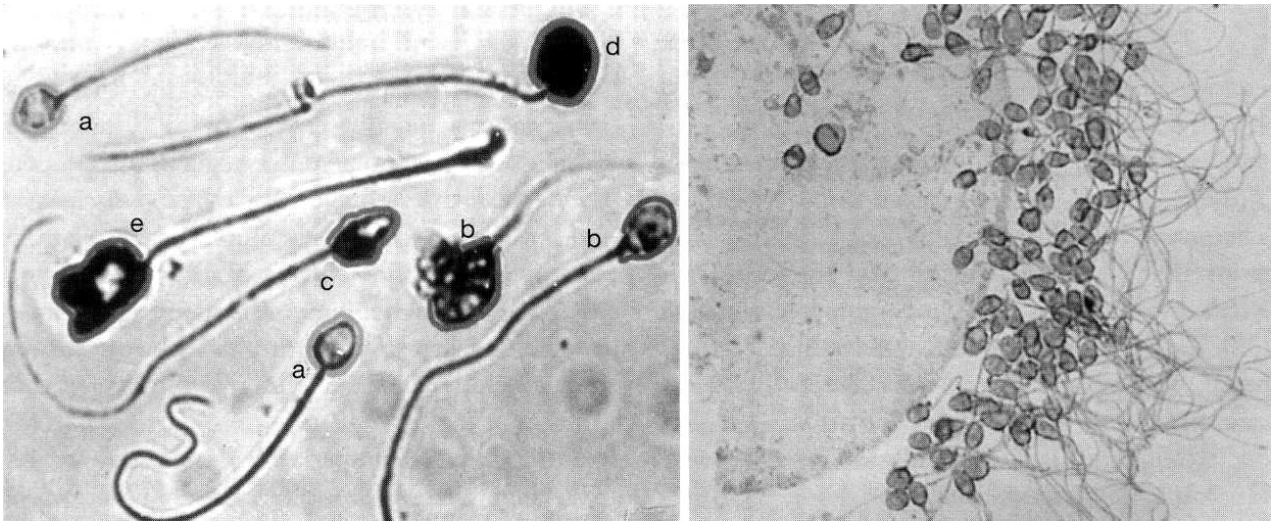
SİTOPLAZMİK RETANSİYON VE SPERMİN HÜCRESEL OLGUNLUĞUNU GÖSTEREN DİĞER BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER

Geleneksel semen kriterleri olan sperm konsantrasyonu ve motilitesinden bağımsız olarak erkek fertilitesini öngören insan sperm maturasyonu ve fonksiyonunu gösteren objektif biyokimyasal belirteçlerin geliştirilmesi laboratuarımızın öncelikli ilgi alanını oluşturmaktadır. Yaptığımız sperm kreatin-N-fosfotransferaz ya da kreatin kinaz (KK) ölçümlerinde, fertilitesi bozuk erkeklerde, sperm KK içeriğinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bulduk[1,2]. Sperm KK immun boyama paternleri göstermiştir ki (Figür 30.1a) yüksek sperm KK aktivitesi, direkt olarak spermatozoan içindeki sitoplazmik protein ve KK konsantrasyonunun azalması ile sonuçlanmaktadır[3]. Bu durum, fazlalık olan sitoplazmanın (matür sperm için gereksiz olan) normal olarak dışarı atılıp lümene bağlantılı bölgede 'residüel cisimcikler'[4] olarak kaldığı, spermiyogenesisin son fazında tespit ettiğimiz bir sperm gelişim defektini destekler.

KK-B isoformuna ek olarak, sitoplazmik retansiyonun yetersizliği ile karakterize, matür sperm oluşumu ile orantılı diğer bir adenozin trifosfat (ATP) içeren protein bulduk[5]. HspA2 olarak bilinen bu gelişimsel olarak regüle edilmiş proteini "70-kDa testis-expressed chaperone protein" olarak tanımladık[6].

Bundan başka fertilite, zona pellusidaya bağlı özellikler, morfolojik ve morfometrik nitelikler ve spermdeki KK ve HspA2 (% HspA2/(HspA2+KK-B)) konsantrasyonları ile de ifade edildiği gibi, HspA2 seviyeleri açısından matür ve matüritesi bozuk sperm arasında fark olduğunu gösterdik[7,8]. Bundan başka spermiyogenezde sitoplazmik ekstrüzyonun (atılmanın) ve HspA2 sentezinin eş zamanlı başladığını, bununla birlikte sperm plazma membranında da matürasyona bağlı remodeling olayının gerçekleştiğini belirledik. Bu remodeling basamağı, zona pellusida bağlanması ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için sperm seçimi ve androlojik değerlendirme açısından çok önemli olan hyalüronik asit bağlanması için matür spermdeki bölgelerin biçimlenmesini kolaylaştırır[9]. Sonuç olarak, KK aktivitesinin azalması ve HspA2 ekspresyonunun artması ile bağlantılı tüm sperm olgunlaşma olaylarının, sperm kaput epididime girene kadar tamamlanmış olduğunu ispatladık[10].

[*] Turhal Devlet Hastanesi- Üroloji Kliniği, Turhal- Tokat
[**] Manisa Devlet Hastanesi- Üroloji Kliniği, Manisa



Şekil 30.1: *Sol panel: Matür (a) ve sitoplazmik retansiyonlu ve azalmış matürasyonlu sperm (b-e) kreatin kinaz (KK) immun boyamadan sonra. Sağ panel: KK-immun boyalı sperm-hemizona kompleksi. Sadece sitoplazmik retansiyon olmayan clear-headed matür spermatozoanın bağlanabildiği gözlenmektedir. Ayrıca bakınız renkli resim 4 için sayfa xxvi.*

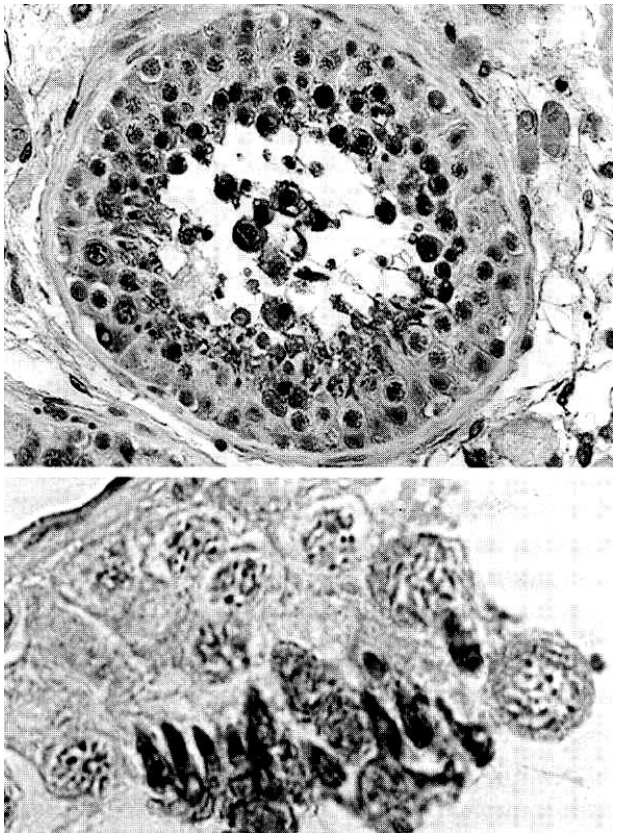
SPERM MATÜRASYONU VE FERTİLİTE

Erkek fertilitesinin değerlendirilmesinde sperm HspA2 seviyelerinin tahmini değeri, in vitro fertilizasyon (IVF) uygulanan çiftlerde yapılan çift kör çalışmalarla test edildi. İlk önce iki farklı IVF merkezinden 84 koca (semen parametreleri ve reprodüktif hikayeleri ile ilgili bilgi olmaksızın) fertilite grupları için, sadece sperm HspA2 oranları baz alınarak "yüksek olasılık" (>%10 HspA2 oranı) ve "düşük olasılık" (>%10 HspA2 oranı) olmak üzere iki grup halinde sınıflandırıldılar[8]. Tüm gebelikler "yüksek olasılık" grubunda gerçekleşirken "düşük olasılık" grubunda ise hiç gebelik yoktu. Yüksek olasılık" grubunda, eğer en az bir oosit bile fertilize olsaydı, gebelik için HspA2 oranının öngörü değeri çok yüksek (her bir siklus için %30.4) olurdu. HspA2 oranının ek olarak önemli bir yararı daha ortaya çıkmıştır: bu da "düşük olasılık" grubundaki bozuk fertiliteye sahip yirmi iki hastanın dokuzunun normospermik olmasıdır. Böylece HspA2 oranı, açıklanamayan erkek infertilitesinde (normal semenli infertil erkeklerde) ilk kez tanısal bir araç olarak kullanım imkanı sundu[7]. Yeni yapılan ikinci çalışmada Yale'de tedavi edilen 194 çifti, HspA2 oranlarını kullanarak yeniden değerlendirdik. The receiver operating characteristic (ROC) curve analizi, %100 öngörü değeri ile HspA2'nin %10.4 eşik değerinin altındaki değerlerde, gebeliğin oluşmasında yetersizlik olduğunu göstermiştir. 1992'deki çalışmaya benzer olarak, gebeliğin oluşmadığı ve HspA2 oranı %10'un altında olan on beş erkekten dokuzu normospermik idi[11].

Düşük HspA2 seviyeli kusurlu immatür spermde fertilizasyon işleminin basamaklarını tanımlamak için insan sperm-oosit bağlanmasını araştırdık. Sperm-hemizona kompleksleri ile ilgili bir çalışmada, sadece clear-headed (düşük KK) olgun spermin zonaya bağlanabildiğini gösterdik (Figure 30.1b)[7]. Kalan sitoplazmalı sperm, oosit bağlanma bölgesinde defektif idi; bu formasyon, sitoplazmik ekstrüzyonla eş zamanlı olarak yeniden biçimlenen plasma membranı ile oluşabilir[9].

Erkek infertilitesi açısından bakıldığında, gelişimsel olarak regüle edilen proteinlerden HSP70 ailesinin sentezi çok önemlidir ve sinaptonemal komplekslerin bir komponenti olarak mayotik profaz esnasında ortaya çıkarlar[12]. Farelerde HSP70-2'nin aşikar bir fonksiyonu, sinaptonemal kompleksin korunması ve spermatosit gelişimi ile mayoz bölünme sırasında kromozom cross-over olayına yardımcı olmaktır. Bu doğrultuda hsp70-2 genine yapılan hedeflenmiş harabiyet, sperm matürasyon arrestine ve azospermiye yol açar[13]. Tüm bu olaylar, spermatositlerdeki mayotik rekombinasyon bozukluğuna, mayotik hücre siklusunu düzenleyen sistemin harabiyetine, belkide spermatositlerde, hatta spermatidlerde yada ejakule immatür spermde apoptotik mekanizmanın tetiklenmesine bağlı olabilir. İnsan spermi ile ilgili olarak insan testis ve sperminde HspA2 proteinin ekspresyon paternini ve

HspA2'nin ekspresyon seviyesi ile sperm fonksiyonu arasındaki ilişkiyi ilk kez laboratuarımız göstermiştir[6]. Şekil 30.2'de HspA2 ekspresyonu, önce mayoz bölünmedeki spermatositlerde ve daha sonra uzamış spermatidlerin terminal spermiyogenez aşamasında açık olarak gösterilmiştir.



Şekil 30.2: *HspA2 antiserum ile immun boyalı insan testis biyopsi dokuları. Kesitler, küçük (üst panel) ve büyük (alt panel) büyütmede tubular yapının illustrasyonu ve lümene yakın bölgenin boyanma paterni. HspA2 ekspresyonu mayotik spermatositlerde başlar, ama uzamış spermatidlerin ve spermatozoanın terminal spermiyogenezi esnasında en baskın halini alır. Ayrıca bakınız renkli resim 5 için sayfa xxvii.*

Genellikle chaperone proteinleri, proteinlerin hücre içi taşınmalarını ve organizasyonunu kolaylaştırır. İnsan sperm plazma membranının remodeling olayının ve sitoplazmik ekstrüzyonun oluşmasında majör sperm protein hareketleri etkilidir ve aslında HspA2 ekspresyonunun ikinci aşaması bu protein hareketleri ile eşzamanlıdır. Sitoplazma retansiyonunun ve immatür spermdeki zona bağlanma bölgesindeki yetersizliğin, HspA2 ekspresyonunun azalması ve yine mayoz esnasında ve takiben DNA onarım enzimlerinin teminindeki bozukluk nedeniyle DNA bütünlüğünün bozulması ile muhtemelen ilişkili olduğuna inanıyoruz[2-6].

AZALMIŞ SPERM MATÜRASYONUNA AİT GENETİK BAKIŞ AÇILARI

HspA2'nin kemirgenlerde olduğu gibi insanda da sinaptonemal komplekslerin bir komponenti olduğunu farzederek kromozomal anöploidilerin matür sperme göre immatürlerde daha fazla olacağına dair bir hipotez oluşturduk[14]. On oligospermik erkeğin ejakulatına ait semenden ve %80 Percoll pelletlerinden (matür spermden geliştirilen) elde edilen sperm üzerinde bu soruyu inceledik. Spermiyojenik arrest gösteren fazla sitoplazma yükü olan immatür sperm immunohistokimya ile tanımlandı. X,Y ve 17. kromozom için sentromerik problar kullanarak 20 fraksiyonun her birinden (toplam 142 086 sperm) yaklaşık 7000 sperm çekirdeğini, floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile değerlendirdik. İmmatür sperm oranı (sitoplazmik retansiyon ile tespit edilen) iki grupta %45.4±3.4 ve %26.6±2.2 idi (median %48.2 ve %25, $p<0.001$; toplam 6000 sperm içinde her bir fraksiyonda incelenen sperm n:300). Ayrıca semen sperm fraksiyonlarında ve %80 Percoll'de test edilen kromozomlar karşılaştırıldığında %80 Percoll'de, toplam disomi, toplam diploidi ve toplam anöploidi sıklıklarında eşlik eden bir azalma mevcuttu (sırasıyla 0.17 vs. %0.54, 0.14 vs %0.26 ve 0.31 vs. %0.81; $p<0.001$ tüm karşılaştırmalarda). Anöploidilerde ortalama düşüş 2.7 kat idi. Hipotezimize göre amöplidiler, sperm immatüritesi ile bağlantılıdır, disomiler ile sitoplazmik retansiyonlu immatür sperm arasında yakın bir ilişki vardır ($r=0.7$ tüm kromozomlar ile, ve $r=0.76$ Y disomi vakalarında; $p<0.001$ her ikisinde), buda gösteriyorki disomiler öncelikle immatür spermlerden orijin almaktadır. Böylece sperm immatüritesi ve anöploidilerin altında yatan ortak faktörün HspA2 ekspresyonundaki azalma olduğu görüşünün geçerli olduğu açıklık kazanmıştır[14]. Ancak diploidilerle herhangi bir ilişki bulunmamaktadır ($r<0.1$). Buradan hareketle kromozomal diploidinin muhtemelen farklı hücresel mekanizmalardan kaynaklandığı konusunda Egozcue ve ark. ile görüş birliğimiz bulunmaktadır[15].

SPERM BAŞININ ŞEKLİ VE SPERM MATÜRİTESİ

Anormal sperm morfolojisi ve koromozomal bozukluklar arasındaki ilişki uzun zamandır ilgilenilen bir konudur[16,17]. Bu ilişkiyi destekleyen bilgiler olsa da, bizim son çalışmamızdan önce yapılan çalışmalara göre bu ilişki, semen örneklerindeki anormal yada anöploid sperm sıklığı temeline dayanmaktadır, fakat her iki özelliğin aynı sperm üzerinde araştırıldığı bir çalışma yoktur. Sperm şekli ile sayısal kromozomal anöploidiler arasında direk ilişki ile ilgili çalışmanın yapılması mümkündür çünkü FISH uygulaması için öncelikle gerekli olan dekondenzasyon ve denatürasyon basamaklarına maruz kaldıktan sonra, spermin şeklini koruduğunu belirledik[18].

Müteakip projede, sayısal kromozomal bozukluklarla sperm şekli arasındaki potansiyel ilişkinin yanı sıra ICSI için sperm seçiminde bazı bilgilerin kullanılabilirliğinide araştırdık[19]. Bu amacın başarıya ulaşması için, seçilmiş sperm popülasyonunda FISH uygulamasından sonra spermin haploid, disomik ya da diploid olup olmadığı ve yine aynı spermatozoanın şekil ve boyutlarının faz-kontrast mikroskop imajları ile uygunluğunun değerlendirildiği bir çalışma gerçekleştirdik (seçilmiş sperm popülasyonu, fizyolojik olarak meydana gelenden çok daha yüksek oranda disomik ve diploid spermatozoa içeriyordu).

Önce objektif şekil ölçümlerini kullanarak, 15 erkekten alınan 1286 spermi X,Y,10, 11 ve 17. kromozom için sentromerik FISH probları kullanarak değerlendirdik: 900 haploid, 256 disomik ve 130 diploid sperm saptadık. Üç renkli FISH (17,X ve Y) ile 10 ve 11. kromozomlar için iki renkli FISH kullanarak sperm imajlarında normal, disomik ve diploid genotipleri inceledik (her erkekten 60 sperm; 30 spermde X,Y, 17. kromozom, ve 30 spermde 10, 11. kromozom).

Başka bir uygulamada 900 adet anöploid spermi sıraladık ve "küçük başlı", "orta başlı" ve "büyük başlı" olmak üzere üç grup halinde sınıflandırdık. Ayrıca, baş boyut oranları anöploid olmayan sperme uygun olacak şekilde 256 anöploid ve 130 diploid spermi sıraladık ve baş boyutlarına göre ayrılan bu üç grup içinde disomilerin ve diploidilerin sıklığını belirledik.

Anöploidiler ve diploidiler her üç grup içinde de mevcuttur. Baş boyutunun sitoplazmik retansiyonu ve immatüriteyi yansıttığı gibi kromozomal bozuklukların sıklığı ile sperm baş boyutları arasında pozitif bir ilişki olduğu göze çarpmaktadır. Kromozomal anöploidilerin sıklığı diğer sperm başı parametreleri ile de ilişkilidir; başın yüzölçümü, baş çevresi ve uzun ve kısa ekseni, ilgili çalışmanında gösterdiği gibi bu dört sperm başı parametresinden herhangi biri sperm şekli ile disomiler yada diploidiler arasındaki ilişki ile bağlantılıdır. Küçük, orta ve büyük başlı spermlerde disomilerin ortalama yüzdeleri sırasıyla %27±2, 23±1% ve %50±2'dir. Buna ek olarak diploidilerin ortalama yüzdesi ise sırasıyla %3±1, %8±1 ve %89±2'dir.

En normal sperm kategorisi olarak, 900 adet anöploid olmayan spermin en az üçte birine, disomik ya da diploid olan kaç sperm girer? gibi bir soru sorduğumuzda, herhangi bir baş boyutunda ya da şekilde olan sperm, kromozomal bozukluklara sahip olabilir cevabını buluruz. Dahası dört temel morfometrik parametreden birini ya da tümünü göz önüne aldığımızda, bu analiz için seçilen 386 sperm içinde disomisi olan spermlerin %27'si ve diploidisi olan spermlerin %3'ü, çalışma popülasyonunun en normal olan üçte birlik grubu içindeki 300 spermin arasında yer alıyordu.

Başka bir analizde aynı 1286 spermi şekil karakteristiklerine göre normal (n=367), orta (n=368), anormal (n=504) ve şekilsiz (n=47) olarak sınıflandırdık. Disomik ve diploid sperm bu dört grubun hepsinde de artan sıklıkla (sırasıyla %18, 185, %41 ve %98) mevcuttu ve sperm şekil bozukluğunun artışı, "anormal" ve "şekilsiz" gruplarında daha açık bir şekilde göze çarpıyordu[19].

Son olarak, 1286 spermatozoayı Kruger mutlak morfoloji metoduna göre normal ve anormal olarak sınıfladık. Normal mutlak morfoloji skorları haploid (n=900), disomik (n=256) ve diploid (n=130) spermde sırasıyla %24, 10% ve %1 idi. Bu değerler morfometrik sonuçlarla da uyum içindedir ve haploid, disomik ve diploid spermlerin sadece genetik yada morfometrik bakış açısından değil, morfoloji açısından da birbirinden farklı olduğunu göstermektedir. Yine biyokimyasal marker yöntemi temeline dayanarak objektif morfometri ile mutlak morfolojiyi karşılaştırmak amacıyla, Kruger metodunu kullanarak sperm şekil sınıflamamızı değerlendirdik. Gayet uyumlu bir biçimde simetrik, asimetrik, düzensiz ve şekilsiz grupta sırasıyla %26, %3, %1 ve %0 oranında Kruger normal skorlar tespit ettik. Ancak şurası da açıktır ki normal grup içinde anöploid spermde vardır, mutlak morfoloji

değerlendirmesi, haploid spermatozoanın belirlenmesi için bir ayrım sağlamaz.

Tüm üç şekil- bazlı yaklaşımları kullanarak elde ettiğimiz sonuçlar, anormal sperm şekli ile disomiler/diploidiler arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Küçük baş boyutundan büyük baş boyutuna, normalden şekilsize ve Kruger normalden anormale her bir morfolojik kategori içinde disomi ve diploidi kombine oranları artmaktadır. Bu durum sperm matürasyonundaki düşüşün yönünü yansıtmaktadır. Bundan başka, şekilsiz sınıf haricinde diğer tüm sınıflar (normal, orta ve hatta anormal) aynı disomi sıklığını göstermektedir. Bu nedenle şekil değerlendirmesinin, anöploid olmayan sperm seçimi için güvenilir bir metod olmadığı bu bilgilerle ek olarak doğrulanmıştır.

Şu sonuca varabiliriz: (1) spermatozoada kromozomal anöploidilerin sıklığı ile sperm şekil anomalileri arasında tam bir ilişki vardır; bu ilişki, spermiyogenezin geç safhasında sitoplazma ekstrüzyonunu ve mayotik olayları etkileyen azalmış matürasyonun yaygın upstream (karşı akım) olayları temeline dayanmaktadır; (2) her bir spermatozoanın şekil karakteristikleri, ploidi için bir öngörü oluşturmaz; ve (3) bu nedenle, şekil değerlendirmesi, örneğin 'en iyi görünen' spermi seçmek, normal spermatozoanın ICSI seçimi için güvenilir olmayan bir yöntemdir.

HYALURONİK ASİT BAĞLANMASI İLE SPERM MATÜRASYON DEĞERLENDİRMESİ

Sperm matürasyon çalışmaları ile birlikte aynı zamanda disakkaritlerin linear repeating polimeri olan hyaluronik asit (HA) ya da hyaluronan'ın insan sperm fonksiyonları üzerine olan etkilerini araştırdık. Ortamdaki HA, hem dondurularak-çözülmüş hem de taze ejekülattaki insan spermatozoasının vektörel hızını (velocity), motilite retansiyonunu ve canlılığını (viability) artırır[20,21]. Sperm motilitesinde ve velositesindeki artış HA'e direkt bir cevap olarak oluşur, bu, iki şekilde gözlenir: (1) HA salınımının üzerine sperm velositesinde ve sperm kuyruğunun çapraz vuruş sıklığında ani bir artış olur; (2) HA'ya maruz kalmış spermi dansite-gradient santrifüj sonrası, regüler mediuma transfer ettiğimizde, motilite and velositi özellikler, kontrol spermlerininkilere döner. HA'in sperm üzerindeki etkilerinin reseptör aracılı olduğu sonucuna vardık. Aslında insan sperminde HA reseptör varlığı, üç laboratuar tarafından belirlenmiştir[22-24].

Sperm matürasyonunun çeşitli karşı akım özellikleri ile plazma membranındaki HA reseptörlerinin varlığı arasındaki ilişkiyi tanıyarak, ICSI işleminde kullanılacak matür spermi seçmek için, klinik androloji testi olarak kullanılabilecek sperm HA bağlanma analizini geliştirmekle uğraşmaktayız[25]. Bizim hipotezimize göre (1) matür sperm katı haldeki HA'e seçici olarak bağlanabilir; bu varsayım çalışmalarla yakın zamanda, çeşitli sitoplazmik ve nükleer biyokimyasal belirteçler kullanılarak ispatlanmıştır: HA bağlı sperm, devam eden apoptotik sürecin göstergeleri olan kaspaz-3 ve sitoplazmik retansiyondan yoksundur[26]; (2) azalmış matürasyonlu spermatozoa, düşük HspA2 oranlarına sahiptir, kromozomal bozukluklarda ve spermatogenetik membran remodeling yetersizliğinde katı haldeki HA'e bağlanma gerçekleşmez ve böylece HA bağı, kromozomal anöploidi seviyeleri düşük olan matür sperm seçimini kolaylaştırmış olur.

Erkeklerde sperm matürasyonu üzerine halihazırdaki düşüncelerimiz Şekil 30.3'te özetlenmiştir. İmmatür spermde zona bağlantısındaki azalmanın altında yatan mekanizmanın aranması için spermiyogenezde belirlediğimiz noktalar şunlardır: HspA2 sentezinin başlaması ile sitoplazmik ekstrüzyon eşzamanlıdır, sperm plazma mebranıda, zona ve HA bağlanma bölgelerinin biçimlenmesine önayak olan remodeling ile ilişkili matürasyona uğrar. Böylece sitoplazmik retansiyonlu immatür spermde, düşük yoğunluklarda zona bağlanma bölgeleri ve HA reseptörleri bulunur[6,7,20,25].

Şekil 30.3'teki kavramların temelinde üç konuyu araştırdık:

- *HA reseptör aracılığıyla olsun yada olmasın, sperm katı haldeki hyaluronik asite kalıcı olarak bağlanabilir.*

Aslında sperm HA'e bağlanır. Üç sperm popülasyonu vardır: (1) HA'e kalıcı olarak bağlanan sperm; (2) bağlanma göstermeyen sperm; (3) başlangıçta HA'e bağlanan hemen sonra tekrar ayrılan ve sonra yine bağlanan sperm ki bu grup spermin küçük bir bölümünü oluşturur (<%5). Biz bu üç paterni, yüksek dansiteli HA reseptörleri olan matür sperm, bozuk matürasyonlu ve plasma membran remodeling bulunan immatür sperm ve orta derecede matürasyonlu düşük dansiteli HA reseptörü olan sperm olarak yorumladık.

- *HA bağlı sperm oranının ne kadar olduğunu değerlendirmek için HA ile kaplanmış kamaralı alet içinde HA bağlı spermlerin tanısal yararlılığı test edildi (Şekil 30.4).* Şu da dikkate değer ki, HA bağlanma analizi, androloji testi için Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından onaylanmıştır.

Biz, sperm HA bağlanmasının tanısal yararının olduğunu bulduk. 56 erkekte HA kaplı lamlarda spermin bağlanma yüzdesini değerlendirdik. Bağlanmaya göre, sperm popülasyonlarını şu şekilde sınıfladık: <%85 (n=32) mükemmel bağlanma: bu erkekler müdahale gerektirmez; bağlanma oranı %65 ile %85 arası (n=14), orta seviye: bu çiftler intrauterin inseminasyondan fayda görebilir (IUI); azalmış sperm bağlanma oranları %60-65 (n=10): bu gruptaki erkekler yeniden test edilmeli ve eğer yine düşük bağlanma skoru teyid edilirse IVF yada ICSI ile tedavi edilmelidirler. Önceki bulgularımızla uyumlu olarak, bağlanma skorları çoğunlukla sperm konsantrasyonundan bağımsızdır. Sperm sayısı 20 milyon/ml'den düşük konsantrasyon aralığında olan erkekler arasında (56 erkek içinde n=18), üç adet mükemmel, yedi adet orta seviyede ve sekiz adet azalmış HA bağlanma paterni gösteren erkek tespit ettik.

ICSI İÇİN DÜŞÜK ANÖPLOİDİ SIKLIĞI GÖSTEREN SPERMİN SEÇİMİ

Üçüncü konu:

- *Mayotik süreç ile sperm matüritesi arasındaki ilişki nedeniyle olsun yada olmasın, düşük seviyelerde kromozomal bozukluklar gösteren sperm HA'e tercihli olarak bağlanır*, konusu deneylerle aşağıda açıklanmıştır.

Kavramlar doğrultusunda Şekil 30.3'te sunulan, HA bağlanma işlemi kullanılarak yapılan yeni sperm seçme yönteminin gelişimi, spermatogenez esnasında zona pellusida bağlanma ve HA bağlanma bölgelerinin biçimlenmesinin ortak olarak düzenlediğinin tanımlanması temeline dayanır. Gerçekten-de, kısımlara ayrılmış insan oositlerinin zonası yada HA'e yönelik sperm bağlanma skorları arasında yakın ilişki olduğunu bulduk ($r=0.73$, $p<0.001$; $n=54$)[27]. Buradan hareketle, konvansiyonel fertilizasyonda, HA ile seçilen spermlerde görülen kromozomal bozuklukların sıklığı, zona pellusida ile seçilen spermlerdeki sıklıkla karşılaştırılabilir. Bu ilişki, HspA2 kaperonun oynadığı iki farklı role dayanır ki bunlar: sinaptonemal komplekslerin bir komponenti olarak mayozisi desteklemek ve spermiyogenez sırasında zona pellusida ve hyaluronik asit (HA) bağlanma bölgelerinin biçimlenmesi ile plazma membran remodeling olayını kolaylaştırmaktır[6].

Kromozomal bozuklukların artan oranları ve ICSI için immatür sperm kullanımının diğer potansiyel sonuçları başlıca endişeleri oluşturmaktadır. Sperm matürasyonu ile plasma membran remodeling arasındaki ilişkiye dayanarak formüle ettiğimiz hipoteze göre, immatür spermde olmayıp matür spermde bulunan HA reseptör varlığı ve HA ile kaplanmış yüzeyi bulunan araçlar, ICSI için kromozomal anöploidi sıklığı düşük ve DNA bütünlüğü yüksek olan, tek, matür spermin seçimini kolaylaştıracaktır. HA ile seçilen matür sperm, ek olarak daha düşük seviyelerde mayotik hatalar içerir. Sitoplazmik retansiyonun olmaması, kalıcı histonların varlığı, apoptotik süreç ve DNA fragmantasyonu şeklinde sayılabilecek bu faktörler, zigota spermin yapacağı paternal katkıyı olumsuz yönde etkileyebilir[9,14,25,28-30]. Seks kromozom disomilerinde beş kat azalma, görsel olarak seçilmiş sperm ile planlanan ICSI çocuklarındaki kromozomal bozuklukların artışı ile tutarlıdır. HA'in çoğunlukla kadın üreme traktının bir komponenti olarak ortaya çıkmasından beri bu durumun ahlaki bir endişe olmaması gerekir[31-34].

Bu deneylerde, patentli kaplama teknolojisi kullanılarak hazırlanmış immobilize bakteriyel hyaluronik asit spotları içeren Falcon Petri kaplarından oluşan sperm seçim platformları kullandık (Biocat Inc., Fort Washington, PA). Sperm-hyaluronik asit bağı analiz slaytları, bilaminar hyaluronan kaplama ile işlem görmüş tek kullanımlık cam sperm sayım odalarından oluşan Cell-VU® temeline dayanmaktadır. Kaplama, baz katta hyaluronan kaplı, polifonksiyonel izosiyonat ile çapraz bağ içermektedir. Toplam kaplama derinliği ise bir mikrometreden daha düşüktür.

Kromozomal anöploidiler ve diploidiler bulunan spermin eliminasyonu ile sperm seçiminin etkinliğini test ettik[35]. 34 adet orta derecede oligospermik erkeğin yıkanmış spermleri test edildi. 15 dakikalık inkübasyondan sonra HA bağlı sperm, ICSI mikropipeti ile toplandı. HA ile seçilen ve seçilmeyen her iki sperm, X.Y ve 17. kromozomlar için sentromerik prob kullanılarak yapılan FISH uygulamasına maruz bırakıldı. Kontrol sperm popülasyonu seçilmemiş spermlerden oluşmaktaydı.

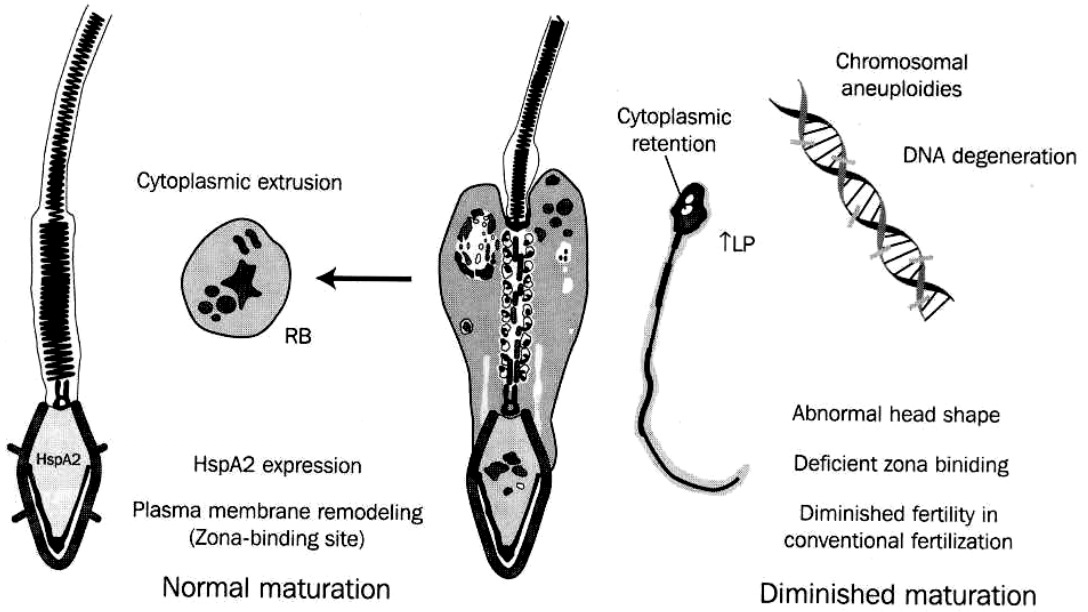
Seçilmemiş sperm süspansiyonunun başlangıçtaki temsili miktarı ile HA bağlı sperm FISH sonrası incelendi. Veriler x^2 testi ile analiz edildi.

1.ve 2. deneyde yıkanmış spermler, insan tubal sıvısının %0.5 BSA (HTF; Irvine Scientific Co., Irvine, CA) 3-5 hacmi ile semen dilüe edilerek hazırlandı. Dilüe semen, oda sıcaklığında 15 dakika 1200 g ile santrifüje edildi. Sperm pelleti, yaklaşık 30 milyon sperm/ml için 0.5 ml HTF içinde yeniden askıya alındı. İkinci deneyde sperm süspansiyonu, yine aralıklı olarak %45/%90 ISolate® gradyanında santrifüje edildi.

İmmobilize HA spotu içeren Falcon Petri kaplarının kullanımı ile, sperm süspansiyonundan bir damla, HA spotunun kenarına yakın bölgeye yerleştirilir ve sperm kendiliğinden migrasyona bırakıldı. Plazma membran remodelingi tamamlanmış matür sperm HA'e bağlanırken, HA reseptör konsantrasyonları azalmış olan immatür sperm HA'in tersine serbest olarak hareket etti (Şekil 30.4). HA'e bağlanmış olan sperm, kuyruğunun çapraz vuruş sıklığındaki artışla birlikte coşkulu bir çırpınma hareketi sergiledi[20,21]. 15 dakika sonra (maksimum bağlanma periyodunun iki katı)[25] bağlanmış olan spermler ICSI mikropipeti ile toplandı, metanol-asetik asit ile fikse edildikten sonra FISH ile muamele edildi. Seçim deneylerinin kontrolü için her zaman seçilmemiş sperm süspansiyonuna göre yapıldı ve yine FISH ile muamele edildi (Şekil 30.5).

3. deneyde, sperm süspansiyonundan 5-10 µl damlalar, HA kaplı cam slaytların üzerine yerleştirildi. 5 dakikalık HA bağlanma periyodundan sonra slayt hafif açıyla yerleştirildi ve görülen serbest sperm kalmayana kadar HTF damlalarının yavaş yavaş uygulanıp geri alınmasıyla bağlanmayan spermler elimine edildi. HA bağlı sperm mikropipetle tek tek alındı ve HTF ile ıslatılmış hidrofobik alana yerleştirildi, fikse edildi ve FISH ile muamele edildi.

Herbir erkekten ortalama 4770 sperm içeren semen fraksiyonları olmak üzere 34 erkekten 162 210 sperm analiz ettik. İşlemin zorluğundan dolayı, HA bağlı ve mikropipetle toplanmış sperm fraksiyonları içinden çok az miktarda spermi inceledik. İlk deneyde 7530 sperm (her bir erkekten 224-1142 arası) ve ikinci deneyde 9720 sperm (her bir erkekten 373-1995 arası) değerlendirdik. Bireysel olarak seçilmiş



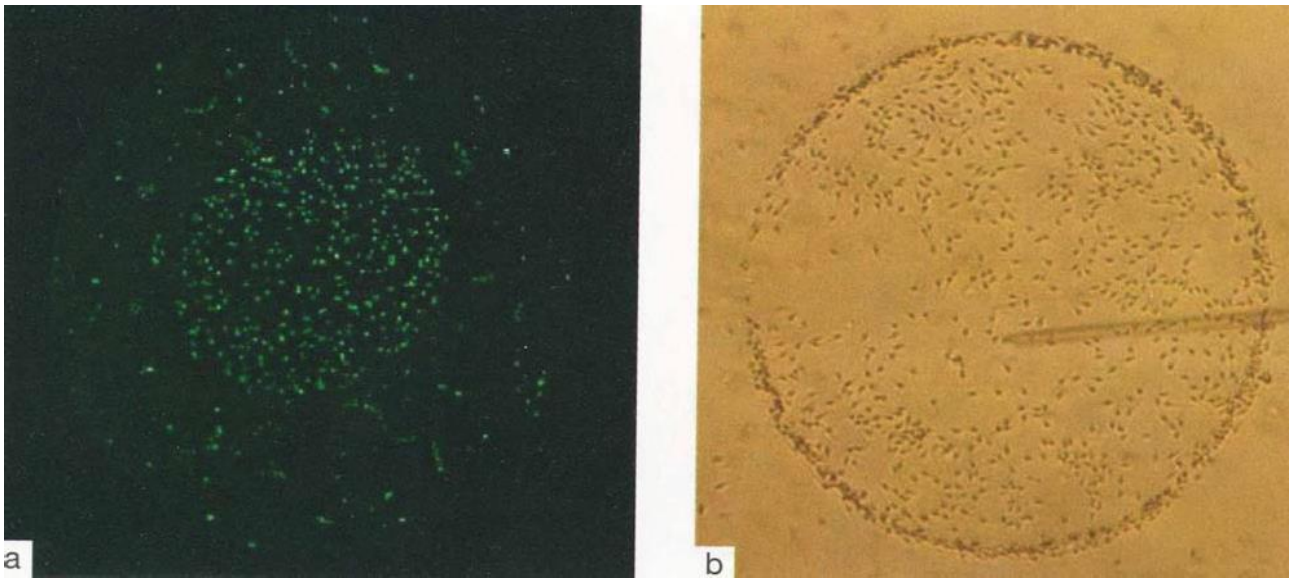
Şekil 30.3: *Normal ve azalmış matürsyonlu insan sperm modeli. Normal spermde, spermatositlerin sinaptonemal kompleksi içinde eksprese edilen HspA2 matürasyon mayozu destekler. HspA2 çoğunlukla spermiyogenesisin geç safhasında da yer alır, tıpkı sitoplazmik ekstrüzyon (rezidüel cisimciğin (RB) kaybı ile temsil edilmiştir), plazma membran remodeling ve zona pellusida ve hyaluronik asit bağlanma bölgelerinin biçimlenmesinde (membranın ve kalıntıların rengi maviden kırmızıya döner) olduğu gibi. HspA2 ekspresyonu eksikliği ile azalmış matürasyonlu sperm, mayotik defektlere ve yüksek oranda kreatin kinaz (KK) ve diğer sitoplazmik enzimlerin retansiyonuna, artan seviyelerde lipid peroksidasyonuna (LP) ve DNA fragmantasyonuna, anormal sperm morfolojisine ve zona ve hyaluronik asit bağlanma bölgelerinde bozukluğa sebep olur. Ayrıca bakınız renkli resim 6 için sayfa xxvii.*

sperme ait üçüncü deneyde 24 420 spermi (her bir erkekten 1086-3973 arası) değerlendirdik.

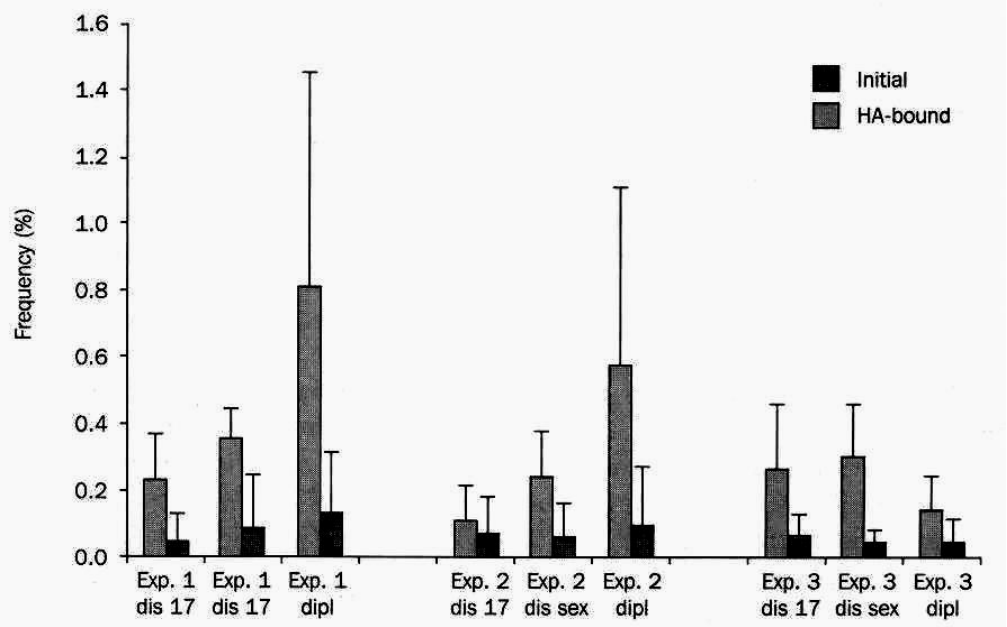
Üç probla yapılan çalışmalarda, seçilmemiş sperme (toplam 162 210, her erkekten 4770 sperm) karşı HA bağlanmış spermde (toplam 41 670, her erkekten 495-2079 sperm) kromozomal disomi sıklıkları %0.52'den %0.16'ya, diploidi %0.51'den %0.09'a ve seks-kromozom disomi %0.27'den %0.05'e geriledi (5.4 kat azalmaya karşı dört kat artış gösteren ICSI ürünü çocuklar).

Bizim HA-sperm seçme metodumuz, geleneksel evrim seviyesinde ICSI fertilizasyonunun genetik etkilerini azaltmaya imkan veren bir tekniktir. Bu noktada yalnızca fizyolojik fertilizasyon havuzunun bir parçası olan matür sperm sunulabilir. ICSI'nin olumsuz sonuçlarının yeniden gözden geçirilmesi ve elimizdeki veriler ışığında, ICSI sonuçlarını geliştirmek için HA aracılıklı sperm seçiminin beklenen avantajlarını tanımlamak ilgi çekicidir:

- HA bağlanması ile seçilmiş spermde, kromozomal disomilerin ve diploidilerin sıklığı, ön semenin anöploidi sıklığından bağımsız olarak normal seviyededir. Bu bakımdan, HA'in sperm seçim özellikleri, zona pellucida ile benzerdir.
- HA bağlanmasının avantajı ile seçilmiş matür spermler işlerliğe sahiptir ve sırasıyla anilin mavisi boyama ve aktif kaspaz 3'ün yokluğu ile kanıtlandığı üzere, kalıcı histonlardan ve apoptozisten yoksundur[25,26]. Böylece, HA ile seçilmiş spermdeki paternal katkı gelişecektir ve HA ile seçilmiş sperm kullanılarak yapılan ICSI sonrası çocuk düşüklerinin daha az oranda gerçekleşmesini bekleriz.
- "Comet analizi ve DNA-nick translasyonu" ile test edildiği gibi, HA ile seçilmiş matür sperm, DNA fragmantasyonu göstermez[30,36]. Bu, ICSI fertilizasyon sonrası kanser oranının artması ve bireysel gelişimin potansiyel bozulması ile ilgili şüpheleri azaltmalıdır.
- Spermin HA ile seçilmesi, toksik polivinilpirolidonun daha az açığa çıkmasına imkan verecektir.



Şekil 30.4: *Hyaluronik asit kaplı spotlar üzerindeki sperm hareket paternleri sperm seçiminde kullanıldı. Matür sperm bağlanırken azalmış matürasyonlu sperm hareketli kaldı. Siber yeşil DNA boyasının (Molecular Probes, Eugene, OR) kullanıldığıişlemde boyanın nüfuz ettiği sperm kullanılabilir olan spermdir. Ayrıca bakınız renkli resim 7 için sayfa xxviii.*



Şekil 30.5: *Üç deneydeki hyaluronik asit (HA) ile seçilmiş sperm fraksiyonları ve semen içinde disomi (dis) ve diploidi (dipl) sıklıkları.*

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından desteklenmiştir (HD-19505, HD-32902, OH-04061).

KAYNAKLAR

1. Huszar G, Corrales M, Vigue L. Correlation between sperm crearine phosphokinase activity and spetm concentrations in normospermic and oligospermic men. Gamete Res 1988; 19: 67
2. Cayli S, et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. Reprod Biomed Online 2003; 7: 462
3. Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. Mol Reprod Dev 1993; 34: 292
4. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am J Anat 1963; 112: 35
5. Huszar G, Vigue L. Spermatogenesis-rclated change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. Mol Reprod Dev 1990; 25: 258
6. Huszar G, et al. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. Biol Reprod 2000; 63: 925
7. Huszar G, Vigue L, Oehninger S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm—hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. Fertil Steril 1994; 61: 136
8. Huszar G, Vigue L, Morshedi M. .Spetm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. Fertil Steril 1992; 57: 882
9. Huszar G, et al. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship

among plasma membrane beta 1,4-galactosyl-transferasc, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. Biol Reprod 1997; 56: 1020
10. Huszar G, et al. Cytoplasmic extrusion and the switch from creatine kinase B to M isoform are completed by the commencement of epididymal transport in human and stallion spermatozoa. J Androl 1998; 19: 11
11. Ergur AR, et al. Sperm maturity and treatment choice of IVF or ICSI: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. Fertil Steril 2002; 77: 910
12. Alien JW, et al. HSP70-2 is part of the synaptonemal compiex in mouse and hamster spermatocytes. Chromosoma 1996; 104: 414
13. Dix DJ, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 3264
14. Kovanci E, et al. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. Hum Reprod 2001; 16: 1209
15. Egozcue S, et al. Diploid sperm and the origin of triploidy. Hum Reprod 2002; 17: 5
16. Bernardini L, et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. Hum Reprod 1998; 13: 3406
17. Templado C, et al. Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospetmia. Mol Reprod Dev 2002; 61:200
18. Celik-Ozenci C, et al. Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturadon for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. Biol Reprod 2003; 69: 1347
19. Celik-Ozenci C, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. Hum Reprod 2004; 19:2052
20. Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospetmic specimens. Fertil Steril 1990; 54: 1127
21. Sbracia M, et al. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/ thawed human spermatozoa. Hum Reprod 1997; 12: 1949
22. Kornovski BS, et al. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. Fertil Steril 1994; 61: 935
23. Ranganathan S, Ganguly AK, Datta K. Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in spetm function. Mol Reprod Dev 1994; 38: 69
24. Cherr GN, et al. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. Zygote 1999; 7: 211
25. Huszar G, et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. Fertil Steril 2003; 79 (Suppl 3): 1616
26. Cayli S, et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bclx expression in mature and diminished maturity spermatozoa. Mol Human Reprod 2004; 10: 365
27. Cayli S, et al. Hyaluronic acid binding is a test of human sperm maturity and function: correlation between the hyaluronic acid binding and hemizona binding tests. Presented at the 19th Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology, Madrid, Spain, 2003
28. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. Hum Reprod Update 2005; 11: 337
31. Simpson JL, Lamb DJ. Genetic effects of intracytoplasmic sperm injection. Semin Reprod Med 2001; 19: 239
32. Bonduelle M, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. Hum Reprod 2002; 17: 2600
33. Van Steirteghem A, et al. Follow-up of children born after ICSI. Hum Reprod Update 2002; 8:111
34. Bonduelle M, et al. A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. Hum Reprod 2005; 20: 413
29. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. Exp Cell Res 1999; 251: 350
35. Jakab A, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. Fcrti! Steril 2005; 84: 1665
36. Huszar GB, et al. Absence of DNA cleavage in mature human sperm selected by their surface membrane receptors. Presented at the 54th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, San Francisco, CA, 1998
30. Sari L, et al. Persistent histones in immature sperm are associated with DNA ftagmentation and affect paternal contribution of sperm: a study of aniline blue staining, fluorescence in situ hybridization and DNA nick translation. Presented at the 60th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Philadelphia, PA, 2004

31

Spermatozoanın İn Vitro Matürasyonu

Rosália Sá, Mário Sousa, Nieves Cremades, Cláudia Alves, Joaquina Silva, Alberto Barros

Çeviri: *Ali Furkan Batur*[*], *İlker Şen*[*]

İN VİTRO SPERMİYOGENEZİS: HAYVAN ÇALIŞMALARI

İn vitro ortamda memeli spermatogenezisini çalışmalarının yeni geliştirilen metotları, kültürel şartlarda ulaşılması güç olan doku özelliklerine bağlı problemlerle karşı karşıya kalmak durumundadır. Bu problemler spermatogenezisin çok güçlü bir şekilde hücresel ilişkilerin birleşimine bağlı olmasından, örneğin gen salgılanımının ve spesifik sinyal moleküllerinin oluşumunun boşluksal ve zamansal ilişkileri belirleyen belirli bir anatomik alanda yapılan ayarlamalara bağlı olması gibi, oluşmaktadır. Stabil olan peritübüler hücre, leydig hücre ve sertoli hücre gibi somatik hücre populasyonlarının ve spermatogoniya gibi mitotik bölünen kök (stem/progenitor germ cell) hücre ortamı sağlanabilir ve sürdürülebilirken; mayoz bölünme gösteren spermatositlerin ve spermatidler gibi farklılaşmış germ hücrelerine ulaşılması çok zordur. Bu yüzden günümüzde somatik hücre germ hücre kültürlerinin en önemli hedefi mantıklı bir süreç için (2-3hafta) az veya çok fonksiyonel epitelyumları yapay olarak canlı tutabilme ortamını yaratacak minimum şartları kurabilmektir.

Bu amaçlar sadece in vitro şartlarda spermatid bulunmayan vakalarda gamet üretebilmek için değil ayrıca semineferoz epitelyumun üzerindeki toksinlerin, hormonların ve sinyal moleküllerinin rollerinin mekanizmasına ulaşmak için daha kontrollü çalışma için gereklidir. Bu in vitro sistemler daha etkili kültür ortamının gelişimini sağlamaya izin verir ve germ hücrelerde evreye spesifik olarak gen salgılanımını ve sinyal yolaklarını çalışmayı sağlayan yüksek derecede saflaştırılmış hücre popülasyonlarının ayrımlaştırılmasını sağlayan benzersiz bir model oluşturmaya hizmet edebilir. Sonuç olarak bu sistemler hayvan deneylerini veya in vivo başlangıç klinik çalışmaların gerekliliğini ortadan kaldırabilecek olan gelişen gen tedavi stratejilerini oluşturmada alternatif bir araç olanağı sağlarlar. Bu, özellikle genetik bir nedene bağlı maturasyon durması gelişen hastalarda hasarın üstesinden gelebilecek in vitro ortamda üretilen gen transferini ve bu yüzden tedavi amaçlı gamet üretimini sağlayabilmek için önemlidir.

Amfibiler, böcekler ve balıklar

Amfibiler ve böcekler germ-line kiste sınırlı tek bir spermatogenik hücre aktarımını sağlayan birbirine bağlı hücreleri gösterirler. Bunlar sertoli hücresine benzer bakıcı hücrelere sahipse de germ hücrelerin gelişimi sertoli hücreleri ile temasa bağımlı değildir. Bu özellikler bireysel olarak gelişim gösteren kistlere ulaşımı sağlamada kültürel ortamın neden bu kadar etkili olduğunu açıklamaktadır. Aslında FSH ile desteklenmiş hücre kültür ortamında, yeni olan *Xenopus* ve *Drosophila*'da spermatogonia ve primer

[*] Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.

spermatidlerin tam bir mayoz geçirerek bölünebildikleri ve spermatozoa olamasalar bile uzamış spermatidler haline gelebildikleri gösterilmiştir. Hayvanlar aleminde sadece yılan balığında in vitro olarak testosteron bulunan kültür ortamında 21 gün sonrasında spermatogoniadan spermatozoaya farklılaştırma sağlanabilmiştir[1].

Kemirgenler

Karşıt olarak, memelilerde in vitro şartlarda spermatogenik siklus tamiri hala başarılmayı beklemektedir. Bu durum değişik basamaklarda çok kompleks germ hücre karışımlarının bulunmasıyla ve sertoli hücreler, bazal lamina ve germ hücreler arasında kompleks interselüler ilişkiler olmasıyla açıklanabilmektedir ki germ hücre gelişimi çok sayıda hormonun, büyüme faktörlerinin ve intra epitelyal hücreler ile dokuyu çevreleyen destekleyici hücreler tarafından salgılanan interlökinlerin etkisine bağımlıdır[2-21].

Kemirgenlerde; eğer kültürde 32˚C, havada %5 CO_2, Ph 7.2 ortamında vitaminler, aminoasitler, sodyum piruvat ve %10 fetal buzağı serumu bulunursa sertoli hücre ve germ hücre ilişkilerini koruyabilen seminiferöz tübül parçalarının canlılığı aylarca sürdürülebilir. Yine de 3 hafta sonrasında in vitro ortamda sadece sertoli hücreler canlı kalırken spermatogonia ve spermatositler dejenere olur ve yuvarlak spermatidler hiç oluşamaz[22]. İn vitro ortamda fare seminifer tübül segmentlerini kültür olara kullanan en son deneylerde geç pakiten spermatidlerin 2-4 gün içerisinde mayoz I'e maruz kalıp sekonder spermatidlerin oluştuğu gösterilmiştir. Sekonder spermatidler sonrasında 2-3 gün içerisinde mayoz II sonucu yuvarlak spermatidlerin kaynağını oluştururlar. Bu deneyler eğer hormonların eksikliği durumunda gelişir ise geç pakiten spermatidlerin hem mayotik bölünmeleri hem de erken spermiyogenez için gerekli bilgileri içerdiği sonucu desteklenirdi[23]. Bu deneyler daha sonra genişletilerek organ kültüründe preleptoten spermatidlerin 3 gün sonra zigoten spermatidlere geliştiğini ve bunların da 7 gün sonunda geç pakiten spermatidlere geliştiğini göstermişlerdir. Bunlar ayrıca geç pakiten seviyesinden yuvarlak spermatik seviyesine gelişim için 7 gün gerektiğini doğrulamışlardır. İlginç olarak mayoz I ve mayoz II'nin spontan olarak hızlanarak kültür ortamında yuvarlak spermatidlerin 2 gün içerisinde gelişebildikleri de gösterilmiştir. Ne yazık ki yuvarlak spermatidlerin, 4 gün süre alan, uzamış spermatidler haline olgunlaşması yüksek derecede anormal hücrelerin üretilmesi ile son bulur[24].

Fare premiyotik germ hücrelerinin konulduğu sertoli hücresi benzer besleyici tabakalarda bu tarz bir spermatogenez çok hızlandırılmış olsa bile spermatogoniadan yuvarlak spermatidlere 10-12 gün içerisinde dönüşümün mümkün olduğu gösterilmiştir. Yine de oluşan bu haploid germ hücreler ölürler[25]. Ayrıca kemirgen germ hücre suspansiyonlarını kullanarak in vitro ortamda, preleptoten spermatositlerin 3 gün içerisinde zigoten basamağına, bunların 7 gün içerisinde geç pakiten spermatidlere ve bunların da 2-7 gün içinde yuvarlak spermatidlere dönüşerek iki defa mayotik aktivite göstererek toplamda 12-17 gün içerisinde geliştiği gösterilmiştir. Yine de yuvarlak spermatidler normal uzayan spermatidlere farklılaşamazlar. Spermatositlerin yuvarlak spermatidlere in vitro ortamda farklılaşma yeteneği primer spermatositlerin orta ve geç pakiten basamaklarında, RNA transkripsiyonunun aktive olduğu ve kromatid cismin oluşmaya başladığı zamanda, mayotik bölünmenin tamamlanabilmesi için bilgi almalarına bağlı olduğu görüşü desteklenmektedir. Hormonal desteklemenin olmadığı ve sadece %0.2 fetal buzağı serumunun bulunduğu organ kültürlerinin kullanıldığı daha ileri çalışmalar spermatogoniadan yuvarlak spermatidlere gelişim ve değişimin 21 günde olduğu hızlandırılmış gelişimi göstermişlerdir. Ne yazık ki yine bu yuvarlak spermatidler duraklamış olarak kalmışlardır[26]. Fare premayotik germ hücreleri ile büyüme faktörlerini, FSH ve testosteronu içeren in vitro kültürlerde yuvarlak spermatidlerin üretimine 7-10 günde ulaşıldığı gösterilmiştir. Bunlar oositlerin için mikroenjeksiyonla konulduğunda normal doğurgan yavru elde edilmiştir ve bu da in vitro ortamda normal seminiferoz tübüllerin tüm çevresel potansiyeli tutularak yuvarlak spermatidlerin üretildiği görüşünü desteklemektedir[27].

Sonuçta kemiricilerle in vitro ortamda yapılan deneyler göstermiştir ki özellikle sertoli hücrelerinin kaybolması ile hücreler ilk 2 günde dejenere olmaktadır; bunun önüne kültür ortamında enzimatik ayrımlaşma esnasında sertoli hücre spermatogenik hücre kokültürlerinde minimal hücre bağlantı eksikliği sağlanması, maksimum hücre yoğunluğu oluşturularak, hormonlar (FSH ve testosteron), büyüme faktörleri ve vitaminlerle desteklenmesi, kültür ortamının sürekli yenilenmesi ve eş zamanlı metabolik atık ürünlerinin uzaklaştırılması ile geçilebilir.

Hormonların etkisi

Spermatogenez FSH'nın özellikle başlangıcında kritik bir yerinin olması ve FSH ile testosteronun germ hücre farklılaşmasını desteklemesi için ihtiyaç duyulmalarıyla hormon duyarlı bir gelişim sürecidir. FSH ve testosteron sertoli hücrelerindeki direk ve indirek aksiyonları ortaya çıkarırlar. FSH; sertoli hücresini etkileyerek siklik adenozin monofosfat (cAMP) birikimine bağlantı noktalarını geçer ve germ hücre transkripsiyonu aktive eder), protein kinaz aktivasyonuna, laktat üretimine (spermatosit RNA sentezi için gereklidir), transferin ile androjen bağlayıcı protein sentezine (germ hücreler üzerindeki testosteron aksiyonunu başlatmak için gereklidir) ve RNA ile kök hücre faktörünü (SCF) de içeren protein sentezine neden olur. Spermatositogenezisde FSH'nın hücre dejenerasyonunu önlemede, spermatogonianın proliferasyonunu stimule etmede (spermatogonia üzerine SCF ile c-kit reseptör bağlayarak), spermatogonianın preleptoten spermatositlere dönüşümünde ve mayotik bölünmeleri düzenlemede belirleyici rol oynadığı düşünülmektedir. Spermiyogenezdeki etkilerinin yanında FSH'nın karşıt bazı aksiyonları olduğu tanımlanmıştır ki bazı otörler tarafından yuvarlak spermatid farklılaşmasında stimulatör etkinliklerinin olduğunu ve bazıları tarafından da spermiyojenik gelişimi inhibe ettiği öne sürülmektedir[28,29,30].

Luteinizan hormon (LH) etkisi altında testosteron leydig hücreleri tarafından salgılanır ve sertoli hücrelerindeki intraselüler sitoplazmik yerleşimli andojen reseptörlerine bağlanırlar. Bunlar daha sonra nükleusu translokasyona uğratırlar ve transkripsiyonu stimule ederler. Testosteron, spermatogenezi düşük veya orta seviyelerde inhibe etmesiyle birlikte testiste serumdan 50-100 kat fazla konsantrasyonda bulunur. Zamanla testosteronun etkinliği azalır ki bu spermatogenezin sürdürülebilmesi için supra-fizyolojik seviyelerde bulunması gerekliliğini açıklar. Buna karşın testosteronun spermiyogenezi stimule etmesi için kesin olarak çok yüksek seviyede bulunması gerekliliği yoktur. Bu LH reseptörü olmayan knock-out fare yavrusu kullanılarak gösterilmiştir. Bu durumda LH leydig hücreleri stimüle edemeyerek çok düşük derecede intratestiküler testosteron seviyesine neden olur. Bu hayvanlar korunmuş spermatogenez varlığını göstermişlerdir ancak kantitatif analizler spermiyogenez kalitatif olarak devam ederse kantitatif olarak düşer.[31] Böylece spermatogenezis düşük testosteron seviyelerinde devam ettirilebilse de kantitatif spermatogenezisin devam ettirilmesi için muhtemelen androjen reseptörlerinin veya büyüme faktörlerinin yüksek seviyelerde uyarılmasıyla sağlanacak olan yüksek seviyede testosteron seviyeleri gerekmektedir. Ayrıca bu gözlemler yuvarlak spermatid apopitozisini ve spermiyogenezis azalmasını uyarsa da, spermatogoniyanın gelişimi ve mayoz oluşumunun indüksiyonu için ne kadar düşük seviyede testosteron miktarının gerekli olduğunu açıklamaktadır[32]. Ancak düşük testosteron seviyelerinde veya hiç olmadığı durumlara bağlı olarak spermiyogenezisin inhibe olduğu vakalarda ortama normal seviyelerde testosteron ilavesinin normal germ hücre sayısına gelmeyi sağlayamaması kantitatif spermatogenezisin uyarılmasında diğer başka faktörlere gereksinim olduğunu desteklemektedir.[33] FSH gibi testosteronun da germ hücrenin canlılığını devam ettirmesi ile spermatogoniya proliferasyonunun, spermatosit farklılaşmasının ve mayozun uyarılması için gerekli olduğu düşünülmektedir. Bunlara rağman testosteronun ana işlevi yuvarlak spermatid olgunlaşmasını ve uzamış spermatidlere dönüşümünü uyarmak ve kontrol etmektir[34-38].

Böylece hem FSH hem de testosteron sinerjistik hareket ederler ve işlevlerinin çoğuna androjen duyarlı ekstratestiküler dokulardan sekrete edilen intermediatörler, lokal steroidler veya pituiter hormonlara yanıt olarak üretilen diğer parakrin faktörler aracılık ediyor gibi görünmektedir. Parakrin etkiler birçok büyüme faktörleri, sitokinler, vazoaktif peptidler, hormonlar, endojen opioid peptidler ve nöropeptidler ile tanımlanmaktadır.

İN VİTRO SPERMİYOGENEZ: İNSANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Başlangıç çalışmalar

Yetişkin insanın tam testiküler dokularını veya testiküler doku süpansiyonlarını in vitro ortamda spermatagonezis çalışması için kullanmak bu örneklerde spermatidlerin tamamen yokluğunun sağlanmasının imkansız olduğu problemini doğurmaktadır. Yine de insan spermatogenetik siklusunu in vitro ortamda çalışmak için bu yüzden gizli uzayan veya uzamış spermatid odaklarından muhtemel kontaminasyonu engellemek gerekmektedir. Bu sebeple deneyler her hücre tipinin çok dikkatlice izolasyonundan sonra yuvarlak spermatidler veya

yuvarlak spermatid karışımları, diploid germ hücreleri ve sertoli hücreleri ile yapılmalıdır[39-41].

Spermatositogenezis ve spermiyogenezisi yokluğu olan bazı hastalarda bazı yuvarlak spermatidler mayotik arrestten kaçabilir ve izole edilebilirler. Yuvarlak spermatid enjeksiyonu ile olan moral bozucu sonuçlar nedeniyle, saptanan kötü klinik sonuçların üstesinden gelmek için yuvarlak spermatidlerin in vitro ortamda kültürü denenme çalışmalarına benzer imamtür haploid germ hücreler kullanılarak başlanmıştır. Yuvarlak spermatidlerin doğru olarak kimliklendirmesi teknik olarak zor olması ve uygun olmayan seçim yuvarlak spermatid enjeksiyonu sonuçlarının üzerinde kötü bir etkiye neden olabilmektedir. Her ne kadar yönergeler bu hücreleri doğru belirlemek ve test etmenin üzerinde nasıl önemle durursa dursunlar yaşayan ve canlı yuvarlak spermatidlerin doğru kimliklendirilmesinde in vitro yuvarlak spermatid kültürlerindeki flagellar büyüme daha ileri derecede yardımcı olabilir[41-48].

Sertoli hücrelerinin primer spermatositler, yuvarlak spermatidler ve uzayan spermatdiler ile beraber oldukları kültürlerde serumla desteklenmiş 32˚C ortamda mayoza yeniden başlama veya uzayan spermatid maturasyonu 4 güne kadar olan gözlemlerde gösterilememiştir. Bu sıcaklık seviyesi protein sentezinin inhibe olduğu fare deneylerinde erkek germ hücrelerinin 32-34˚C'nin üstünde pes ettiğinin gösterilmesine dayanılarak seçilmiştir[49]. Buna karşın kültürlenmiş izole yuvarlak spermatidlerin %22'sinde 1-2 günde flagella büyümüştür. Yine bu geç yuvarlak spermatidler ölü haline gelmişlerdir ve normal embiryo geliştirme uyarımı kapasitesine sahip olmamışlardır[50-52]. Bu tür bir deney serum desteği olmadan ve 37˚C' de de klinik olarak uygulanmıştır ancak yararlı etkileri belirlenememiştir ki bunun yanında yuvarlak spermatid enjeksiyonu sonrası fertilite oranında küçük bir gelişme olduğu tespit edilmiştir ancak bunda da in vitro kültüre edilen yuvarlak spermatidlerin hiçbirisinde 3 gün sonrasında flagellum gelişimi olmamıştır[53].

Vero hücre tek katmanları

Yukarıda belirtilen sonuçları geliştirmek için interlökinlerin, büyüme faktörlerinin salınımını yapan ve maddeleri detoksifiye eden Vero hücre kültürleri kullanılarak yuvarlak spermatidlerin daha iyi olgunlaşması hipotezize edilmiştir[54]. 37˚C'deki Vero hücreli tek katmanlı kültürleri kullanılarak 5 gün içerisinde insan yuvarlak hücreli spermatidler geç spermatidlere ve spermatozoaya olgunlaşmayı göstermektedirler ki bu in vivo spermiyogenezisde fizyolojik koşullarda beklenilen 16-22 gün süreye göre oldukça hızlı gerçekleşmektedir[55-56]. Matür gametlerin çoğunun anormal nükleusa sahip olması ve klinik tedavilerde kullanılmamasına rağmen bu deneyler memelilerde in vitro ortamda yuvarlak spermatidden spermatozoon evresine kadar hormon desteği olmadan Vero hücre kokültürlerinde tam bir spermatid farklılaşmasına ulaşılabilineceğinin mümkün olduğunu gösteren ilk deneylerdir.

Bu deneylerde 3 hastadan normal karyotip ve sekretuar azospermi (SAZ)'ye sahip testiküler örnekler kullanılmıştır. Testiküler diagnositik biopsi 2 vakada primer speramatosit evresinde (cMA) tam bir maturasyon durması ve bir vakada tam olmayan maturasyon durması (iMA: en azından geç spermatid veya spermatozoa evresine kadar spermiyogenezisi içeren bir tane seminifer tübül kesimi olması) olduğunu göstermiştir. Açık tedavi testiküler biopside (testiküler sperm ekstraksiyonu, TESE) tam maturasyonu arresti olan örneklerde mayotik bloktan (vakalar 1,2) kaçan birkaç adet erken yuvarlak spermatid (Sa1: flagellasız, golgi fazında) gösterilmişken tam olmayan maturasyon durması olanlarda spermatozoa yenilenmesinin mümkün kılındığını (vaka 3) gösterilmiştir. Tüm bu vakalarda yuvarlak spermatidler mikromanüplasyon ve tek katmanlı Vero hücre kültürlerinde in vitro olarak izole edilmişlerdir. Olguların sadece 1'inde (1/3, %33.3) 5 gün içerisinde spermiyogenezis gelişmiş olması mayotik bloktan kaçan yuvarlak spermatidlerin normal spermiogenik potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Buna karşın vaka 3'de yuvarlak spermatidde maturasyonda duraklama olması (korunmuş spermiyogenezisle beraber) in vitro ortamda kültür ortamının germ hücre farklılaşması için en uygun hale getirilmediğini desteklemektedir veya alınan SAZ örnekleri, bazı vakalarda normal spermatid gelişiminin temin edildiği mayoz arrestine sahip ve bazı vakalarda da bu tür farklılılaşmanın temin edilmediği azalmış spermiyogeneze sahip, farklı genetik bozukluklar göstermektedir.

Sonuçta toplam olarak, erken yuvarlak spermatidlerin (Sa1) %18'i flagella oluşturma kapasitesine sahip (Sa2), %11'i erken uzayan evreye (Sb2) ve erken uzamış evreye (Sd1) erişebilir ve %2'si geç uzamış spermatidlere (Sd2) veya spermatozoaya (Sz) farklılaşabilmekte olsa da beraberinde morfolojik baş defektleri de olmaktadır.

Önceki spermatid evresiyle ilişkili olarak spermatid farklılaşması ve arrest oranlarının analizinde en fazla Sa1 (%82 aSa1) ve Sd1 (%86 aSd1) evrelerinde arrest gerçekleşmektedir. Diğer yandan diğer geçiş safhalarında %36 ile Sa2 (aSa2) ve %0 ile Sb2 (aSb2) evrelerinde daha düşük oranlarda matürasyon arresti olmaktadır. Böylece Sa2'nin %64'ü Sb2 evresine ve Sb2'nin tümü Sd1'e gelişim göstermektedir (Tablo 31.1, Resim 31.1).

Tablo 31.1: *Vero hücre tek katmanlarında spermatid matürasyonu ve arresti*

	Vaka 1	Vaka 2	Vaka 3	Toplam
Spermatid matürasyonu				
Sa1	37	10	15	62
Sa2	11	0	0	11
Sb2	7	0	0	7
Sd1	7	0	0	7
Sd2/Sz	1	0	0	1
Spermatid arresti				
Toplam Sa1	26	10	15	51
aSa1	26	6	7	39
aSb1	0	4	8	12
aSa2	4			4
aSb2	0			0
aSd1	6			6

Sa1:erken yuvarlak spermatidler; Sa2:geç yuvarlak spermatidler (flagellalı); Sb2:erken uzayan spermatidler; Sd1:erken uzamış spermatidler; Sd2:geç uzamış Spermatidler;Sz: spermatozoa; a:arrest olmuş

Bu sonuçlar spermiyogenezisteki en kritik basamakların flagellanın çıktığı, Sa1'den Sa2'ye geçişte ve nükleer uzama ve yoğunlaşmanın gerçekleştiği Sd1'den Sd2/Sz evrelerine dönüşümün olduğu spermiyogenezisin final matürasyon basamağının olduğunu desteklemektedir. Bu daha ileri olarak flagella oluşumunun olmadığı durumlarda (%24 Sb1) sitoplazma uzaması ile nükleer uzama ve yoğunlaşmanın olduğunun gözlemlenmesi kanıtlanmıştır. İn vitro ortamda yuvarlak spermatidlerin uzamış spermatid/spermatozoalara matürasyon oranlarının düşüklüğü (%2) Sa1'den Sa2'ye (%82 aSa1) ve Sd1'den Sd2/Sz'ye (%86 aSd1) etkili dönümüşüme izin vermeyen kültür ortamına veya Sa1'in önemli kısmının etkilendiği ileri gelişmenin sekteye uğradığı SAZ vakalarında genetik bozukluklara atfedilebilir.

Vero Hücresi ile zenginleştirilmiş kültür ortamı

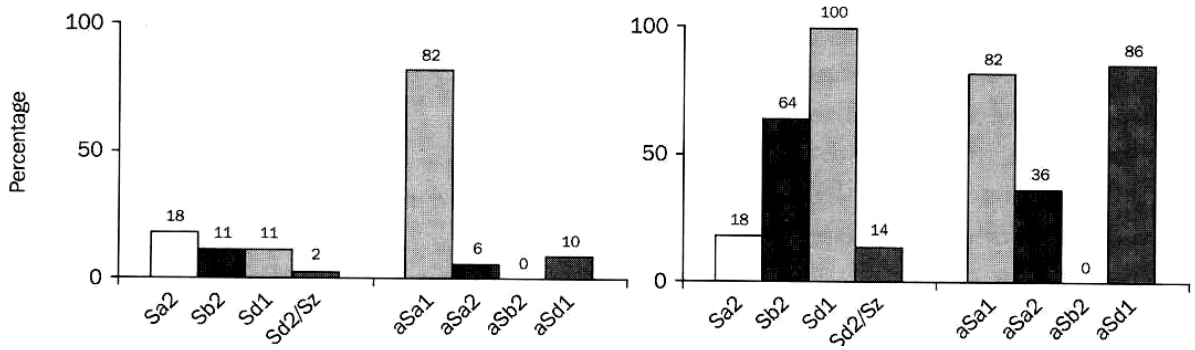
Her ne kadar vero hücreler doğacak çocuğa herhangi bir hastalık geçişine neden olmayarak [57,58] insan embriyo kültüründe başarı ile görev alsalar da hücre tek katmanlarından hayvan veya insan besleyici katmanları karışabileceği için klinik tedavilerde kullanımından kaçınılmalıdır. Bu nedenle Vero hücre ile zenginleştirilmiş ortamlı kültürler ile yapılan deneyler arttırılmıştır. Bu ortamlar kültür sonrası 2. günde Vero hücresi tek katmanlarını kaplayan süpernatant sıvıyı ihtiva etmektedirler bu yüzden hücre tek katmanları tarafından salınan tüm parakrin faktörleri de içerirler. Bu deneylerde erken yuvarlak spermatidler (Sa1:flagellası olmayan) korunmuş ve bölünmüş spermatogenezis olan vakalardan izole edilirler ve kültüre edilerek gelişim potansiyellerini çalışabilmek için oositlerin içine mikroenjeksiyonla konularak in vitro ortamda olgunlaştırılırlar. Normal karyotipe sahip 12 hastadan testiküler örnekler kullanılmıştır ki bunlardan 7 tanesinde SAZ ve 5 tanesinde obstrüktif azospermi (OAZ) bulunmaktaydı. Tanısal histopatolojik testiküler biopsi (TDB) SAZ vakaları içinde 2 tane tamamlanmamış sadece sertoli only cell sendromu (iSO: en azından yuvarlak spermatid gösteren bir tane seminifer tübül kesimi bulunmakta), SAZ olan 1 vaka da tamamen matürasyon arresti (cMA: mayoz 1 evresinde arrest) ve 4 vakada da hipospermatogenezis (HP) olduğunu gösterirken OAZ vakalarının tümünde spermiyogenezin korunmuş olduğunu göstermiştir. Tedavi amaçlı testiküler biopside (testiküler sperm ekstraksiyonu, TESE) mayotik arrestten kaçan birkaç Sa1 olan spermasitogenezis odağı olan bir tane tamamlanmamış sertoli only cell sendromlu vaka haricinde tüm örnekler spermatozoanın kendini tamir edebilme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir[40].

Bütün hasta örneklerinde Sa1'den Sa2'ye (flagellalı geç yuvarlak spermatidler) ve Sb2'ye (erken uzayan spermatidler) matürasyon olduğu gösterilmiştir ancak erken uzamış spermatidlere (%67 Sd1) ve geç uzamış spermatidlere/ spermatozoalara (%58 Sd2/Sz) başarılı olarak farklılaşma progresif olarak azalmıştır (Tablo 31.2). Vero hücre tek katmanlarıyla karşılaştırıldığında vero hücreden zenginleştirilmiş ortamda göreceli olarak daha iyi sonuçlar (%33 vs.%58, $p>0.05$) elde edilmiştir ki bu muhtemelen besleyici tabakalarla ilgili yapılan az sayıda hasta olan çalışmalara ve vero hücreden zenginleştirilmiş ortamda yuvarlak

spermatidlere daha iyi genetik geçmiş verebilmesi sonucu tam spermiyogenezin daha fazla olması ile ilişkilidir. İn vitro olarak tam spermiyogenezise 7/12 (%58) ulaşılma oranıyla tamamlanmış spermiyogenezisli vakalardan izole edilen yuvarlak spermatidle spermiyogenezis olmayan (Sd2nin kültürde 9 gün geçtikten sonra farklılaşması) vakadan izole edilmiş olanın benzer spermiogenik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılabilir. Bu da in vitro şartlarda sadece tüm yuvarlak spermatidlerin farklılaşma kapasitesine sahip olmasını ve bütün hasta örneklerindeki yuvarlak spermatidlerin farklılaşma potansiyeline sahip olduğu değil spermiyogenez olmayan hasta örneklerindeki immatür haploid germ hücrelerin de in vitro ortamda farklılaşabilip farklılaşamadıklarının çalışılmasının değerli olduğu sonucunu desteklemektedir. Çünkü SAZ vakalarının çoğunda (11/12,%92) ve OAZ vakalarının tümünde (5/11,%45) tam spermiyogenezis olduğu gösterildiği için, özellikle OAZ (%40) ve hipospermatogenezis (%50) olan vakalarda erken yuvarlak spermatid farklılaşmasında izlenen yüksek arrest oranları Sa1'deki geçmişten gelen genetik bozukluklara bağlı olmaktan ziyade kültür sistemi ve kültür ortamındaki sınırlamalara bağlıdır gibi görünmektedir.

Kültür ortamında Sa1 2-3 gün sonra flagella çıkartarak Sb2'ye dönüşür ardından Sb2 Sd1'ye 3-4gün sonra matüre olarak dönüşür ve Sd1 de Sd2'ye 2 gün daha sonra farklılaşarak dönüşüm gösterir. Bu süreç in vitro ortamda spermiyogenezise kadar toplam 7-9 günlük bir süre ediyor ki, bu Vero hücre tek katmanlarıyla[39] görülen matürasyon gelişimi için hızlandırılmış olarak geçen 5 günlük süreyle karşılaştırıldığında in vivo şartlarda insan spemiyogenezisi için sürecek olan 16-22 günlük sürece daha yakın olduğu için bir gelişme olarak değerlendirilir[55,56].

Sonuçta toplam olarak Sa1'nin %25'i flagella çıkarıp Sb2 kademesine gelebilmekte, Sb2'nin %11'i Sd1'e farklılaşabilmekte ve onun da %5'i Sd2'ye matüre olabilmektedir (Tablo 31.3, Resim 31.2). OAZ vakaları in vitro ortamda daha iyi farklılaşma etkinliği gösterse de bu farklılaşma istatistiksel olarak anlamlı değildir (%9 OAZ'de vs. %4 SAZ'da; p>0.05). Bu sonuçlar Vero hücre tek katmanlarıyla çıkanları doğrulamaktadır (%11 Sb2, %11Sd1, %2Sd2)[39] ancak Vero hücre ile zenginleştirilmiş ortam kültürü erken ve geç spermiyogenez matürasyon oranları daha iyi görünmektedir. Erken hücre evrelerindekilerle ilişkilendirildiğinde spermatid arrest oranlarının analizi benzer sonuçları vermektedir. Sa1'den Sb2'ye dönüşüm basamağı farklılaşma arrestinin ana kademesidir (Arrestin %75'i Sa1'de gerçekleşir, aSa1) buna karşın Sb2'den Sd1'e (Arrestin %58'i Sb2'de gerçekleşir, aSb2) ve Sd1'den Sd2'ye (Arrestin %48'i Sd1'de gerçekleşir, aSd1) dönüşüm basamaklarında arrest daha az gerçekleşir. Obstrüktif olan ve olmayan azospermi arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmasa da OAZ vakalarında daha az oranda Sd1 arresti (OAZ'de %29 vs. SAZ'da %56;p>0.05) gösterilmiştir. Karşılaştırıldığında Vero hücre tek katmanlarında benzer oranda Sa1 arresti (%82 vs. %75 aSa1), Sa2'den Sb2'ye daha iyi bir gelişme (%36 vs %0 aSa2), Sb2'den Sd1'e daha kötü bir matürasyon (%0 vs %58 aSb2) veSd1'den Sd2'ye daha iyi bir farklılaşma (%86 vs %48 aSd1) oranları gösterilmiştir[39]. Vero hücre ile zenginleştirilmiş ortam kültüründeki sonuçlar spermiyogenezde en kritik basamakların Sa1'den Sa2'ye dönüşüm basa-



Resim 31.1: *Vero hücre tek katmanları. Başlangıçtaki erken yuvarlak spermatid sayısına göre (sol) veya önceki spermiyogenik evredeki spermatid sayısına göre (sağ) spermatid matürasyon ve arrestinin yüzdelerle dağılımı Matürasyon evreleri için Tablo31.1'e bakınız.*

Tablo 31.2: *Vero hücre ile zenginleştirilmiş kültür ortamında başarılı spermatid matürasyonu olan hastalar (n (%). Spermatid matürasyon aşamaları için tablo31.1'e bakınız.*

	Sa1	Sb2	Sd1	Sd2	Başarısızlıklar
OAZ	5	5	3 (60)	3 (60)	2 (40)
HP	4	4	3 (75)	2 (50)	2 (50)
MA	1	1	1 (100)	1 (100)	0
SO	2	2	1 (50)	1 (50)	1 (50)
MA+SO	3	3	2 (67)	2 (67)	1 (33)
SAZ	7	7	5 (71)	4 (57)	3 (43)
Toplam	12	12	8 (67)	7 (58)	5 (42)

OAZ: obstürktif azospermi, HP: hipospermatogenezis, MA: matürasyon arresti, SO: sadece sertoli hücresi sendromu, SAZ: sekretuar azospermi

mağında olan flagella çıkışı ile Sd1 ve Sd2 oluşumu esnasında olan son nükleer uzama ve yoğunlaşma olduğunu doğrulamıştır. Bu daha ileride flagella çıkışı (Sb1) olmadan sitoplazma uzaması ve nükleer uzama ile yoğunlaşmanın olabilmesi gözlemi ile kanıtlanmıştır. Hatta 238 aSa1'dan 178'inin içinden 83 (%35) tanesi aSa1 olarak kalırken 95 (%40) tanesi Sb1'e gelişim göstermişlerdir.

İn vitro farklılaşmış geç spermatidlerin (Sd2) ve arrest olmuş erken uzayan spermatidlerin (aSb2) tümü gelişimsel potansiyellerinin değerlendirilebilmesi amacıyla deneysel oosit mikroenjeksiyonlarında kullanılmıştır (Tablo 31.4). Bu amaçla 24 tane bağışlanmış oosit kullanılmıştır ki bunların 12 tanesi matür mayoz II (MII) safhasında ve 12 tanesi de immatür mayoz I (MI) safhasında olup spontan olarak MII basamağına 6 saat içinde olgunlaşan oositlerdi[40]. Sd2 veya aSb2'nin kullanıldığı mikroenjeksiyon siklusları arasında belirgin anlamlı farklılık yoktu. Düşük fertilizasyon oranlarına (%41) karşın embriyo yarılması (%78), yüksek kalitede embriyo morfolojisi (%71) ve blastosist (%60) oluşum oranları normal görünmekteydi ki bu bulgular eğer en azından spermatogenezisi korunmuş testiküler örneklerden yuvarlak spermatidler alınacak olursa in vitro ortamda olgunlaşan spermatidlerin normal embriyo gelişimini devam ettirme kapasitesine sahip olduğunu desteklemektedir.[40] Embriyo gelişimine ait veriler unipronükleer zigotların (bir pronükleus ve 2 adet kutup gövdesi) gelişimsel potansiyellerini içermemekteydi. Eğer bunlar da kullanılmış olsaydı fertilizasyon oranları normale yakın olacaktı (%64). Unipronükleer zigotlar öploid (karyosingamiye bağlı) veya haploid (erkek pronükleus oluşumda başarısızlıkla beraber oosit aktivasyonuna bağlı) olabilseler de korunmuş spermiyogenezisli hastalardan alınan yuvarlak spermatidleri kullanan klinik mikroenjeksiyon siklusları, unipronükleer zigotların karyosingami sonucu oluşabileceğini desteklemektedir ki bunlar term gebeliklere ve normal bebek doğumuna haizdirler[48].

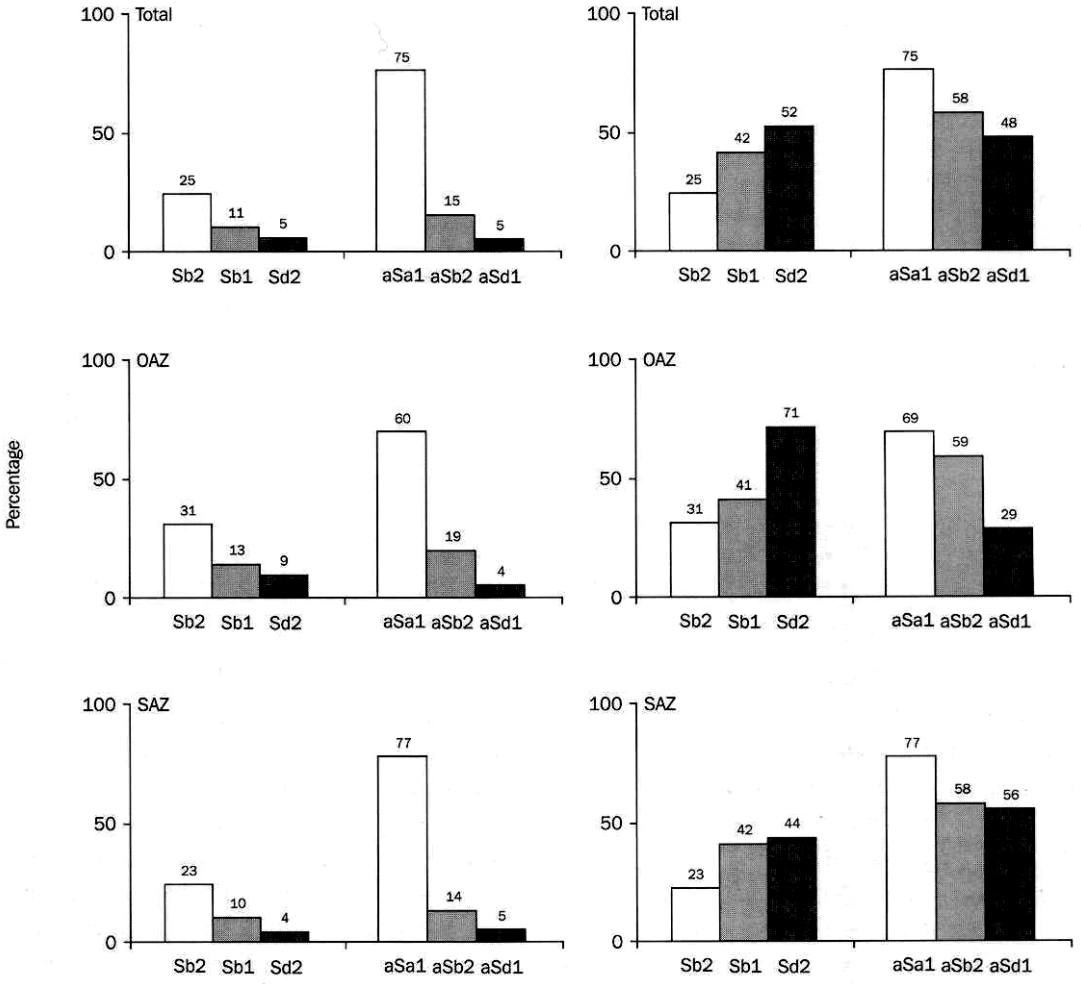
Tablo 31.3: *Vero hücre ile zenginleştirilmiş kültür ortamında spermatid matürasyon ve arresti (n). Spermatid matürasyon aşamaları için Tablo31.1'e bakınız.*

	OAZ	HP	MA+SO	SAZ	Toplam
	5	4	3	7	12
Spermatid matürasyonu					
Sa1	54	94	90	184	238
Sb2	17	25	18	43	60
Sd1	7	9	9	18	25
Sd2/Sz	5	4	4	8	13
Spermatid arresti					
aSa1	37	69	72	141	178
aSb2	10	16	9	25	35
aSd1	2	5	5	10	12

OAZ: obstürktif azospermi, HP: hipospermatogenezis, MA:matürasyon arresti, SO:sadece sertoli hücresi sendromu, SAZ: sekretuar azospermi

Hormonal destekleme

Yuvarlak spermatidlerin spermiyogenik potansiyelini daha ileri seviyede değerlendirmek için Vero hücreli tek katmanlı ve Vero hücreden zenginleştirilmiş kültür ortamı kullanılarak yapılan çalışmalar SAZ olan 61 hasta kullanılarak genişletildi. Bu deneylerde yuvarlak spermatidleri diploid germ hücreler ve sertoli hücrelerle (otolog kokültür sistem) beraber kültür yaparak etkileri çalışıldı. Bunlar için, mikromanüplasyonla hücreler izole edildi ve kültür içinde mikrodamlalar halinde karıştırıldı (Resim 31.3):10-30 spermatogoniya A (SGA: iğsi şekilli), 200 primer spermatosit (ST1 : 19-24µm çapında), mümkün olduğunda 10-20 sekonder spermatosit (ST2: polarize sitoplazma ve nükleus, 14µm çapında), mümkün olduğunda çeşitli miktarlarda erken yuvarlak spermatidler (Sa1: 8-10µm çapında) ve 30-80 sertoli hücresi (SC:sitoplazma dense lipid damlaları ve lizozomlar ile dolu, nükleus yükseltilmiş sınırlar ve büyük bir nükleolusa sahip). Hücre popülasyonlarının saflığını doğrulamak için izole germ hücreler X,Y ve 18 kromozomların sentromerik bölgelerini içeren DNA fluoresent problarını kullanan flöresans in situ hibridizasyon (FISH) ile analiz edildi (Resim 31.4). Desteklenmiş kültür ortamının potansiyel yararlı etkisi de 25U/L rekombinan follikül stimulan hormon (r FSH) veya r FSH ve 1µmol/l testosteron (T) gibi eklenen hormonlar kullanılarak değerlendirildi. Spermatidlerin in vivo matürasyon sonrası tespit edilen gelişim potansiyeli bağışlanmış olan artan MII oositlere mikroenjeksiyon yapılarak FISH sonrası embriyoların kromozom yapısı değerlendirilerek çalışıldı[41].



Resim 31.2: *Vero hücre ile zenginleştirilmiş kültür ortamı. Başlangıçtaki erken yuvarlak spermatid sayısına göre (sol) veya önceki spermiyogenik evredeki spermatid sayısına göre (sağ) spermatid matürasyon ve arrestinin yüzdelerle dağılımı Matürasyon evreleri için Tablo 31.1'e bakınız. OAZ, obstrüktif azospermi; SAZ, sekretuar azospermi.*

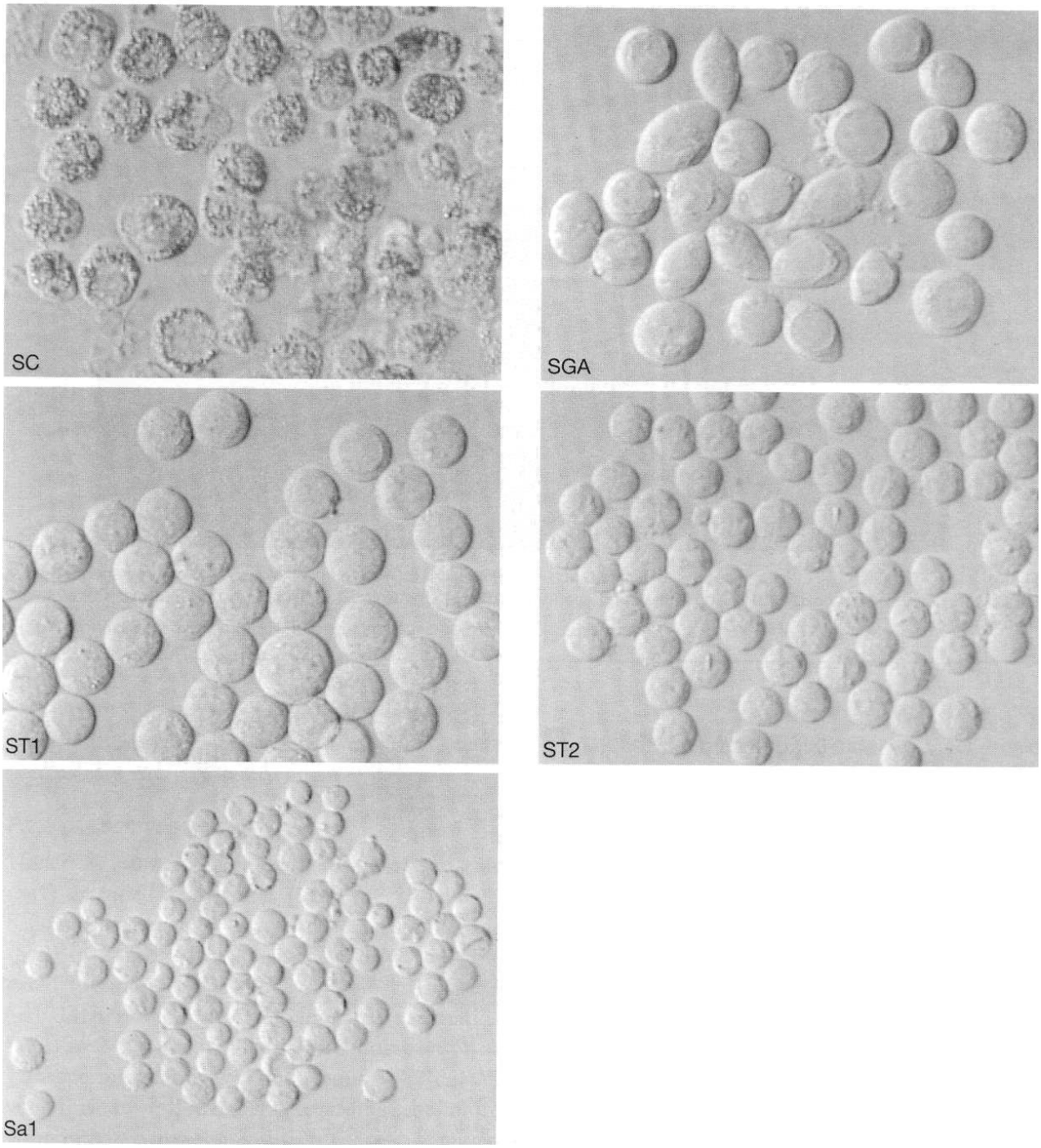
Tablo 31.4: *Vero hücre ile zenginleştirilmiş kültür ortamında matürasyon sonrası spermatid mikroenjeksiyon sonuçları (n (%))*

	IVMO			MII			Tüm oositler		
	Sd2	aSb2	Toplam	Sd2	aSb2	Toplam	Sd2	aSb2	Toplam
MII'ye enjekte edilmiş	10	2	12	2	10	12	12	12	34
Bozulmuş	0	1 (50)	1 (8)	0	1 (10)	1 (8)	0	2 (17)	2 (8)
Sağlam	10 (100)	1 (50)	11 (92)	2 (100)	9 (90)	11 (92)	12 (100)	10 (83)	22 (92)
- Fertilize olmamış (OPN1PB)	3 (30)	1 (100)	4 (36)	0	1 (11)	1 (9)	3 (25)	2 (20)	5 (23)
- Aktive olmuş (OPN2PB)	1 (10)	0	1 (9)	0	2 (22)	2 (18)	1 (8)	2 (20)	3 (14)
- Anormal fertilizasyon (1PN2PB)	2 (20)	0	2 (18)	1 (50)	2 (22)	3 (27)	3 (25)	2 (20)	5 (23)
- Normal fertilizasyon (2PN2PB)	4 (40)	0	4 (36)	1 (50)	4 (44)	5 (45)	5 (42)	4 (40)	9 (41)
Embriyo yarılması	2 (50)		2 (50)	1 (100)	4 (100)	5 (100)	3 (60)	4 (100)	7 (78)
Derece A/B embriyolar	0		0	1 (100)	4 (100)	5 (100)	1 (33)	4 (100)	5 (71)
Blastosistler	0		0	1 (100)	2 (50)	3 (60)	1 (100)	2 (50)	3 (60)
Yüksek derece blastosistler				1 (100)	2 (100)	3 (100)	1 (100)	2 (100)	3 (100)

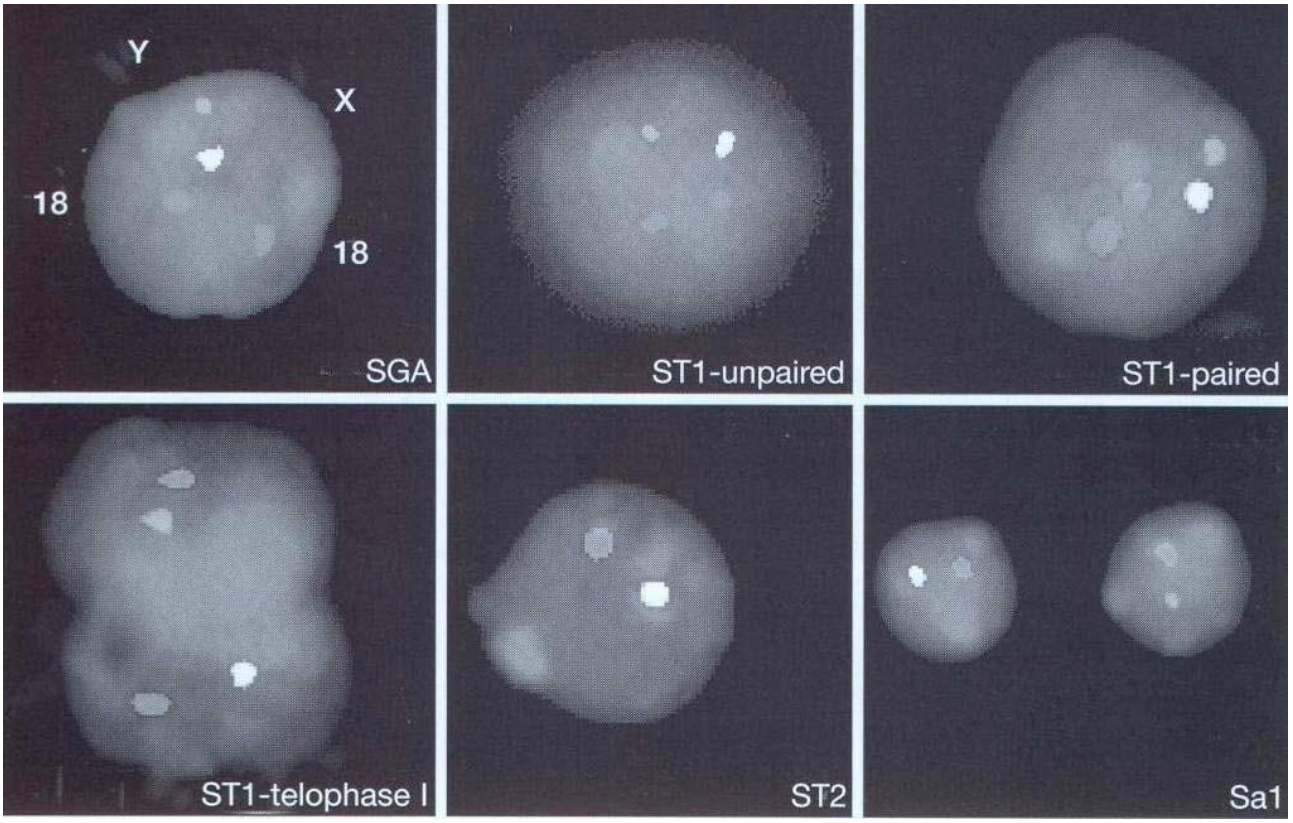
aSb2:arrest olmuş erken uzayan spermatidler, Sd2: geç uzamış spermatidler, IVMO: in vitro matüre olmuş (MI) oositler; MII: matur mayoz II oositler, PN: pronükleus, PB: polar cisimler

Erkek populasyonu

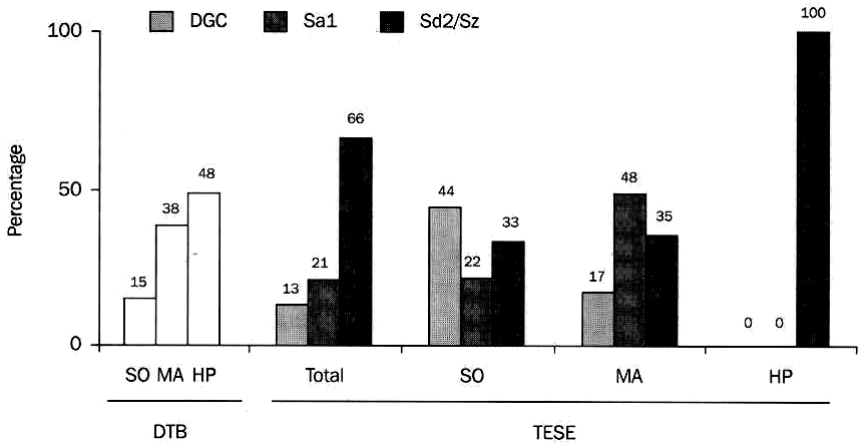
Bu deneylerde normal karyotipe sahip ve sekretuar azospermi olan 61 hastanın testiküler örnekleri kullanıldı (Resim 31.5)[41]. Testiküler diagnostik biopsi sadece sertoli hücre sendromlu 9 vaka (%15 SO), matürasyon arrestli 23 vaka (%38 MA) ve hipospermatogenezisli 29 vaka (%48 HP) olduğunu gösterdi. TESE' de tüm HP örneklerinde geç uzamış spermatidlerin (Sd2) ve spermatozoaların (Sz) iyileşme kapasitesine sahip olduğu; SO'lu 3 vakada korunmuş spermiyogenezis (Sd2/Sz) olduğu, iki SO örneğinde erken yuvarlak spermatidlerin (Sa1) iyileşme kapasitesine sahip olduğu ve 4 SO vakasında sadece diploid germ hücrelerin (DGC) olduğu; 8 MA vakasında Sd2/Sz, 11 MA vakasında Sa1 ve 4 MA vakasında DGC olduğu gösterildi. TESE'de Sd2/Sz olan vakalardan (29 HP, 8 MA ve 3 SO vakası) alınan Sertoli hücreler, DGC'ler ve Sa1 kontrol olarak kullanıldı. TESE'de spermiyogenez olmayan vakalardan alınan (6 SO ve 15 MA vakası) DGC'ler ve Sa1 vaka çalışmaları olarak kullanıldı.



Resim 31.3: *Ko-kültürler. İzole edilmiş sertoli hücreleri (SC), spermatogoniya A (SGA), primer spermatositler (ST1), sekonder spermatositler (ST2) ve erken yuvarlak spermatositler (Sa1)*



Resim 31.4: *Ko-kültürler. Spermatogoniya A'nın (SGA), primer spermatositlerin (ST1), sekonder spermatositlerin (ST2) ve erken yuvarlak spermatositlerin (Sa1) in situ floresan hibridizasyon analizi (FISH). 18=menekşe rengi, X=sarı, Y=kırmızı. Renk tablosu 8'e bakınız (syf xxviii)*



Resim 31.5: *Ko-kültürler. Testiküler diagnostik biopside (TDB) bulunan histopatolojiye ve tedavi biopsisinde (Testiküler sperm ekstraksiyonu,TESE) bulunan hücre tiplerine göre hastaların yüzde dağılımı. SO,Sertoli only cell sendromu; MA,matürasyon arresti; HP, hipospermatogenezis; DGC,diploid germ hücreler; Sa1,erken yuvarlak spermatidler; Sd2/Sz,geç uzamış spermatidler/spermatozoalar*

Spermiyogenezin düzeni

İn vitro kültürde erken yuvarlak spermatidler (Sa1) flagella çıkartarak 1-2gün içerisinde Sa2'ye dönüşürler; Sa2 de uzayan spermatidlere (Sb2) 2-3 gün içerisinde dönüşür; Sb2 de erken uzamış spermatidlere (Sd1) 3-4 gün içerisinde olgunlaşır ve Sd1 de 2-3 gün sonrasında geç uzamış spermatidlere (Sd2) farklılaşır. İn vitro spermiyogenezisin toplam süresi yaklaşık 8-12 gündür[41] ki bu Vero hücre tekkatmanlarıyla (5 gün)[39] veya Vero hücre ile zenginleştirilmiş kültür ortamında (7-9 gün)[40] gerçekleşen in vitro hızlanmış matürasyona göre fizyolojik

koşullarda, in vivo 16-22 gün süren insan spermiyogenezine yaklaşarak gelişme olarak değerlendirilir[55,56].

Erken uzamış spermatid evresine kadar geçen ortalama kültür süreleri göz önüne alındığında her iki kültür ortamında da (desteklenmemiş ortam, CM: P=0.554; FSH: p=0.512; FSH + T: p=0.635) kontrol ve vaka grupları arasında belirgin anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 31.5). Buna zıt olarak kontrol ve vaka grupları birbirinden farklı kültür ortamlarında karşılaştırıldığında belirgin farklılık ortaya çıkmıştır. Kontrollerde CM/FSH (p=0.153) ve FSH/FSH+T (p=0.545) için anlamlı farklılık bulunmamıştır, ancak CM/FSH+T (p=0.019) için anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Vakalarda CM/FSH (p=0.821), FSH/FSH+T (p=0.395) ve CM/FSH+T (p=0.447) için anlamlı farklılıklar bulunmamıştır.

Testiküler fenotipe göre spermatid matürasyonu ve arrest oranları

Kontrollerde (TESE'de Sd2/Sz ile korunmuş spermiyogenez) testiküler örnekleri in vitro şartlarda başarılı spermatid matürasyonu yapabilen hasta oranları göstermiştir ki erken yuvarlak spermatidlerin spermiyogenik potansiyelleri; en iyi matürasyon sonuçları CM+FSH+T ile ve FSH'nin geç spermatid farklılaşmasını inhibe ettiği saptanmış olup; HP olanlarda SO/MA olanlara göre daha yüksek gibi görünmektedir (Tablo 31.6, Resim 31.6). Buna karşın, CM+FSH+T grubunda bile SO/MA hastalarının sadece %25'i ve HP hastalarının %38'i Sd2 evresine ulaşmıştır. Karşılaştırıldığında Vero hücre ile zenginleştirilmiş kültür ortamında, vakalardan OAZ olanların %60'ında (n:5), HP olanların %50'sinde (n:4), SO/MA olanların %67'sinde (n:3) ve SAZ olanların %57'sinde (n:7) Sa1'den Sd2'ye farklılaşma gerçekleşerek daha iyi sonuçlar sağlanmıştır[40]. Bu verilen verilerle ilişkili olarak anlamlı farklılıklar bulunamamış olsa da yukarıdaki eğilimlere bazı özel yorumlar yapmak gerekmektedir: (1) hormon desteği ile karşılaştırıldığında gerekli parakrin faktörleri salgılayan Vero hücrelerle daha iyi spermatid farklılaşma oranları elde edilmiştir; (2) günümüzde yapılan çalışmalar eskilere kıyasla daha büyüktür (61 vs. 12 vaka) ve bu yüzden gerçekle daha tutarlıdır; (3) aynı testiküler fenotipe sahip hastalardan alınmış olsa bile değişik azospermik hastalardan alınan yuvarlak spermatidler benzer spermiyojenik potansiyeli göstermemektedirler. Bu nedenle matürasyon oranları kişisel gelişim doğasına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir ve bundan dolayı da tutarlı ve yeniden üretilebilir değildir.

Tablo 31.5: *Kokültürlerde spermatid matürasyon ve arresti (n).Spermatid matürasyon aşamaları için tablo 31.1'e bakınız.*

	Kontroller			Vakalar		
	CM	FSH	FSH + T	CM	FSH	FSH + T
Vakalar	11	13	16	8	4	9
Ortalama kültür süreleri (gün)	12	6	7	10	11	8
Aralık	5-20	3-9	4-11	8-12		6-12
Spermatid matürasyonu						
Sa1	203	273	286	201	59	194
Sa2	32	71	110	15	9	62
Sb2	19	54	91	11	6	44
Sd1	11	6	35	3	1	25
Sd2	2	0	22	0	0	16
Spermatid arresti						
Toplam aSa1	171	202	176	186	50	132
aSa1	126	126	65	156	39	57
aSb1	45	76	111	30	11	75
aSa2	13	17	19	4	3	18
aSb2	8	48	56	8	5	19
aSd1	9	6	13	3	1	9

CM: Hazırlanmış ortam, FSH: Folikül Stimülan Hormon, T: Testesteron

Vakalar (TESE'de DGC'ler veya Sa1 ile birlikte spermiyogenez olmayan) kontrollerle kıyaslandığında in vitro şartlarda spermatid matürasyonu (Tablo 31.6, Resim 31.6) başarılı olan testiküler örneklerin hasta oranları desteklenmemiş kültür ortamlarında erken yuvarlak spermatidlerin daha düşük farklılaşma potansiyeli olduğunu desteklemektedir ki erken yuvarlak spermatidler FSH aktivasyonuna kontrollerde karşılaştırıldığında erken (Sa1'den Sa2'ye) ve orta (Sa2'den Sb2'ye) spermiyogenezis basamaklarında daha dirençlidir ve testosteron kontrollerle karşılaştırıldığında özellikle term (Sd1'den Sd2'ye) spermiyogenezisi daha fazla stimüle etme kapasitesine sahiptir. Kontrollerle karşılaştırıldığında vakalarda anlamlı farklılıklar bulunmamasına karşın sonuçlar, spermiyogenezis olmayan vakalardan alınan erken yuvarlak spermatidlerin FSH tarafından inhibe edildiklerini veya daha yüksek, farmakolojik konsantrasyonlarda FSH ihtiyacı duyduklarını göstermektedir.

Aynı kültür ortamında kontroller ve vakalar arasında karşılaştırmalar

Aynı kültür ortamında kontroller ile vakaların erken yuvarlak spermatidlerin (Tablo 31.5, Resim 31.7) sayısıyla ilintili olarak spermatid matürasyon ve arrest oranlarına bakarak kontroller (TESE'de Sd2/Sz) ile vakaların (TESE'de DGC/Sa1'ler) karşılaştırılmasında konrollerin Sb2 (p=0.136) ve Sd2 (p=0.158) için anlamlı farklılıklar bulunmamasına karşın Sa2 (p=0.009) ve Sd1'de (p=0.031) anlamlı olarak daha yüksek matürasyon oranlarına ulaştığı CM'de ortaya çıkmıştır. Diğer yandan FSH ile desteklenmiş kültür ortamında Sa1'den Sa2'ye (erken spermiyogenez;p=0.080), Sa2'den Sb2'ye (orta spermiyogenez;p=0.082), Sb2'den Sd1'ye (geç spermiyogenez;p=0.087) veya Sd1'den Sd2'ye (term spermiyogenez;p>1) dönüşümde anlamlı fark bulunmamıştır. FSH+T ile desteklenmiş kültür ortamında kontroller Sb2 (p=0.029) için anlamlı yüksek matürasyona sahipken Sa2 (p=0.145), Sd1 (p=0.833) ve Sd2 (p=0.825) için anlamlı farklılığa sahip değildir. Buna karşın önceki spermiojenik evrelerdeki (tablo 31.5, Resim 31.8) hücreler karşılaştırıldığında CM'de Sd1 ile FSH+T ortamındaki Sb2'nin vakalarda düşmediğini ve FSH+T ortamında Sd2'nin oranlarının arttığı görülmüştür. Vero hücre ile zenginleştirilmiş hücre ortamlarının (HP: %27 Sb2, %10 Sd1, %4 Sd2; OAZ: %31 Sb2, %13 Sd1,%9 Sd2)[40] kullanıldığı önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında günümüzdeki in vitro matürasyon oranlarının daha düşük olduğu ve sadece ortam FSH+T[41] ile desteklendiği zaman benzer veya yüksek seviyelere çıkıldığı gösterilmiştir.

Aynı hasta gruplarında farklı kültür ortamlarının karşılaştırmaları

Değişik kültür ortamlarının (CM, FSH, FSH+T) Sa1 sayısıyla ilişkili olarak karşılaştırılması göstermiştir ki (Tablo 31.5, Resim 31.7) kontrollerde Sa2 ve Sb2'de FSH ve özellikle de FSH+T eklenmiş ortamda ile Sd1 ve Sd2'de FSH+T eklenmiş ortamda anlamlı olarak yüksek matürasyon oranları (p<0.000) vardır. Bu sonuçlar korunmuş spermiyogenezis (kontrol grup) olan örneklerde erken spermiyogenez (Sa1-Sa2: flagella çıkışı) ve orta spermiyogenez (Sa2-Sb2) FSH tarafından stimule edilir ve testosteron tarafından da aktive edilirken, geç spermiyogenez (Sb2-Sd1) ve term spermiyogenez (Sd1-Sd2) FSH tarafından inhibe

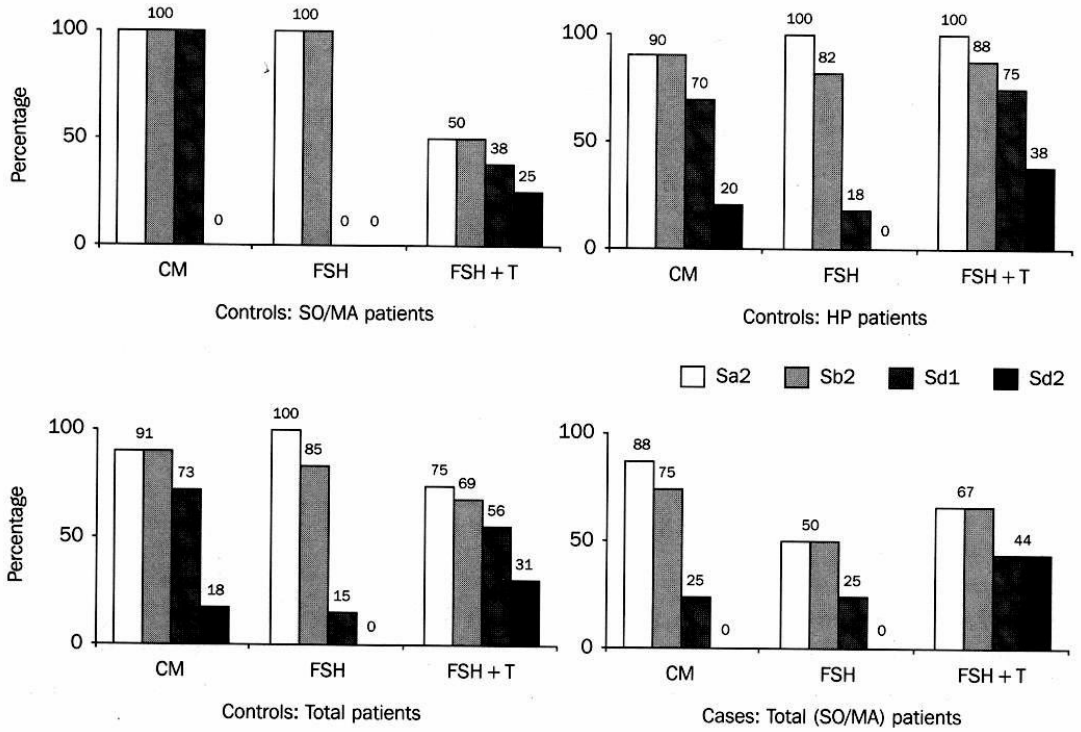
Tablo 31.6: *Kokültürlerde başarılı spermatid matürasyonu olan hastalar (n). Spermatid matürasyon evreleri için Tablo 31.1'e bakınız.*

	Kontroller									**Vakalar**		
	SO/MA			**HP**			**Toplam**			**SO/MA**		
	CM	FSH	FSH+T	CM	FSH	FSH+T	CM	FSH	FSH+T	CM	FSH	FSH+T
Vakalar	1	2	8	10	11	8	11	13	16	8	4	9
Sa2	1	2	4	9	11	8	10	13	12	7	2	6
Sb2	1	2	4	9	9	7	10	11	11	6	2	6
Sd1	1	0	3	7	2	6	8	2	9	2	1	4
Sd2	0	0	2	2	0	3	2	0	5	0	0	4

SO, sadece sertoli hücre sendromu; MA, matürasyon arresti; HP, hipospermatogenezis, CM, hazırlanmış ortam; FSH, follikül stimülan hormon; T, testosteron

edilme eğilimindedir ve testosteron tarafından yüksek oranda stimule edilir; bu da göstermektedir ki FSH ile testosteron erken basamaklarda sinerjistik aktivite gösterirken spermiyogenezin geç evrelerinde antagonistik etki göstermektedir. Vakalarda erken yuvarlak spermatidlerin in vitro matürasyon potansiyeliyle ilişkili olarak FSH varlığında Sa1-Sa2 (p=0.069), Sa2-Sb2 (p=0.199), Sb2-Sd1 (p=0.912) veya Sd1-Sd2/Sz (p>1)geçişlerinde anlamlı herhangi bir fark bulunmadı. Diğer yandan tüm spermatid matürasyon aşamaları FSH+T tarafından anlamlı olarak (p<0.000) stimule edildi. Bu sonuçlar spermiyogenez olmayan testiküler örneklerde erken spermiyogenez (Sa1-Sa2: flagella çıkışı) ve orta spermiyogenez (Sa2-Sb2)'in FSH tarafından stimüle edilme eğiliminde olduğunu ve testosteron tarafından da yüksek oranda aktive edildiğini gösterirken geç spermiyogenez (Sb2-Sd1) ve term spermiyogenez (Sd1-Sd2)'in yüksek oranda testosteron tarafından stimule edildiğini göstermektedir. Bu testosteron etkisi o kadar yüksektir ki FSH+T olan ortamdaki spermiyogenezis ile kontrollerde gözlenen aynı spermiyogenik basamaklara ulaşılabilmektedir ki bu OAZ olan vakalarda dahi böyledir. Kontrol gruplarında veya vakalar dahil olmak üzere FSH ve testosteronun spermiyogenezisin erken basamaklarında sinerjistik, geç basamaklarında ise antagonistik etkili olduğu gösterildiyse bu bulgular ayrıca vakalardaki Sa1'in FSH'a daha dirençli olduğunu ve in vitro spermiyogenezisin daha yüksek düzeyde farmakolojik FSH konsantrasyonlarından fayda görebileceğini de desteklemektedir.

Bir önceki aşamadaki hücrelerin sayısına göre değerlendirme yapıldığında spermatidlerin vitro matürasyonunda karşımıza değişik bir tablo çıkmaktadır (Tablo 31.5, Resim 31.8). Kontrollerde Sa2 FSH tarafından stimule edilmekte ve testosteron tarafından aktive edilmekte; Sb2 FSH tarafından stimüle ediliyor eğiliminde bulunmakla beraber testosteron tarafından yüksek düzeyde stimüle edilmekte; Sd1 FSH tarafından inhibe edilmekte ve parsiyel olarak testosteron tarafından kurtarılmakta; ve son olarak da Sd2 farklılaşması FSH tarafından inhibe ediliyor eğilimde bulunmakla beraber testosteron tarafından yüksek düzeyde stimüle edilmektedir.

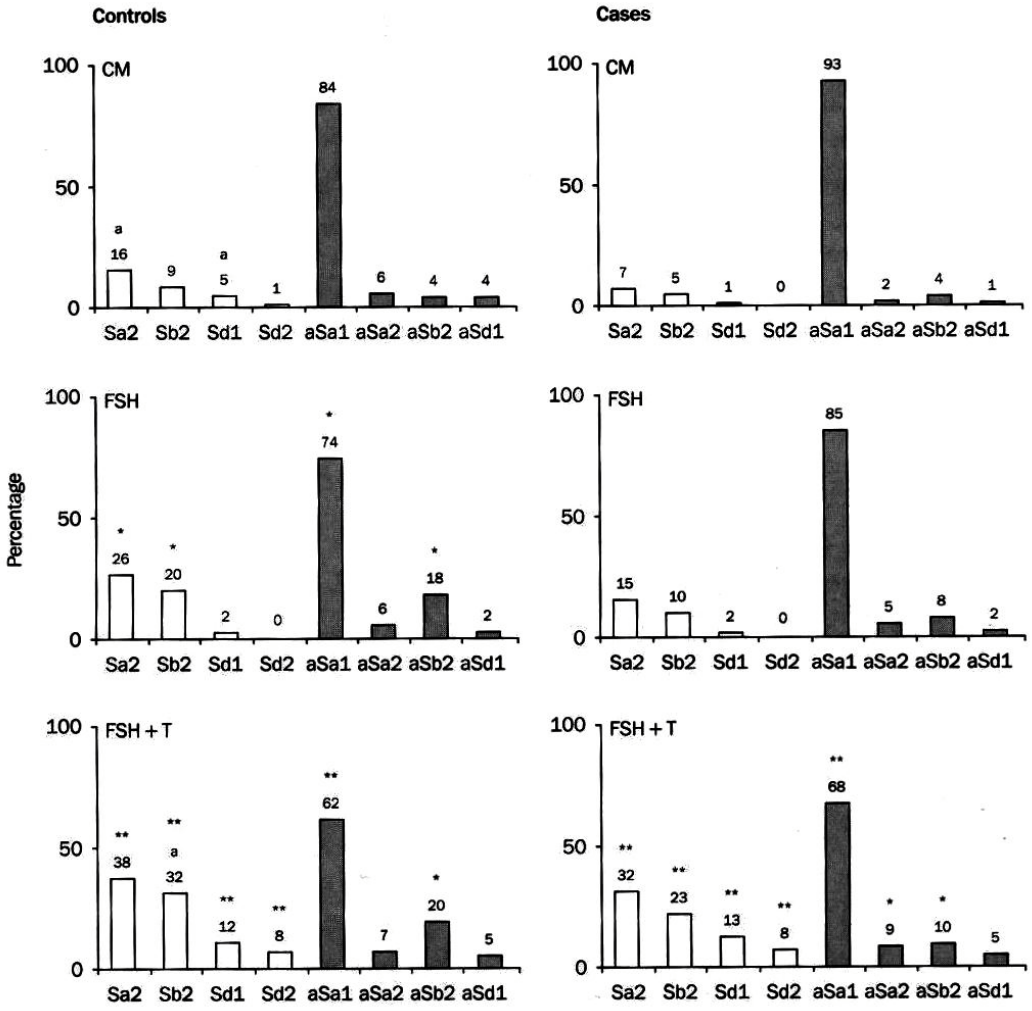


Resim 31.6: *Ko-kültürler.İn vitro şartlarda erken yuvarlak spermatidleri matüre olabilen testiküler örnekleri olan hastaların yüzde dağılımı. SO,Sertoli only cell sendromu; MA,matürasyon arresti; HP, hipospermatogenezis; CM, hazırlanmış ortam; FSH,follikül stimülan hormon; T,testosteron. Matürasyon evreleri için Tablo31.1'e bakınız.*

Bunların aksine vakalarda, Sa1'den Sa2'ye geçişte FSH stimüle ediyor eğilime olmakla beraber testosteron yüksek düzeyde aktive etmekte: Sa2'den Sb2'ye dönüşüm aşaması hormonlar tarafından etkilenmemekte; Sb2'den Sd1'e matürasyon FSH tarafından inhibe ediliyor eğiliminde bulunmakta ve testosteron tarafından stimüle edilmektedir ve Sd1'den Sd2'ye farklılaşma FSH tarafından inhibe ediliyor eğiliminde bulunmakta ve yüksek düzeyde testosteron tarafından stimüle edilmektedir. Böylece veriler FSH'nin kontrollerde ve vakalarda erken spermiyogenezi stimüle ettiğini; kontrollerde orta spermiyogenezi stimüle ederken vakalarda etmediğini ve geç ile term spermiyogenezi hem kontrollerde hem de vakalarda inhibe ettiğini desteklemektedir. Buna ilişkili olarak, testosteronun kontrollerde ve vakalarda erken spermiyogenezde FSH'nin görevini desteklediğini; orta spermiyogenezde sadece kontrollerde FSH'yı desteklediğini ve geç ile özellikle term spermiyogenezi kontrollerde ve vakalarda stimüle ettiği gösterilmiştir[41].

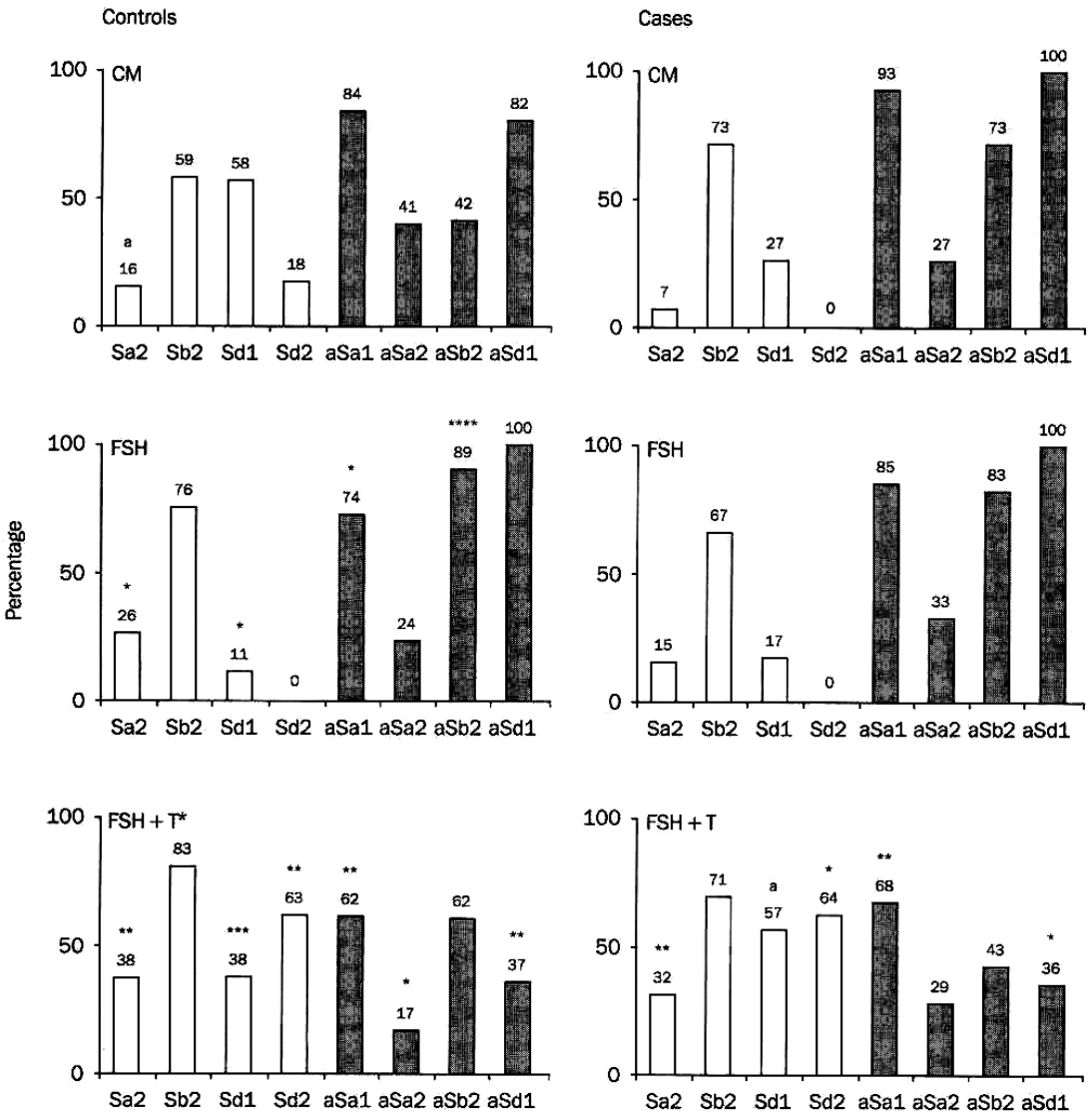
Spermatid arrest oranları daha önceki gözlemlerde doğrulanmıştır (Tablo 31.5, Resim 31.7)[41]. Kontrollerde Sa1'in büyük çoğunluğu arrest (aSa1) hale gelmiştir ancak aSa1 oranları FSH (CM ile karşılaştırıldığında p=0.007) ve FSH+T (CM ile karşılaştırıldığında p=0.000, FSH ile karşılaştırıldığında p=0.002) ile anlamlı olarak azalmıştır. Sa2 evresindeki matürasyon arresti (aSa2) hormonlardan etkilenmemiştir (FSH/CM, p=0.937; FSH+T/CM, p=0.916; FSH+T/FSH, p=0.841). Ancak önceki spermiyojenik evre ile hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında aSa2 oranları FSH ile düşme eğiliminde görünmektedir ve testosteron ile anlamlı olarak düşmektedir (Resim 31.8). Sb2 evresinde arrest (aSb2) oranları her iki hormon desteği altında da anlamlı olarak artmaktadır (FSH/CM, p=0.000 ve FSH+T/CM; FSH+T/FSH, p=0.544) ancak bu etkinin, önceki spermiyojenik evredeki hücre sayısı nazarında karşılaştırıldığında FSH'a bağımlı olduğu görülmektedir (Resim 31.8). Son olarak ortam ile ilişkili olarak Sd1'de arrest oranlarında anamlı olarak bir fark saptanmazken (aSd1: FSH/CM, p=0.167,; FSH+T/CM,p=0.953; FSH+T/FSH, p=0.126) önceki spermatik evrede gösterilen hücre sayıları bakımından karşılaştırıldığında aSd1 oranları testosteron ile anlamlı olarak düşmüştür (Resim 31.8). Vakalarda Sa1'in büyük çoğunluğu arrest hale gelmiştir ki aSa1 oranları FSH ile düşme eğilimindedir ve testosteronla anlamlı olarak düşmektedir (FSH/CM, p=0.069; FSH+T/CM, p=0.000; FSH+T/FSH,p=0.012). Sa2 evresinde matürasyon arresti FSH ile artma eğiliminde olmakla ve testosteronla anlamlı olarak artmakla beraber (FSH/CM, p=0.197; FSH+T/CM, p=0.002; FSH+T/FSH, p=0.307) bu sadece önceki spermatid evresindeki yüksek hücre sayısına bağlıdır (Resim 31.8). Aynı tablo Sb2 evresindeki arrest oranlarında da gözlenmiştir ki (FSH/CM, p=0.164; FSH+T/CM, p=0.022; FSH+T/FSH,p=0.762) gerçekte testosteron aSb2 oranlarını düşürmüştür. Sonuçta FSH ve testosteron Sd1 arrest oranlarını arttırma eğiliminde olmakla beraber (aSd1: FSH/CM, p=0.912; FSH+T/CM, p=0.069; FSH+T/FSH,p=0.309) aSd1 oranları testosteron ile anlamlı olarak azalmıştır (Resim 31.8).

Sonuç olarak izole edilmiş erken yuvarlak spermatidleri kullanıldığı in vitro spermiyogenezisdeki deneysel veriler göstermiştir ki: (1) erken spermiyogenez erken yuvarlak spermatidlerin geç yuvarlak spermatidlere matürasyonu (Sa1'den Sa2'ye flagella çıkması) ile ve orta spermiyogenez de geç yuvarlak spermatidlerin erken uzayan spermatidlere matürasyonu (Sa2'den Sb2'ye) ile karakterizedir ve bunlar kontroller (korunmuş spermiyogenezis) ile vakalarda (spermiyogenez yokluğu), Sa1'den Sa2'ye geçişte vakalarda FSH direnci olmasına karşın, FSH tarafından stimüle edilmekte ve testosteron tarafından desteklenmektedir (2) geç spermiyogenez erken uzayan spermatidlerin erken uzamış spermatidlere dönüşümü (Sb2'den Sd1'e) ve özellikle term spermiyogenez erken uzamış spermatidlerin geç uzamış spermatidlereve spermatozoalara matürasyonu (Sd1'den Sd2/Sz'ye) ile karakterizedir ve bunlar testosteron tarafından yüksek derecede stimüle edilirken FSH tarafından inhibe edilirler.



Resim 31.7: *Ko-kültürler.Başlangıçtaki erken yuvarlak spermatid sayısıyla ilişkili olarak spermatid matürasyon ve arrestinin yüzde dağılımı.Aynı kültür ortamında kontrol grubuyla hasta grubu arasına anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Aynı hasta grubunda CM ile CM/FSH karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. CM, hazırlanmış ortam; FSH, follikül stimülan hormon; T,testosteron. Matürasyon evreleri için Tablo31.1'e bakınız.*

Vero hücre ile zenginleştirilmiş kültür ortamıyla[40] ile karşılaştırıldığında bütün aşamalarda ki spermatid arrest oranları FSH+T destekli ortamda azalmıştır ki OAZ vakaları ile aynı tabloyu göstermektedir. Böylece bu sonuçlar spermiyogenezdeki en kritik öneme sahip basamakların Sa1'den Sa2'ye geçişte flagella çıkması ile spermiyogenezin final matürasyon basamağı olan nükleer uzama ve konsantrasyonun gerçekleştiği Sd1'den Sd2/Sz'ye dönüşüm basamağı olduğunu desteklemektedir. Bu daha ileri düzeyde kontrollerdeki tüm aSa1'lerden CM'de %62, FSH'da %46 ve FSH+T'da %23 oranında aSa1 olarak kalırken (vakalar: %78 CM'de, %66 FSH'da ve %29 FSH+T'da) CM'de %22, FSH'da %28 ve FSH+T'da %39 (vakalar: %15 CM'de, %19 FSH'da ve %39 FSH+T'da) oranında sitoplazma uzaması ve nükleer birikim ve uzama olması (Sb1) gerçeği ile doğrulanmıştır (Tablo 31.5). Bu bilgiler de flagella çıkışı yokluğunda dahi hormonların her ikisinin de sitoplazma uzaması ile nükleer birikim ve uzamayı aktive ettiğini desteklemektedir. Bununla birlikte FSH+T varlığında bile eken yuvarlak spermatidlerin geç uzamış spermatidlere/spermatozoalara in vitro matürasyonu hala düşük oranlardadır (%8). Bu da muhtemelen kültür ortamındaki yetersizliklerin geç spermiyogenez (Sb2-Sd1:aSb2 %43-62) ve term spermiyogenezin (Sd1-Sd2/Sz: aSd1 %36-37) de etkilemesine rağmen asıl olarak erken spermiyogenezin (Sa1-Sa2: aSa1 %62-68) etkin olarak gerçekleşmesine izin verememesine bağlanabilir.



Resim 31.8: *Ko-kültürler.Önceki spermiyogenik evreden bulunan mevcut spermatidlerin sayısıyla ilişkili olarak spermatid matürasyon ve arrestlerinin yüzde dağılımı. Aynı kültür ortamında kontroller ile vakalar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Aynı hasta grubu karşılaştırıldığında CM (*), CM/FSH (**), FSH (***) veya CM/FSH+T (****) arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. CM, hazırlanmış ortam; FSH, follikül stimülan hormon; T,testosteron. Matürasyon evreleri için Tablo31.1'e bakınız.*

Mikroenjeksiyon sonuçları

Aşırı sayıda bağışlanmış oositlere sahip olunduğundan bu yana in vitro ortamda farklılaştırılmış spermatidlerin gelişimsel potansiyelini değerlendirebilmek amacıyla deneysel mikroenjeksiyonlar yapılmaktadır (Tablo 31.7)[41]. Morfolojik olarak normal spermatidlerin mikroenjeksiyonundan sonra normal fertilizasyon oranları (2PN2PB:iki pronükleus ve iki polar cisimcik) çok düşük seviyelerde (Sa1/Sa2 %0; Sb2/Sd1 %6) olurken oositlerin çoğu fertilize olmamakta (Sa1/Sa2 %63; Sb2/Sd1 %67) veya unipronükleer zigot (Sa1/Sa2 %38; Sb2/Sd1 %25) oluşturmaktadır. Diğer yanda embriyo yarılması (%93-100), yüksek kalitede embriyo (%78-93) ve morula oluşumu (%22-46) oranları normale yakındır. Embriyoların 12/23'de (%52) ve mikroenjeksiyonu yapılan Sa1/Sa2'nin 7/9'una (%78) ile Sb2/Sd1'nin 5/14'üne (%36) FISH analizi uygulanmıştır. Sa1/Sa2 olan vakalarda tüm yedi embriyo da 1PN2PB zigotundandır. Sitogenetik veriler göstermiştir ki embriyoların 6/7'si (%86) mozaik anöploid (blastomerlerin çoğu anöploiddir) iken 1/7'si (%14) mozaik öploid (blastomerlerin

%64'ü anöploid ve %36'sı öploiddir) yapıdadır. Analiz edilen iki morulada da 1/2 (%50) oranında vaka mozaik öploiddi. Sb2/Sd12 vakasında beş tane embriyo analiz edildi. Bir embriyo 2PN2PB zigotundan köken almaktaydı ancak FISH analizine göre o da haploiddi. 1PN2PB'den köken alan 4 embriyodan 2 tanesi mozaik anöploid veya kaotik iken diğer iki morula öplodi mosaizmine sahipti (%79 öploid ve %21 anöploid; %69 öploid ve %31 anöploid).Buna göre Sb2/Sd1 olan embriyoların 2/5'i (%40) öploiddir (morula). Bu sonuçlar desteklemektedir ki (1) in vitro matüre edilmiş spermatidlerden köken alan unipronükleer zigotların yaklaşık tamamı diploiddir, (2) in vitro matüre edilmiş yuvarlak spermatidler embriyoların sadece %14'nün öploid olması ile düşük fertilizasyon ve embriyo geliştirici potansiyel oranları vermektedirler ve (3) in viro matüre olmuş uzayan ve uzamış spermatidler normal (%40) oranlarda öploid embriyo geliştirme oranları verirken düşük fertilizasyon oranları göstermektedirler.

Geliştirici potansiyellerinin değerlendirilebilmesi için anormal matüre olmuş spermatidler de mikroenjekte edilmişlerdir (Tablo 31.7)[41]. Flagellası olmayan uzayan spermatidler (Sb1) yüksek nonfertilizasyon oranları (%92) vermişlerdir, ancak 2PN2PB zigotların %8'ini indükleyebilmişlerdir. Bunlar morula evresine ulaşamamasına ve FISH analizi bir tanesinin haploid diğerinin de mozaik anöploid olduğunu göstermesine rağman normal olarak yarılmışladır. Nükleusun normalliği hakkında emin olamasak da normal flagellanın olmayışının bir şekilde bozulmuş erkek sentrozomuna bağlı olarak normal fertilizasyon ve embriyo gelişimine zarar verdiği kesin olmayan bir bilgidir. Anormal baş yapısına sahip geç uzamış evresine ulaşmış spermatidin geliştirici potansiyeli de çalışılmıştır. Bu deneyler çok önemlidir, çünkü in vitro spermiyogenezisin son basamağı en kötü sonuçlara sahip olan ve en çok hücrenin yapısal defektlere sahip olduğu basamaktır. Morfolojik olarak normal Sb2/Sd1 ile sağlanana benzer olsa da eşlik eden düşük 1PN2PB zigot (%18) ve 2PN2PB zigot (%9) oranları ile non fertiliasyon oranları (%73) çok yüksektir. Normal uzayan/uzamış spermatidlerle karşılaştırıldığında embriyo yarılma oranları (%100) benzerdir; yüksek kalitede embriyo oranları (%33) daha azdır ve morula elde edilememiştir. 2PN2PB zigotundan elde edilen tek bir embriyonun FISH analizi kaotik kromozom bileşimine sahip olduğunu açığa çıkarmıştır. Bu sonuçlar belirgin olarak hayal kırıcıdır ve açıkça göstermektedir ki, in vitro kültür ortamı hala uygun yuvarlak spermatidin spermiyogenezisn son basamağına kadar matürasyonuna olanak verecek kadar iyi bir ortam sağlayamamaktadır.

Tablo 31.7: *Kokültürlerde matürasyon sonrası spermatid mikroenjeksiyonu sonuçları (n (%))*

	Sa1	Sa2	Sa1+Sa2	Sb2+Sd1	Sb1	abnSd2
Vakalar	6	2	8	8	9	5
Enjekte edilen MII	23	3	26	50	27	14
Dejenere olan	2 (9)	0	2 (8)	2 (4)	3 (11)	3 (31)
Sağlam	21	3	24	48	24	11
Fertilize olmayan (OPN1PB)	15 (71)	0	15 (63)	32 (67)	22 (92)	8 (73)
Aktive olan (OPN2PB)	0	0	0	1 (2)	0	0
Anormal fertilizasyon (1PN2PB)	6 (29)	3 (100)	9 (38)	12 (25)	0	2 (18)
Normal fertilizasyon (2PN2PB)	0	0	0	3 (6)	2 (8)	1 (9)
Embriyo yarılması	6 (100)	3 (100)	9 (100)	14 (93)	2 (100)	3 (100)
Derece A/B Embriyolar	4 (67)	3 (100)	7 (78)	13 (93)	2 (100)	1 (33)
Morula	1 (17)	1 (33)	2 (22)	6 (46)	0	0

Sa1, erken yuvarlak spermatidler; Sa2, geç yuvarlak spermatidler (flagellalı); Sb2, erken uzayan spermatidler; Sd1, erken uzamış spermatidler; Sb1, anormal matüre olmuş erken uzayan spermatidler (flagellasız); abnSd2, anormal baş morfolojisi ile beraber geç uzamış spermatidler; MII; mayoz II (matür)oositler; PN, pronükleus; PB, polar cisimcikler

Yöntemsel problemler

İzole edilmiş yuvarlak spermatidlerle yapılan deneyler henüz optimize edilmiş kültür ortamının sağlanamadığını göstermiştir[39-41]. Hatta in vitro şartlarda bir çok vakada tam bir spermiyogeneze ulaşılamaması bu gelişimin hala tam olarak üreme sağlayamadığı ve kişisel olarak hastadan hastaya değişkenlik gösterdiğini desteklemektedir. Spermatogenezisin korunmuş olduğu vakalardan izole edilen erken yuvarlak spermatidlerin uzamış spermatidlere farklılaşmasının eksikliği in vitro kültür ortamında hala aydınlatılamamış ciddi bozukluklara işaret etmektedir. Muhtemel nedenler arasında seminiferöz tübül epitelyumunu destekleyici doku hücrelerinden salınan özel faktörlerin ihtiyacı, bazal lamina kaybı, hücre ayrışması esnasında hücre bağlantılarının yırtılması, in vivo şartlarda sertoli hücreler ile sağlanan apikal ve bazal sistemlerinin içine doğru kompartman oluşumunun kaybı ve kültür ortamının yenilenememesi sayılabilir.

Büyüme faktörleri ve hormonları

Spermiyogenez üzerinde FSH'ın antiapopitotik fonksiyonu ve FSH inhibe edici etkisi aynı testosteronun antiapopitotik fonksiyonu ve testosteron aktive edici etkisi gibi hayvan deneylerinden dolayı zaten bilinmektedir[28,32,33,38,59,60]. Organ kültüründe ve serum ve testosteron eksikliği durumunda insan seminiferöz tübüllerinde apopitoz oranları artmış gibi görünmektedir[61,62]; ek olarak FSH bulunması durumunda spermatogonya uyarılmasının artması ile beraber spermatosit sayısı, mayoz oranı sayısı ve yuvarlak spermatid sayısı artmıştır[59]. Benzer şekilde sertoli hücrelerini ve germ hücrelerinin tüm tiplerini içeren testiküler doku süspansiyonları ile gerçekleştirilen deneylerde; testosteronun sertoli hücre apopitozisini inhibe ettiği, FSH spermatid farklılaşmasını inhibe ettiği halde FSH'ın premayotik germ hücreleri üzerindeki aktive edici etkisini ve spermiyogenezi stimüle edici etkisini potansiyalize ettiği gösterilmiştir[63-70]. FSH ve testosteron spermiyogenezdeki bu antagonistik etkileri daha ayrıntılı olarak sonraki deneylerde araştırılmıştır. FSH'nın erken (erken yuvarlak spermatidlerin geç yuvarlak spermatidlere dönüşümünde) ile orta dönem (geç yuvarlak spermatidlerin erken uzayan spermatidlere dönüşümünde) spemiyogenezi stimüle ettiği ve geç (uzayan spermatidlerin uzamış spermatidlere dönüşümünde) ile özellikle term (erken uzamış spermatidlerin geç uzamış spermatidlere/spermatozolara dönüşümünde) spermiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Diğer yandan testosteronun erken ile orta spermiyogenezis aşamalarında FSH'nın etkilerini potansiyalize ettiği ve son spermiyogenik matürasyon basamaklarını stimüle ettiği gösterilmiştir[41].

İn vitro kültür ortamındaki daha yeni gelişmelere göre deneyler göstermiştir ki apaopitoz oranlarını düşürmek ve in vitro matüre olmuş spermatidlerin genetik potansiyelini arttırmak için kültür ortamlarına bir çok insan spesifik büyüme hormonları eklenebilir. Deneysel sonuçlar ayrıca desteklemektedir ki sıralı ortam kullanılarak kültür ortamı geliştirilebilir. Bu yüzden kültürün ilk 2-4 gününde erken yuvarlak spermatidlerin geç yuvarlak spermatidlere matürasyonunu arttırabilmek için kültür ortamında yüksek farmakolojik doz FSH (500U/l) ve düşük doz testosteron (1µmol/l) konsatrasyonu konulmalı ve daha sonra uzayan ve uzamış spermatidlerin matürasyonu için düşük doz FSH ile yüksek doz testosteron (10µmol/l) kullanılmalıdır. Bu özellikle erken yuvarlak spermatidleri FSH etkisine yüksek derecede duyarlı olan orijinal testis biopsisinde spermiyogenez olmayan klinik vakalar için doğrudur. Bu mantıkla izole sertoli hücreleri ve germ hücrelerini içeren örneklerde hücre duyarsızlığı olmayan veya anormal FSH reseptörlerine bağlı olabileceği için FSH gen mutasyonlarını, mRNA transkripsiyonunu ve protein translasyonunu çalışmak değerli sonuçlar verebilir[41,71].

Sertoli hücre-germ hücre ilişkileri

Hücre ilişkileri apopitozisi inhibe etmek için, spermatogoniyanın proliferasyonunu indüklemek için, germ hücre salınımı için ve seks kromozomları tarafından kodlanana mRNA'lar gibi gen ürünlerini paylaşmak için gereklidir[5,7,8,11,72]. Hücre bağlantıları ve interselüler köprüler FSH ile testosteron, bir çok büyüme faktörü ve yüksek yoğunluklardaki hücrelerin varlığına bağlıdır. Dahası testosteron tarafından potansiyalize edilen FSH, sertoli hücrelerini yuvarlak spermatidleri bağlamak için yetkili kılar[11,38]. İn vitro şartlarda kokültürlerde sertoli hücreler ile diploid germ hücreler arasındaki bağlantılar parsiyel olarak geri kazanılabilse de FSH ve testosteron varlığına rağmen sertoli hücreler ile yuvarlak spermatidler arasındaki bağlantı eksik kalmaktadır.[71] Bu bilgi bize yukarıda anlatılan deneylerde yuvarlak spermatidlerin çoğunun ve farklılaşmış uzayan ile

uzamış spermatidlerin kuyruklarının eksik olduğunu, kısa kuyruğa sahip olduklarını veya anormal baş konfigürasyonuna sahip olduklarını açıklayabilir[39,41].

Parakrin faktörler, hücre dansiteleri ve ortamın yenilenmesi

Her ne kadar çözündürülmüş ve izole edilmiş hücrelerle yürütülen araştırmalar testiküler doku örneklerinde[39-41] uzayan veya uzamış olan spermatidleri bulundurmadıklarını temin etse de bu tür bir kültür sisteminde spesifik parakrin faktörlerin (germ hücre devamlılığı ve farklılaşması için kritik zamanlarda FSH ve testosteron etkisi altında büyüme faktörlerini salgılayan sertoli hücrelerinin bulunması eksikliği minimalize edebilir), kültür ortamının yenilenememesi (bireysel hücre çalışmaları mikro damlalara ihtiyaç duymaktadır) ve yüksek hücre yoğunluklarının (hücre izolasyonu için uzun süreli manüplasyon methodunun uygulanmasındaki zorluklar nedeniyle) olmaması gibi eksiklikler sınırlayıcı faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu problemin üstesinden gelmek ve yüksek saflık ile konsantrasyon düzeyi elde edebilmek için sertoli hücrelerini, diploid germ hücrelerini ve erken yuvarlak spermatidleri saflaştırmak için yeni yöntemler geliştirilmelidir[71].

Kromozomal sapmalar

Korunmuş spermiyogenez olan ve normal karyotipe sahip olan obstrüktif azospermili hastalarda geç spermatid/spermatozoa anöploidi oranları normal iken bozulmuş spermiyogenez olan vakalarda bu oranlar yükselmiş olarak görünmektedir[73,76]. Anormal karyotipe sahip vakalarda mayotik arrest homolog çiftlenme ve ayırma hatalarına bağlı sıklıkla görülmesine karşın spermatidler mayotik bloktan kaçarak seleksiyonun pozitif mekanizması sayesinde normal kromozomal bileşime sahip olabilmektedirler[77,78]. Bozuk in vitro spermiyogeneziste anormal sinapsis ve kromozomal ayrılma muhtemel anahtar belirleyicilerdir[5,11,62]. Yine de deneysel veriler sekretuar azospermili olgularda erken yuvarlak spermatidlerin artmış kromozomal sapma oranlarına etkilerinin olmadığını ve in vitro ortamda spermatid gelişiminin anöploidi ile ilişkili olmadığını[71] desteklemektedir ki bu bilgi in vitro ortamda farklılaştırılmış spermatidlerle yapılan mikroenjeksiyon deneylerinde morulanın %40'nın öploid olmasıyla da doğrulanmıştır[41].

Apopitozis ve metilasyon hataları

Apopitozis germ hücre sayısını sertoli hücre sayısına adapte ederek normal spermiyogenezisin gerçekleşmesinde anahtar bir rol oynar[79]. Bu mekanizmada sertoli hücreleri başlangıç prokaspazları olan -2, -8 ve -10'u tetikleyecek olan Fas reseptör (FasR) üzerine bağlanacak olan Fas ligandı (FasL) sekrete eder[80,81]. Germ hücreler ayrıca mitokondri hasarı ve başlangıç prokaspaz -9'u aktifleyen endojen kaynaklı bir stimulus ile de apopitozise girerler. Ekstrinsik ve intrinsik apopitotik yolaklar birlikte daha sonra DNA parçalanması ve hücre ölümünü aktifleyecek olan ortak prokaspaz -3,-6 ve -7 yolaklarında ortak olarak sonlanırlar[82,83]. Kaspazların işlevi öncelikli germ hücre evre hedeflerini belirleyen hem proapopitotik (Bax) hem de antiapopitotik (Bcl-2) ürünleri içeren bir çok Bcl-2 gen ürünleri tarafından düzenleniyor gibi görünmektedir. Bax, spermatogoniya ve preleptoten spermatositler tarafından sınırlanıyor gibi görünen ve yetişkin yaşlarda premayotik germ hücrelerinin normal dejenerasyonundan sorumlu olan bir moleküldür. Buna karşın Bcl-2 ve Bcl-xL, Bax'ın görevini antagonize etmektedir. Aynısı spermato-goniyayı aktive eden Bcl-w ile de meydana gelmektedir[11,62].

Hayvanlarda in vivo ortamda premayotik germ hücrelerdeki apopitozunun klasik işaretleri tanımlanmışsa da sertoli hücrelerindeki tanımlanmamıştır ki her iki hücre tipi de in vitro kültür ortamında dejenerasyon kanıtı göstermektedir[6,84]. İnsanlarda patoloji durumunda veya in vitro kültürlerde spesifik büyüme faktörlerinin, hormonların ve besleyicilerin eksikliği ayrıca FasL-FasR sistemini aktive etmekte, Bax'ı olumlu düzenlemekte ve Bcl-2 seviyelerini düşürmektedir ki bunların tümü germ hücre apopitozisini tetiklemektedir[78,85-87]. İn vivo şartlarda kemiricilerin seminiferöz tübülleri içine apopitotik hücrelerin enjeksiyonu sonrası[88] ve in vitro kokültürlerde[71,78] daha önce gösterilmiş olduğu üzere sertoli hücrelerin fagositozu apopitotik germ hücrelerin temizlenmesinden sorumludur.

Artmış seviyelerde apopitozis gösteren azospermik hastalarda spermatid nükleuslarında ve spermde DNA parçalanması bulunduğu halde annexin-V etiketi yuvarlak spermatidde negatif iken ama spermde pozitif bulunmuştur[65,67,70,87]. Uzamış spermatidlerde ve spermde kaspazların etkisiz olarak kabul edilmesine karşın[11,62] diğer sonuçlar kaspaz-3 aktivitesinin mevcut ejakülat sperminin orta kısmında kantitatif olarak azalmış sperm hareketliliği ve teratozoospermi ile ilişkili olduğu göste-

rilmiştir[89]. İzole edilmiş germ hücreleri kullanan deneysel çalışmalar in vitro kokültürlerin germ hücre apopitozisi ile sınırlandığını desteklemektedir[39-41,71]. Hatta nükleusta premayotik germ hücrelerinin sadece apopitozisin klasik morfolojik işaretlerini göstermediğini bunun yanında kaspaz-3 aktivitesini de gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde in vitro oluşturulmuş gelişim arresti veya anormal matürasyon olan spermatidler sitoplazmada, nükleusta, akrozomda ve/veya ortaparçada kaspaz-3 benzeri aktivite göstermektedir. Bu çalışmalarda FasR, kaspaz-8,-9 ve -3, Bcl-2 ve Bax'ın tüm germ hücre basamaklarında salındığı gösterilmiştir[71].

Çalışmalar ayrıca fare testis spermatidlerinin in vitro kültürlerinde anormal DNA metilasyonu ve anormal kromatin yeniden yapılanması olduğunu göstermişlerdir[11,62]. Ciddi oligozoospermi tanımlanmış olan erkek hastaların germ hizalarında genomik yazılım hatalarından dolayı azopermik hastalardan alınan spermatidlerin geçici ciddi metilasyon bozukluk riski taşıyabileceği düşünülmektedir[90]. Y kromozom delesyonu gösteren[91-93], CFTR (kistik fibrozis transmembran iletim düzenleyici geni)[94,95] ve kromozomal sapmalar[77,78] gösteren testiküler örneklerden alınan spermatidlerin de düşük in vitro spermiyogenik potansiyel gösterdiği gözlenmiştir[40,78].

Yine de gelişimsel arrest olmuş hücreler normal olarak matüre olma kabiliyeti gösteremeyeceği için ve anormal spermatid matürasyonu olduğunun tanısı kolayca konulabilse de normal morfolojiye sahip canlı ve normal genetik bileşime sahip in vitro farklılaştırılmış spermatidlerin gelişimi mümkündür[39-41]. Bu ayrıca fare yuvarlak spermatidleri oluşumu üzerine kurulan çalışmalarda gösterilmiş olduğu üzere genomik yazılımı desteklemektedir[96]. Bu yüzden geç uzamış spermatidlere ve sperme normal morfolojiyle matüre olmuş germ hücreler fetal anomalisiz normal canlı gebeliklerle sonuçlanmış normal genetik bileşime sahip gametleri yansıtmaktadırlar ki bunlar testiküler biopsilerdeki tam normal morfolojiye sahip haploid gametlerin seçimiyle sağlanmıştır[44,47,48,97,98].

KLİNİK ÇALIŞMALAR

Yeterli in vitro kültür sistemlerinde in vitro spermiyogenezi sonuna kadar sürdürmeyi amaçlayan deneysel çabalar 21 Mayıs 2000'de 37 haftalık gestasyon süresinin sonunda sezaryen ile doğan normal sağlıklı erkek bebekler (2.8kg, 3kg) ile sonuçlanmıştır. Bu özel vakada sekretuar arrestli erkek hasta normal karyotipe sahipti ve testis biopsisinde matürasyon arresti göstermekteydi. TESE'de korunmuş spermiyogeneze sahip tek bir odak bulunabilmesine karşın ayrıntılı araştırmalara rağmen sadece morfolojik olarak anormal geç uzamış spermatidler bulunabildi. Bu gametler kullanılarak mikroenjeksiyon yapıldı ancak kullanılabilir 5 adet MII oositten gebelik hedefi olmadan sadece 1 tane 1.derece embriyo elde edildi ve transfer edildi. Oosit toplanmasından 5 gün önce olmak üzere 6 ay sonraya 2.TESE denemesi planlandı. Normal morfolojiye sahip erken uzayan spermatidler izole edildi ve vero hücreden zenginleştirilmiş ortama mikro damlalar halinde transfer edildi. Kültürdeki 4-5gün sonrasında bunlardan 3 tanesi normal morfolojiye sahip geç uzamış spermatid haline geldi. Mümkün olan 9 MII oositten 3 tanesine in vitro şartlarda matüre edilmiş gametler ve 6 tanesine de orijinal testis dokusundan alınan anormal uzamış spermatidler mikroenjeksiyonla konuldu. Transfer edilenlerden sadece ilk 3 oosit fertilize oldu ve normal olarak yarılma gerçekleşti (4B, 6B ve 4C). Devam eden gebelik süreci komplikasyonsuz olarak normal gelişti ve şu an 5 yaşında olan her iki çocuk da fiziksel veya psikolojik (kişisel iletişim) olarak sağlıklı olarak değerlendirilmektedir.

Benzer bir vaka da Kasım 2000'de yayınlanmıştır ve bu vakada da TESE'de sadece anormal uzamış spermatidler bulunmuş olup mikroenjeksiyonlarında düşük fertilizasyon oranına ulaşılmıştır ve gebelik gelişmemiştir. İkinci TESE denemesinde otörler tüm testiküler süspansiyonları 1-2 gün kültüre etmişlerdir ve sonra normal morfolojiye sahip geç uzamış spermatidleri enjekte etmişlerdir. Sağlıklı ikizlerin doğumu ile sonuçlanan gebeliğe ulaşılmıştır[66]. Sadece diploid germ hücreye veya tam spermiyogenez varlığında anormal uzamış spermatidlere sahip vakalarla aynı otörler 7 tane daha sağlıklı doğmuş bebeğe ulaşmışlardır[68,99]. Bu vakalarda kati bir hücre kaderi, normal spermatidler doku içinde saklanabildiği için tanımlanamamıştır. Ek olarak mayoz ve spermiyogenezise ulaşmak için geçmesi gereken 1 ayı aşkın süre ve geç pakiten veya sekonder spermatosit evresinden geç uzamış spermatidlere olgunlaşmak için geçmesi gereken 16 gün ile karşılaştırıldığında çok kısa olan kültür süreci (1-2gün) yüksek derecede zıtlık oluşturmaktadır[55,56,100]. Neticede in vitro kültür ortamı olmadan erken uzamış spermatidler klinik tedaviler için güvenle kullanılabilirler ki bu haploid hücreler kullanılarak da normal fertilizasyon, embriyo yarılması ve gebelik oranlarına ulaşılabilir[44,47,53].

Sonuç olarak testiküler biopside spermatozoa/ uzamış spermatidleri olmayan hastalarda yüksek ihtimalle uzayan spermatidler de bulunmayacaktır. O yüzden bu hastalarda yuvarlak spermatidler çok dikkatli bir şekilde araştırılmalıdır. Eğer bunlar bulunur ise yüksek ihtimalle ciddi mayotik arreste sahip olmayan ve bu yüzden de eşlik eden veya etmeyen yapay oosit aktivasyonu olan tedaviler için güvenle kullanılabilecek olan haploid germ hücrelere ulaşılabilecektir[48]. Bunlara karşın yine de tüm deneysel tedavi sikluslarında implantasyon öncesi genetik tanı, prenatal tanı ve çocuk takibi çok kesin olarak uygulanmalıdır. Bunlara alternatif olarak ve yüksek derecede başarısız fertilizasyon ve embriyo yarılma oranlarına bağlı olarak yuvarlak spermatidler sentetik serum içeriği, hormonlar ve büyüme faktörleri ile desteklenmiş kültür ortamlarında kültüre edilmelidirler ve eğer normal morfolojide spermatidlere matüre olursalar ardından klinik tedaviler için kullanılabilirler[48,71].

KAYNAKLAR

1. Miura T, et al. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. Development 2002; 129: 2689
2. Russell LD, Alger LE, Nequin LG. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. Endocrinology 1987; 120: 1615
3. Hilscher W. Review. The genetic control and germ cell kinetics of the female and male germ line in mammals including man. Hum Reprod 1991; 6: 1416
4. Spiteri-Grech J, Nieschiag £. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis - a review. J Reprod Fertil 1993; 98: 1
5. Kierszenbaum AL. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. Endocr Rev 1 994; 15: 116
6. Dirami G, et al. Evidence that basement membrane prevents apoptosis of Sertoli cells in vitro in the absence of known regulators of Sertoli cell function. Endocrinology 1995; 136: 4439
7. Gnessi L, Fabbri A, Spera G. Gonadal pcptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. Endocr Rev 1997; 18: 541
8. Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. Eur J Endocrinol 1997; 1*37'*107
9. Bellve AR. The male germ cell; origin, migration, proliferation and differentiation. Cell Dev Biol 1999; 9: 379
10. De Rooij DG. Stem cell review. Stem cells in the restis. Int J Exp Pathol 1998; 79: 67
11. De Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction 2001; 121:247
12. Setchell BP. The Parkes Lecture. Heat and the testis. J Reprod Fertil 1998; 114: 179
13. Zirkin BR. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. Cell Dev Biol 1998; 9: 417
14. Lunenfeld E, Zeyse D, Huleihel M. Cytokines in the testis, human sperm cells, and semen. Assist Reprod 1999; 9: 157
15. Weinbauer GF, Wessels J. Review. Paracrine control of spermatogenesis. Andrologia 1999; 31: 249
16. Gazvani MR, et al. Role of mitotic control in spermatogenesis. Fertil Steril 2000; 74: 251
17. Sutton KA. Molecular mechanims involved in the differentiation of spermatogenic stem cells. Rev Reprod 2000; 5: 93
18. O'Donnell L, et al. Estrogen and spermatogenesis. Endocr Rev 2001; 22: 289
19. Kleene KG. Review. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. Mech Dev 2001; 106: 3
20. Kleene KG. Review. Sexual selection, genetic conflict, selfish genes, and the atypical patterns of gene expression in spermatogenic cells. Dev Biol 2005; 277:16

21. Sofikitis N, et al. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. Hum Reprod Update 2005; 11:229
22. Steinberger A, Steinberger E, Perloff W. Mammalian testes in organ culture. Exp Cell Res 1964; 36: 19
23. Parvinen M, et al. Spermatogenesis in vitro: completion of meiosis and early spermiogencsis. Endocrinology 1983; 112: 1150
24. Toppari J, Parvinen M. In vitro differentiation of rat seminiferous tubular segments from defined stages of the epithelial cycle morphologic and immunolocalization analysis. J Androl 1985; 6: 334
25. Rassoulzadegan M, et al. Transmeiotic differentiation of male germ cells in culture. Cell 1993; 75: 997
26. Staub C, et al. The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. Exp Cell Res 2000; 260: 85
27. Marh J, et al. Mouse round spermatids developed in vitro from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into in vivo developed mature oocytes. Biol Rcprod 2003; 69: 169
28. Hikim APS, Swerdloff RS. Temporal and stage-specific effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis In gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated rat. Endocrinology 1995; 136: 253
29. Sairam MR, Krishnamurdiy H. The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models. Arch Med Res 2001; 32: 601
30. McLachlan RI, et al. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. Endrocrinology 1995; 136: 4035
31. Zhang F-P, et al. The low gonadotropin-independ-ent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 13692
32. Mclachlan Rl, et al. Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. Biol Reprod 1994; 51: 945
33. Huang HFS, et al. Restoration of spermatogenesis by high levels of testosterone in hypophysectomized rats after long-term regression. Acta Endocrinol 1987; 116:433
34. Sun Y-T, et al. The effects of exogenously administered testosterone on spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats. Endocrinology 1989; 125: 1000
35. Sun Y-T, et al. Quantitative cytological studies of spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats: identification of androgen-dependent stages. Endocrinology 1990; 127: 1215
36. Awoniyi CA, et al. Exogenously administered testosterone maintains spermatogenesis quantitatively in adult rats actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. Endocrinology 1992; 130:3283
37. O'Donnell L, et al. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VTI and VIII of the rat spermatogenic cycle. Endocrinology 1994; 135:2608
38. O'Donnell L, et al. Testosterone withdrawal promotes stage specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. Biol Reprod 1996; 55: 895
39. Cremades N, et al. In-vitro maturation of round spermatids using coculture on Vero cells. Hum Reprod 1999; 14: 1287
40. Cremades N, et al. Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. Hum Reprod 2001; 16: 1938
41. Sousa M, et al. Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. Hum Reprod 2002; 17: 161
42. Sousa M, Barros A, Tesarik K. Human oocyte activation after intracytoplasmic injection of leucocytes, spermatocytes and round spermatids: comparison of calcium responses. Mol Hum Reprod 1996; 2: 853
43. Sousa M, Barros A, Tesarik J. Current problems with spermatid conception. Hum Reprod 1998; 13: 255
44. Sousa M, et al. Clinical efficacy of spermatid conception. Analysis using a new spermatid classification scheme. Hum Reprod 1999; 14: 1279
45. Sousa M, Barros A, El Shafie M. Failed fertilization in vitro: principles and evaluation of transmission electron microscopic images. In El Shafie M, et al., eds. Ultrastructure of Human Oocytes. New York: Parthenon Publishing, 2000: 65
46. Sousa M, Fernandes S, Barros A. Prognostic factors for successful testicle spermatid retrieval. Mol Cell Endocrinol 2000; 166: 37
47. Sousa M, et al. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. Hum Reprod 2002; 17: 1800
48. Sousa M, et al. Spermatid injection and beyond. In GurganT, Demirol A, eds. 13th World Congress on In Vitro Fertilization: Assisted Reproduction & Genetics. Bologna: Medimond, 2005: 83
49. Nakamura M, Romrell LJ, Hall PR The effects of temperature and glucose on protein biosynthesis by immature (round) spermatids from rat testes. J Cell Biol 1978; 79: 3
50. Aslam I, Fishel S. Short-term in-vitro culture and cryopreservation of spermatogenetic cells used for human in-vitro conception. Hum Reprod 1998; 13: 634
51. Aslam I, Fishel S. Evaluation of the fertilization potential of freshly isolated, in vitro cultured and cryopreserved human spermatids by injection into hamster oocytes. Hum Reprod 1999; 14: 1528

52. Balaban B, et al. Progression to the blastocyst stage of embryos derived from testicular round spermatids. Hum Reprod 2000; 15: 1377
53. Bernabeu R, et al. Successful pregnancy after spermatid injection. Hum Reprod 1998; 13: 1898
54. Desai N, Goidfarb J. Cocultured human embryos may be subjected to widely different microenviron-ments: pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the coculture interval. Hum Reprod 1998; 13: 1600
55. Heller CG, Clermont Y. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. Science 1963; 140: 184
56. Heller CG, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. Recent Prog Horm Res 1964; 20: 545
57. Menezo YJR, Gucrin J-F, Czyba J-C. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. Biol Reprod 1990; 42: 301
58. Menezo YJR, et al. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. Hum Reprod 1992; 7 (Suppl): 101
59. Foresta C, et al. Evidence for a stimulatory role of follicle-stimulating hormone on the spermatogonial population in adult males. Fertil Steril 1998; 69: 636
60. Baarends WM, Grootegoed JA. Male gametogene-sis. In Fauser BCJM, ed. Reproductive Medicine. Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals. New York: Parthenon Publishing, 2003: 381
61. ErkkiSa K, et al. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. J Clin Endocrinol Metabol 1997; 82: 2314
62. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. BioEssays 2000; 22: 423
63. Tesarik J, et al. Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 4467
64. Tesarik J, et al. Differentiation of spermatogenic cells during in vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone. Hum Reprod 1998; 13: 2772
65. Tesarik J, et al. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. Mol Hum Reprod 1998; 4: 757
66. Tesarik J, et al. Birth of healthy twins after fertilization with in vitro cultured spermatids from a patient with massive in vivo apoptosis of postmei-otic germ cells. Fertil Steril 2000; 74: 1044
67. Tesarik J, et al. In-vitro spermatogenesis resumption in men with maturation arrest: relationship with in-vivo blocking stage and serum FSH. Hum Reprod 2000; 15: 1350
68. Tesarik J, et al. Pharmacological concentrations of follicle-stimulating hormone and testosterone improve the efficacy of in vitro germ cell differentiation in men with maturation arrest. Fertil Steril 2002; 77: 245
69. Tesarik J, et al. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. Hum Reprod 2002; 17: 1811
70. Tesarik J, et al. Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells ftom men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. Hum Reprod 2004; 19:254
71. Sa R, ct al. In vitro maturation of sperm. In Gurgan T, Demirol A, eds. 13th World Congress on In Vitro Fertilization: Assisted Reproduction & Genetics. Bologna: Medimond, 2005: 79
72. Morales CR, Wu XQ, Hecht NB. The DNA/RNA-binding protein, TB-RBP, moves from the nucleus to the cytoplasm and through intercellular bridges in male germ cells. Dev Biot 1998; 201: 113
73. Egozcue S, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. Hum Reprod Update 2000; 6: 93
74. Sun F, et al. Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: case report. Hum Reprod 2004; 19: 1770
75. Guichaoua MR, et al. Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. Hum Reprod 2005; 20: 1897
76. Pang M-G, et al. The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. Hum Reprod 2005; 20: 1688
77. Alves C, et al. Unique (Y; 13) translocation in a male with oligozoospermia. Cytogenetic and molecular studies. Eur J Hum Genet 2002; 10: 467
78. Pinho MJ, et al. Unique (Yql2;lql2) translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest. Hum Reprod 2005; 20: 689
79. Rodriguez I, et al. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. EMBO J 1997; 16: 2262
80. Lee J, et al. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. Endocrinology 1999; 140: 852
81. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. Am JPhysiol 1999; 276: E310
82. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ 1999; 6: 1028
83. Kroemer G, Martin SJ. Review. Caspase-independent cell death. Nat Med 2005; 11: 725
84. Woolveridge I, et al. Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis related genes. Biol Reprod 1999; 60: 461

85. Lin WW, et al. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. Fertil Steril 1997; 68: 1065
86. Hikim AP, et al. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell dearh. J Clin Endocrinol Metabol 1998; 83: 152
87. Steele EK, et al. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. Mol Hum Reprod 1999; 5:831
88. Nakagawa A, et al. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular sertoli cells. Mol Reprod Dev 2005; 71: 166
89. Almeida C, et al. Quantitative study of caspase-3 activity in the ejaculate and swim-up regarding semen quality. Hum Reprod 2005; 20: 1307
90. Marques CJ, et al. Altered genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. Lancet 2004; 363: 1700
91. Kamp C, et al. High deletion frequency of the complete AZFa sequence occurs only in men with Sertoli-celLonly-syndrome. Mol Hum Reprod 2001; 7: 987
92. Fernandes S, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. Mol Hum Reprod 2002; 8: 286
93. Ferras C, et al. AZF and DAZ gene copy specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell only syndrome. Mol Hum Reprod 2004; 10: 755
94. Grangeia A, et al. Characterization of CFTR mutations and LVS8-T variants in Portuguese patients with CAVD. Hum Reprod 2004; 19: 2502
95. Grangeia A, et al. A novel missense mutation P1290S at exon 20 of the CFTR gene in a Portuguese patient with congenital bilateral absence of the vas deferens. Fertil Steril 2005; 83: 448
96. Shamanski FL, et al. Status of genomic imprinting in mouse spermatids. Hum Reprod 1999; 14: 1050
97. Van Steirteghem AC, et al. Follow-up of children born after ICSI. Hum Reprod Update 2002; 8: 111
98. Lidegaard O, Pinborg A, Andersen AN. Imprinting diseases and IVF: Danish National 1VF cohort study. Hum Reprod 2005; 20: 950
99. Tcsarik J, et al. Restoration of fertility by in vitro spermatogenesis. Lancet 1999; 353: 555
100. Steele EK, Lewis SEM, McClure N. Science versus clinical adventurism in treatment of azoospermia. Lancet 1999; 353: 516
101. Carvalho F, et al. Preimplantation genetic diagnosis for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). PrenatDiagn2001;21: 1093
102. Alves G, et al. Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of Robertsonian transiocations: the Portuguese experience. Prenat Diagn 2002; 22: 1153
103. Sousa M, Barros A. Ethics, social, legal, counselling. A moral case study for discussion: designer babies and tissue typing. Reprod Biomed Online 2004; 9: 596

32

İnfertil Erkek Hastanın Değerlendirilmesi ve Yönetiminde Yeni Gelişmeler

Darius A Paduch, Marc Goldstein, Zev Rosenwaks

Çeviri: *Ali Furkan Batur*[*], *İlker Şen*[*]

GİRİŞ

İn vitro fertilizasyona (IVF) başlanıldığından bu yana erkek infertilite tedavisinde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun (ICSI) geliştirilmesi en büyük hamle olmuştur. Bu yeni teknik ciddi oligospermisi veya azospermisi olan erkeklerin aksi takdirde kalıcı steril kalacakları duruma karşın infertilite tedavilerini olanaklı kılmıştır. Belki de bu yöntemin uygulanımının en büyük başarıya ulaştığı alan non-obstrüktif azospermisi olan ve Klinefelter Sendromu olan erkekler olmuştur ki bu hastalarda mikrocerrahi testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile kombine edilmektedir[1,2].

GENETİK VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Erkeği ICSI'da kullanmaya yetecek kadar sayıda haploid germ hücre sağlayıcı bir faktör olarak değerlendirirken erkek üreme fizyolojisi ve altta yatan patofizyolojiyi değerlendirmenin araştırmasının peşinden ayrılmamalıyız. Ancak erkek infertilitesinin temel bilimini ve genetik temelini çözerek bu önemli alanda gelecekte yeni buluşlar yaratabiliriz.

Bu bölüm erkek infertilitesinin fizyolojik ve genetik temelini anlamamıza yardımcı olarak sadece yeni tedaviler geliştirilmesine katkıda bulunmakla kalmamakta ayrıca hastaların nasıl değerlendirildiğini de göstermektedir.

Bu alanda çok kritik öneme haiz bir örnek Y mikrodelesyonu olan erkek hastaların değerlendirilmesi ve ayrıntılı çalışılmasıdır. Hopps ve ark[3] diğerlerinden daha önde olarak AZFa ve AZFb (azospermi faktörleri) delesyonları olan erkeklerde TESE esnasında spermatozoanın bulunamadığı durumlarda Y mikrodelesyonun bulunmasının belirgin prognostik önemi olduğu göstermişlerdir. Yakın dönemde birbirinden bağımsız olarak iki grup non obstrüktif azosperminin (NOA) %10'unda bulunan spermatogenik arrest ve sertoli only cell sendromu ile sonuçlanan ubikutin spesifik proteaz26'da mutasyonlarını göstermişlerdir[4,5].

Benzer şekilde hipotalomus-pituiter-testis aksının daha geniş anlamda anlaşılmasıyla beraber hipogonadotropik hipogonadizmin genetiğinde yeni buluşlar yapılmıştır. Kallmann's sendromu hipogonadotropik hipogonadizmin çok iyi bilinen sık görülen bir nedenidir. Tipik olarak Kallmann sendromu olan hastalar gecikmiş puberte, kısa boy, anosmi ve daha sonraki dönemlerde infertilite ile tanınmaktadırlar[6]. Genetik çalışmalar Kalman sendromunun spontan ve herediter formu için iki tane gende mutasyon olduğunu belirlemişlerdir:KAL-1 ve FGFR-1[7]. KAL-1 X kromozomunda

[*] Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.

(Xp22.3) yer almaktadır ve bu gendeki mutasyon veya delesyonlar hastalığın X bağımlı geçen formunu meydana getirmektedirler. KAL-2 olarak da bilinen 8p11.2-12'de yer alan fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1'de (FGFR-1) meydana gelen mutasyonlarhastalığın otozomal dominant formunu meydana getirirler. KAL-1 olfaktör alandan hipotalamusa gitmesi gereken gonadotropin salıverici hormon (GnRH) primitif hücrelerinin normal migrasyonunu için gerekli bir proteini kodlarken FGFR-1 olfaktör bulbusun başlangıç çıkıntısı (gelişimi) için gereklidir.

Bu klinik mutasyonlarının tanımlanması her mutasyonun farklı bir sendromla ilişkili olduğunun anlaşılmasından sonra klinik değere sahip olmuştur. KAL-1 mutasyonları renal bozukluklarla beraber iken FGFR-1 heterozigot mutasyonu duyma problemleri ve yarık damak ile beraberdir. Ayrıca FGFR-1 mutasyonu kendiliğinden düzelen idiopatik hipogonadotropik hipogonadizmde de (IHH) tanımlanmıştır[8]. Kallmann sendromu olan erkeklerde insan koriyonk gonadotropin (hCG) ve follikül stimülan hormon (FSH) ile tedavi sperm üretiminin başlangıcına olanak sağlayarak çocuk sahibi olmalarını sağlamaktadır[9]. KAL-1 geninin X kromozomu üzerinde yer aldığı için KAL-1 mutasyonu hasta erkeklerin kızlarına da aktarılarak gelecek kuşakta fenotipik bozukluğa yol açacaktır. Bu yüzden bu mutasyonun varlığı üreme seçenekleri ile verilecek kararı etkileyecek ve hCG ile FSH replasman tedavisinin uzunluğunu belirleyecektir[10].

Kallmann sendromu olan erkek hastalar ürolog tarafından değerlendirilmelidir. Testiküler volüm ölçümü belirgin prognostik öneme sahiptir. Testiküler volümü 4ml'nin altında olan erkekler hCG ve FSH tedavisine daha zayıf yanıt verirken (ejakülatta sperm ortaya çıkan hastalar %36) 4ml'nin üzerinde olan hastalarda yanıt %71'e çıkmaktadır[11]. Testis volümleri açısından karşılaştırıldığında küçük veya daha büyük olan testisler arasında tedavi öncesi ve sonrası dönemde hormon seviyeleri arasında belirgin bir fark bulunmamaktadır. Son zamanlarda non anosmik hipogonadotropik hipogonadizme yol açan bir tür idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm üzerinde dikkatler yoğunlaşmıştır ki bunlarda GnRH regülasyonunda KiSS-1 yolağında rol alan GPR54 reseptöründe mutasyonlar gösterilmiştir[12]. Gonadotropinlerin salınımını stimüle etmek için intraventriküler KiSS-1 infüzyonu bulunduğundan bu yana KiSS homologları kullanılarak hipogonadizmin gelecekteki farmakolojik tedavisi aydınlanmış olmaktadır.

ONKOLOJİ VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Onkolojide temel bilim ve klinik gelişmeler çocukluk çağı ve yetişkin malignensilerinde uzun dönem sağ kalımı geliştirmiştir. Sağ kalımı arttıran bu gelişmeler genellikle agresif kemoterapotik ajanlarla tedavi, kemik iliği transplantasyonu ve tüm vücut ışınlamasıyla mümkün olmaktadır. Özellikle alkile edici ajanlarla yüksek dozlarda yapılan kemoterapiler veya radyasyon tedavisi hastaların %20-50'sinde kalıcı azospermi ile sonuçlanmaktadır[13]. Bir çok diğer hastalarda da oligospermi ile sonuçlanmaktadır[14]. Leydig hücreler rayoterapiye ve kemoterapiye belirgin olarak dirençli olsalar da bu tür tedaviyi alan çocuk hastalar ve yetişkinler gecikmiş puberte ve düşük miktarda testosteron üretimi görülebilmektedir[15]. Hayvanlarda kemoterapi veya radyoterapi esnasında farmakolojik olarak germ hücre korunması ayrıntılı olarak değerlendirilmektedir. Sezgisel bir seçenek olarak kemoterapi esnasında germ hücre gelişimini engellemek için GnRH agonistlerinin kullanılması düşünülmelidir. Radyoterapi sonrası spermatogenez düzeltilmesinde GnRH agonistlerinin kullanımının yararlı etkisi, insan olmayan primatlarda gösterilememiş olmasına karşın kemiricilerde gösterilmiştir[16]. Bir çok merkez bu konuyu insanlarda önemle araştırmakta ise de GnRH agonistlerinin radyo veya kemoterapi esnasında testiküler hasarı önleme konusunda düzenli kullanımını destekleyecek herhangi bir insan çalışması verisi henüz bulunmamaktadır. Gelecekte spermatogenezi daha iyi anlamamız sayesinde bu tür tedaviler sağlanabilinecektir[17].

Kemo veya radyoterapi öncesinde sperm dondurulmasının yapılabilmesi için her türlü girişimde bulunulmalıdır. Bir çok erkek hasta özellikle de testis tümörü olanlar sperm dondurulması için kalitesiz sperme sahiptirler. Çocuklar ve erken adolesan çağdakiler çoğunlukla azospermiktir[18,19]. Kanser tedavisi öncesi zayıf sperm kalitesi muhtemelen kansere bağlı paraneoplastik sendromlarla ve sperm üretimini etkileyen sitokinler, tümör nekrotizan faktör (TNF) ve diğer moleküllerle ilişkilidir[20]. Seçilmiş ciddi oligospermili vakalarda kemoterapi öncesi testiküler sperm düzeltilmesinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir[18]. Benzer şekilde adolesan erkek semen örneği veremez ise vibratuar stimulasyon veya elektroejekülasyon kullanılabilir.[21] Prepubertal adolesanlarda immatür testiküler doku dondurulabilse de bu tedavi metodu henüz deneysel aşamadadır ve günümüzde immatür germ hücrelerinin in vitro şartlarda, daha sonra IVF/ICSI için kullanmak üzere matürasyonunu sağlamak için teknik-

ler yeterli değildir[22,23]. Total vücut radyoterapisine girecek 12-14 yaşındaki erkek çocuğun gelecekte spermatogeneze girme şansı yoktur ve diğer 10 senede üreme yaşına giremeyecektir. İn vitro şartlarda sperm matürasyonundaki yeni gelişmeler böyle durumdakierkek çocukları için umut vaat etmektedirler. Hayvan deneylerinde 3 yaklaşım başarılı olmuştur: (1) kemiricilerde kalitatif sperm yeniden yapılanması için germ hücre kök hücre transplantasyonu (2) in vitro germ hücre matürasyonu ve (3) germ hücreleri tükenmiş testise matüre germ hücrelerini tekrar geri transplante etmek[22-25]. Kemiricilerde ve primatlarda başarıyla gerçekleşen bu deneyler yüksek ihtimalle azospermi ile sonuçlanacak çocuklar ve adolesanlar için testiküler dokuların dondurularak saklanmasını haklı çıkarmaktadır. Bu alan heyecanlı bir çalışma alanıdır ve bu yaklaşım testiküler dokunun cerrahi olarak alınmasını gerektirdiğinden bu yana erkek üremesinin biyolojisindeki geniş bilgilerin yanında kanser hastalarının tedavi yönetimine erkek infertilite uzmanlarının da katılmasını gerekli kılmıştır.

Onkoloji ve erkek infertilitesi alakalı ilginç bir soru da kemoterapi veya radyoterapi görecek hastadan alınacak spermin kullanılmasının güvenilirliğidir. Böyle bir spermin kullanılması ile doğacak yavruda genetik anormalliklerin riskini artabilir mi? Tanımlanmamış bir risk var mıdır veya kanserden sonra sağ kalanlarda bu tür bir spermin kullanılması için belirgin bir bekleme süresi var mıdır? Acaba kanser sonrası sağ kalan baba adaylarından alınan sperm örneklerinin preimplantasyon genetik tanı (PGD) için araştırılmalarına gerek var mıdır? Kemoterapinin hemen sonrası sperm anöploidi olması konusunda artmış bir risk bulunmaktadır ancak bu risk zamanla azalmaktadır[26,27]. Son zamanlarda bir çok otorite en son kemoterapi siklusundan 18-24 ay sonrasına kadar çiftlerin doğum kontrolü yapması üzerinde görüş birliğine varmıştır. Bu alanda yine de ileri çalışmaların yapılması gereklidir. Kemoradyoterapi sonrası erkeklerin spermleri ile gerçekleşen yavruların takibi sonucu yavruda kromozomal sapmalar konusunda artmış risk konusundaki düşüncelerin doğru olmadığını ortaya koymuştur[28].

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE MEDİKAL TEDAVİ

İdiopatik oligoastenoteratospermi olan erkeklerin medikal tedavisindeki gelişmeler sınırlıdır. Dikkatlice seçilmiş vakalarda klomifen sitrat, tamoksifen ve aromataz inhibitörlerinin kullanımı yararlı olabilir. Hiperöstrojenemi olan erkeklerin tedavisinde aromataz inhibitörlerinin rolü olabilir. Klinefelter sendromu olan erkekler aromataz inhibitörleri ile tedaviden fayda görebilirler[29-31]. Tamoksifen (20 mg oral günde 2 defa) normal gonadotropin düzeyi olan oligospermik hastalarda sperm yoğunluğunu ve motilitesini arttırabilir ancak yüksek FSH ve luteinizan hormon (LH) düzeyine sahip hastalarda herhangi bir etkisi yoktur gibi görünmektedir[32]. Tamoksifen tedavisine testosteron eklenmesi faydalı etkide bulunabilir[33,34]. Testosteron, tek başına spermatogenezisi baskılar ve asla infertil hastaya tek başına verilmemelidir. Klomifen sitrat, oligospermili seçilmiş vakalarda yararlı olabilir. Kullanımı testosteron seviyelerive sperm yoğunluğundaki artışla sonuçlanır ancak daha ilerisi klomifen sitrat tedavisi alanlarda artmış gebelik oranlarını bildiren kanıt bulunmamaktadır[35,36]. Erkeklerde östrojen geridönüşünün ve östrojen üretimin uzun dönemde potansiyel etkileri bilinmemektedir.

İdiopatik normogonadotropik oligospermili hastalarda hCG ve/veya FSH ile tedavinin etkinliği hakkında kanıt bulunmamaktadır. Yine de son zamanlarda idiopatik oligospermisi olan erkek hastalar da anormal LH pulsatil salınımı gösterilmiştir[37]. Foresta ve ark. dolaşan yüksek düzeydeki FSH seviyelerinin baskılanmasının Sertoli hücre fonksiyonunudüzelttiğini göstermişlerdir[38]. İnfertil hastada hormonal manüplasyon için tedavi protokollerinin optimizasyonu hipotalomo-Pitüiter-Testis aksının daha ileri düzeyde anlaşılması ile sağlanacaktır.

En azından %30 infertil erkek hastada ayrıntılı değerlendirme sonrasında etyoloji bulunamamaktadır. İdiopatik erkek infertilite tedavisinde mevcut farmakolojik ajanların sınırlı etkisi göz önünde bulundurulduğunda bu hastaların alternatif tedavi metodlarına yönelmesi şaşırtmamalıdır[39].

Hücrelerdeki bir çok biyokimyasal yolaklarda vitaminler ve mineraller önemli bir rol oynamaktadırlar ve kofaktör olarak sperm kalitesi ve sperm DNA yoğunluğu üzerinde belirgin etkileri bulunmaktadır. Bir çok çalışma oksidatif stresteki artışın semende sperm kromatininde hasarlarla sonuçlandığını göstermiştir[40-42]. Bu bilgi de infertil erkeklerin tedavisinde antioksidanlar ile vitamin ve mineral gibi destekleyicilerin sperm kalitesini arttırarak fertilizasyon oranlarını arttırması umuduyla kullanılmasını öngörmektedir. Küçük randomize çalış-

malarda L-Karnitin destekleyicilerinin 3-6 ay süreyle günde 2 gr kullanılmasının sperm yoğunluğu ve motilitesini arttırdığını göstermişlerdir. Diğer çalışmalar yararının olmadığını göstermişlerdir[43]. Vitamin A, E ve C destekleyicilerinin semen parametrelerini düzeltebildiği gösterilmiş olsa da fertilite üzerinde düzelme sağlayıcı etkilerinin bildiren yayın bulunmamaktadır[44]. Vitamin A, E ve C ile desteklenen hastalarda sperm kromati yapısı assay testi (SCSA) ile sperm kromatini üzerinde düzeltici etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir[45]. Bu yüzden vitamin ve mineral destekli tedavilerin non spesifik ve ampirik olduğu ve bazı hastalarda yararlı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

SPERMİN CERRAHİ OLARAK ÇIKARILMASI

İdiopatik nonobstrüktif azospermili erkek hastalarda başarılı bir tedavi seçeneği bulunmadığı için böyle hastalarda ICSI'de kullanılmak üzere cerrahi olarak sperm ekstraksiyonu yapılması ana tedavi basamağını oluşturmaktadır. Tecrübeli ellerde mikrocerrahi teknikler kullanılarak NOA olan erkek hastaların %50'sinde sperm bulunabilir (Tablo 32.1)[1,2,46]. Daha ileri olarak hangi hastalarda testiste sperm bulunduğun önceden belirleyen test bulunmamaktadır. Turek ve ark. NOA olan erkeklerde ince-iğne haritalaması metodunun sperm varlığını belirlemek için yardımcı olabileceğini belirtseler de bu metot cerraha bağımlı bir metottur[47,48]. Bizim merkezimizde ve diğer merkezlerde testiküler sperm ekstraksiyonundan (TESE) fayda görecek olan hastaları belirlemeye yardımcı olması umut edilen yeni algoritmleri kullanan manyetik rezonans görüntüleme ve 3T MRI (three tesla manyetik rezonans görüntüleme) teknikleri değerlendirilmektedir. TESE öncesi hormonal manüplasyonunun iyileşme oranlarını ve fertilizasyon oranlarını düzelttiği yönünde çalışmalar beklenmektedir.

Bizim çalışmalarımızda taze testiküler sperm dondurulmuş testiküler sperm ile karşılaştırıldığında daha iyi gebelik ve fertilizasyon oranlarını sağladığı belirlenmiştir. Diğer merkezler dondurulmuş testiküler dokularla eşit derecede iyi sonuçların alındığını iddia etmektedirler. Konjenital olarak vaz deferens yokluğu gibi düzeltilemez obstrüktif azospermili hastalarda epididimal spermin alınıp dondurulması taze spermle eşit sonuçları sağlamaktadır (Tablo 32.2). Vazektomi geri döndürülmesi gibi düzeltilebilir obstrüktif azospermili hastalarda başlangıç tedavisi olarak mikrocerrahi teknikle tamirin başarıyı sağlayan en ucuz yöntem olduğu olarak bildirilmektedir[48-55].

Mikrocerrahi tekniklerle arter ve lenfatikleri koruyan yaklaşımla yapılan varikosel ameliyatları neticesinde gelişmiş sonuçlar ve varikosel ilişkili infertilite ve adolesan varikosel morbiditesinin minimale indirgenmiş olduğu belirtilmektedir[56-59]. Varikoselektominin yararları üzerinde karşıt görüşler bulunsa da bir çok çalışma non obstrüktif azospermili veya ciddi oligoastenospermili hastada varikosel tamirinin testiküler alınan sperme göre spermatogenezi düzelteceği içinIVF/ICSI'da daha yararlı olacağı görüşü bulunmaktadır[60-64]. Yeni veriler varikosel onarımının sperm kromatin yapısını düzelttiği yönündedir[65]. Adolesanlarda varikosel onarımı hem gelecekteki infertiliteyi hem de yaşlanan erkekte androjen eksikliğini önleyebilecektir. Eğer bu hipotez doğrulanırsa varikosel onarımı sadece sperm üretimini düzeltmekle kalmayıp ayrıca hipogonadizmi önleyebilecek ve hatta tedavi etmekle görevli olacaktır[59,66,67].

Tablo 32.1: *Testiküler spermatozoalar ile sperm parametreleri ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonuçları*[46]

	Obstrüktif Azospermi	Non-Obstrüktif Azospermi
Sikluslar (n)	156	457
Ort.Konsantrasyon±SD (x10^6/ml)	0.4±1	0.3±2
Ort.Motilite±SD (%)	4.3±8	2.5±7
Fertilizasyon (n (%))	918/1318 (69.6)*	2395/4380 (54.7)*
Klinik gebelikler (n (%))	70 (44.9)	181 (39.6)

* χ^2 test, 2x2,1df; azospermi etyolojisinin fertilizasyon oranı üzerine etkisi, p=0.0001

Tablo 32.2: *İn vitro fertilizasyon/intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF/ICSI) ile ilk deneme: Taze ile dondurulmuş epididimal sperm karşılaştırılması*[49]
Sonuçlar ort. ± ile verilmiştir.

	Taze (n=108)	**Dondurulmuş (n=33)**
Erkek yaşı (yıl)	38.3±8.8	38.2±11.1
Kadın yaşı (yıl)	33.2±5.1	33.1±5.5
Aspire edilen toplam sperm sayısı (n)	99×10^6	$82 \times 10^6 \pm 110$
Saklanan canlı sayısı (n)	5.5	4.7±2.5
Enjekte edilen oosit sayısı (n)	10.8±5.5	10.1±5.3
Fertilize olan oosit sayısı (n)	8.2±5.1	7.9±4.6
Transfer başına embriyo sayısı (n)	3.3±1.0	3.2±0.8
Gebe olan çift sayısı/Toplam çift sayısı (n (%))	72/108 (66.7)	20/33 (60.6)

İnfertil çiftlerin medikal değerlendirilmesinin optimizasyonunda infertil erkek hastanın değerlendirilmesi ve spesifik tedavilerin uygulanması kritik öneme haizdir. Dahası yeni veriler erkek infertil hastanın değerlendirilmesinin infertil erkeklerde 20 kat artmış testiküler kanser riski yüzünden önem kazandığını göstermektedir[68]. İlerleyen yıllar;erkek üremesinin genetik ve fizyolojisinin anlaşılması konusundaki yeni gelişmelerle, kök hücre araştırmaları ve cerrahi tekniklerinin sonuçlarının ölçülmesinde daha iyi yolların[69,70] ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ile bize şu an günümüz standartlarında steril olarak değerlendirilmiş olan hastaların tedavilerini yapmamıza olanak tanıyacaktır.

KAYNAKLAR

1. Schlegel PTN, et al. Fresh tesdcular sperm from men with nonobstructive azoospermia works best for ICSI. Urology 2004; 64: 1069
2. Schiff JD, et al. Success of testicular sperm injection and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 6263
3. Hopps CV, et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. Hum Reprod 2003; 18: 1660
4. Stouffs K, et al. Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. Eur J Hum Genet 2005; 13:336
5. Paduch DA, Mielnik A, Schlegel PN. Novel mutations in testis-specific ubiquitin protease 26 gene may cause male infertility and hypogonadism. Reprod Biomed Online 2005; 10: 747
6. Karges B, de Roux N. Molecular genetics of isolated hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. Endocr Dev 2005; 8: 67
7. Gonzalez-Martinez D, Hu Y, Bouloux PM. Ontogeny of GnRH and olfactory neuronal systems in man: novel insights from the investigation of inherited forms of Kallmann's syndrome. Front Neuroendocrinol 2004; 25: 108
8. Pitteloud N, et al. Reversible Kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. J Clin Endocrinol Metab 2005:90: 1317
9. Szilagyi A, et al. Kallmann's syndrome: pregnancy through intracytoplasmic sperm injection and com-

plicated by gestational diabetes. Gynecol Endocrinol 2001; 15:325

10. Abujbara MA, et al. Clinical and inheritance profiles of Kallmann syndrome in Jordan. Reprod Health 2004; 1: 5
11. Miyagawa Y, et at. Outcome of gonadotropin therapy for male hypogonadotropic hypogonadism at university affiliated male infertility centers: a 30-year retrospective study. J Urol 2005; 173: 2072
12. Kaiser UB, Kuohung W. KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. Endocrine 2005; 26: 277
13. Agarwal A, Allamaneni SS. Disruption of spermatogenesis by the cancer disease process. J Natl Cancer Inst Monogr 2005; (34): 9
14. Humpl T, Schramm P, Gutjahr P. Male fertility in long-term survivors of childhood ALL. Arch Androl 1999; 43: 123
15. Alves CH, et al. Growth and puberty after treatment for acute lymphoblastic leukemia. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2004; 59: 67
16. Shetty G, Mcistrich ML. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. J Natl Cancer Inst Monogr 2005; (34): 36
17. Meistrich ML, Shetty G. Suppression of testosterone stimulates recovery of spermatogenesis after cancer treatment. Int J Androl 2003; 26: 141
18. Shin D, Lo KC, Lipshultz LI. Treatment options for the infertile male with cancer. J Natl Cancer Inst Monogr 2005; (34): 48
19. Tournaye H, Goossens E, Verheyen G, et al. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. Hum Reprod Update 2004; 10: 525
20. Bussen S, et al. Semen parameters in patients with unilateral testicular cancer compared to patients with other malignancies- Arch Gynecol Obstet 2004; 269: 196
21. Muller J, et al. Cryopreservation of semen from pubertal boys with cancer. Med Pediatr Oncol 2000; 34: 191
22. Schlat: S, et al. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. Biol Reprod 2003; 68: 2331
23. Schlatt S, von Schonfeldt V, Schepers AG. Male germ cell transplantation: an experimental approach with a clinical perspective. Br Med Bull 2000; 56: 824
24. Zhang X, Ebata KT, Nagano MC. Genetic analysis of the clonal origin of regenerating mouse spermatogenesis following transplantation. Biol Reprod 2003; 69: 1872

25- Feng LX, et al. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. Science 2002; 297: 392

26. Martin RH, et al. Analysis of sperm chromosome complements before, during, and after chemotherapy. Cancer Genet Cytogenet 1999; 108: 133
27. De Mas P, et al. Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. Hum Reprod 2001; 16: 1204
28. Meistrich ML, Byrne J. Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer treated with potentially mutagenic therapies. Am J Hum Genet 2002; 70: 1069
29. Raman JD, Schlegel PN. Aromatase inhibitors for male infertility. J Urol 2002; 167: 624
30. Karaer O, Oruc S, Koyuncu FM. Aromatase inhibitors: possible future applications. Acta Obste: Gynecol Scand 2004; 83: 699
31. Kawakami E, et al. Improvement in spermatogenic function after subcutaneous implantation of a capsule containing an aromatase inhibitor in four oligozoosperrnic dogs and one azoospermic dog with high plasma estradiol-17beta concentrations. Theriogenology2004;62: 165
32. Kadioglu TC, et al. Trearmenr of idiopathic and postvaricocelectomy oligozoospermia with oral tamoxifen citrate. BJU Int 1999; 83: 646
33. Adamopoulos DA, et al. Effectiveness of combined tamoxifen citrate and testosterone undecanoate treatment in men with idiopathic oligozoospermia. Fertil Steril2003; 80:914
34. Adamopoulos DA. Present and future therapeutic strategies for idiopathic oligozoospermia. Int J Androl 2000; 23: 320
35. Siddiq FM, Sigman M. A new look at the medical management of infertility. Urol Gin North Am 2002; 29: 949
36. Vandekerckhove P, et al. Clomiphene or tamoxifen for idiopathic oligo/asthenospermia. Cochrane Database Syst Rev 2000; (2): CD000151
37. Scaglia HE, et al. Altered testicular hormone production in infertile patients with idiopathic oligoasthenospermia. J Androl 1991; 12: 273
38. Foresta C, et al. Suppression of the high endogenous levels of plasma FSH in infertile men are associated with improved Sertoli cell function as reflected by elevated levels of plasma inhibin B. Hum Reprod 2004; 19: 1431
39. Zini A, et al. Use of alternative and hormonal therapies in male infertility. Urology 2004; 63: 141
40. Sharma RK, SaidT, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. Asian J Androl 2004; 6: 139
41. Salch RA, et al. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. Fertil Steril 2002; 78: 491

42. Saleh RA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertil Steril 2002; 78: 1215
43. Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. Reprod Biomed Online 2004; 8: 376
44. Eskenazi B, et al. Antioxidan: intake is associated with semen quality in healthy men. Hum Reprod 2005; 20: 1006
45. Silver EW, et al. Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. J Androl 2005; 26: 550
46. Palermo GD, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. Hum Reprod 1999; 14: 741
47. Turek PJ, et ai. Diagnostic findings from testis fine needle aspiration mapping in obstructed and nonobstructed azoospermic men. J Urol 2000; 163: 1709
48. Turek PJ, et al. Testis sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection guided by prior fine-needle aspiration mapping in patients with nonobstructive azoospermia. Fertil Steril 1999; 71: 552
49. Janzen N, et al. Use of electively cryopreserved micro-surgically aspirated epididymal sperm with IVF and ICSI for unreconstructable azoospermia. Fertil Steril 2000; 74: 696
50. Tournaye H, et al. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. Hum Reprod 1999; 14: 90
51. Anger JT, et al. Sperm cryopreservation and in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection in men with congenital bilateral absence of the vas deferens: a success story. Fertil Steril 2004; 82: 1452
52. Fukunaga N, et al. Efficiency of using frozen-thawed testicular sperm for multiple intracytoplasmic sperm injections. J Assist Reprod Genet 2001; 18: 634
53. Nikolettos N, et al. Outcome of anticipated ICSI cycles using intentionally frozen-thawed testicular spermatozoa according to the spouse's response to ovarian stimulation. Clin Exp Obstet Gynecol 2002; 29: 126
54. Nikolettos N, et al. Outcome of ICSI cycles using frozen—thawed surgically obtained spermatozoa in poor responders to ovarian stimulation: cancellation or proceeding to ICSI? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 92: 259
55. Oates RD, et al. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1997; 12: 734
56. Matthews GJ, Matthews ED, Goldstein M. Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia. Fertil Steril 1998; 70: 71
57. Goldstein M, et al. Microsurgical inguinal varicocelectomy with delivery of the testis: an artery and lymphatic sparing technique. J Urol 1992; 148: 1808
58. Marmar JL, Kim Y. Subinguinal microsurgical varicocelectomy: a technical critique and statistical analysis of semen and pregnancy data. J Urol 1994; 152: 1127
59. Schiff J, et al. Managing varicoceles in children: results with microsurgicai varicocelectomy. BJU Int 2005; 95: 399
60. Raman JD, Walmsley K, Goldstcin M. Inheritance of varicoceles. Urology 2005; 65: 1186
61. Gat Y, et al. Induction of spermatogenesis in azoospermic men after internal spermatic vein embolization for the tteatment of varicocele. Hum Reprod 2005; 20: 1013
62. Schlegel PN, Kaufmann J. Role of varicocelectomy in men with nondestructive azoospermia. Fettil Steril 2004; 81: i585
63. Cakan M, Altug U. Induction of spermatogenesis by inguinal varicocele repair in azoospermic men. Arch Androl 2004; 50: 145
64. Pasqualotto FF, et al. Induction of spermatogenesis in azoospermic men after varicocele repair. Hum Reprod 2003; 18: 108
65. Zini A, et al. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. Hum Reprod 2005; 20: 1018
66. Su LM, Goldstein M, Schlegel PN. The effect of varicocelectomy on serum testosterone levels in infertile men with varicoceles. J Urol 1995; 154: 1752
67. Cayan S, et al. The effect of microsurgical varicocelectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. BJU Int 1999; 84: 1046
68. Raman J, Norbert C, Goldstein M. Increased incidence of testicular cancet In men presenting with infertility and an abnormal semen analysis. J Urol 2005; 174: 1819
69. Goldstein M, Li PS, Matthews GJ. Microsurgical vasovasostomy: The microdot technique of precision suture placement.] Urol 1998; 159: 188
70. Chan PTK, Brandell RA, Goldstein M. Prospective analysis of outcomes after microsurgical intussusception vaso-cpididymostomy. BJU Int 2005; 96: 598

Üroloji

Erkek İnfertilitesi

Teşhis ve Tedavi

Editör
Sergio C. OEHNINGER
Thinus F. KRUGER

Çeviri Editörü
Doç. Dr. Mete KİLCİLER

Erkek infertilitesi önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Son yayınlar infertil çiftlerdeki erkek faktörünün %40-50 oranlarında olduğunu vermektedir. Bu konu ile ilgili gerek cerrahi gerekse medikal tedavilerdeki araştırmalar sürmektedir. İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) bu alanda bir devrim yaratmış olsa da hatalı genetik yapıların sonraki nesillere aktarılma problemi ortaya çıkmıştır. Bu kitap erkek infertilitesinin patogenezi, tanısı ve tedavisinde kendi alanında öncü olmuş ve bu alanda uzun yıllar literatüre geçmiş çalışmalar yapan uzmanlarca yazılmıştır. Bu kitapta ürolojik, jinekolojik, endokrinolojik ve genetik yönleriyle konunun tüm ayrıntıları verilmiştir. Her bölümdeki bilgiler güncel referanslardaki objektif delillerle desteklenmiştir.

Bu kitabın basımı için kullanılan yaklaşık 1 ağaç yerine 10 ağaç Habitat Yayıncılık tarafından www.cekud.org aracılığıyla doğaya geri kazandırılmıştır.

Habitat
TIP YAYINCILIK

9 789750 051593