



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Üroloji Anabilim Dalı

**NONOBSTRÜKTİF AZOSPERMİSİ OLAN İNFERTİL ERKEK
HASTALARDA GENETİK ANALİZ SONUÇLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erhan Şen

Ankara, 2015



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Üroloji Anabilim Dalı

**NONOBSTRÜKTİF AZOSPERMİSİ OLAN İNFERTİL ERKEK
HASTALARDA GENETİK ANALİZ SONUÇLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erhan Şen

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Tahsin Turunç

Ankara, 2015

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hekimlik mesleğimin en önemli kademelerinden biri olan asistanlık eğitimimin sonuna gelmiş bulunuyorum. Önümde zorlu bir süreç ve tecrübe etmem gereken çok uzun bir yol olduğunun farkında olarak;

Uzmanlık eğitimim süresince gerek etik gerekse mesleki tecrübelerini örnek aldığım, hayata bakış açılarıyla bizlere yön veren başta bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Hakan Özkardeş olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ç. Levent Peşkircioğlu, Sayın Prof. Dr. M. İlteriş Tekin, Sayın Prof. Dr. Y. Cem Aygün, Sayın Doç. Dr. Ayhan Dirim, Sayın Yrd. Doç. Dr. A. İbrahim Oğuzülgen'e,

Çalışmam süresince tez danışmanlığımı üstlenerek bana yol gösteren, aramızdaki mesafeye rağmen her türlü bilimsel katkı ve manevi desteğini, sonsuz sabrını esirgemeyen, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Tahsin Turunç'a,

Tezimin genetik ile ilgili kısmının tamamlanmasında emeği geçen Sayın Prof. Dr. Feride Şahin'e,

Asistanlık sürecinde birlikte çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum, hem iyi hem kötü anlarımda her zaman yanımda olan kardeşlerim Dr. Kağan Akbaba, Dr. Yalçın Kızıllan ve Dr. Berkan Duran'a,

Bugünlere gelmemde ve doktor olmamda en büyük pay sahibi olan abim Orhan Şen'e

en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Çalışmamızda, infertilite nedeniyle kliniğimize başvuran ve spermogram tetkikinde nonobstrüktif azospermi (NOA) saptanan erkek hastalardaki genetik analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve genetik olarak anormallik saptanan hastalardaki mikroskopik testiküler sperm ekstraksiyonu (mikro-TESE) operasyonu sonuçlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Eylül 2003-Ocak 2015 tarihleri arasında NOA nedeniyle mikro-TESE operasyonu yapılan 994 hasta arasından karyotip analizi ve Y kromozomu mikrolelesyonu testleri yapılan 540 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu hastalar arasında genetik analiz sonucunda Klinefelter sendromu (KS), Y kromozomu mikrolelesyonu ve diğer genetik anormallikler tespit edilen hastaların mikro-TESE operasyonundaki sperm bulma oranları, genetik analiz sonucu normal olan NOA hastalarıyla karşılaştırıldı. Ayrıca, hastaların yaşları, infertilite süreleri, testis boyutları, serum FSH ve testosteron seviyeleri ile mikro-TESE operasyonunda sperm bulma oranları arasındaki ilişki incelendi.

Mikro-TESE operasyonu yapılan tüm NOA hastalarında sperm bulma oranı %47.5 idi. Genetik analiz yapılan 540 hastada sperm bulma oranı %40 iken, genetik analiz yapılmayan 454 hastada bu oran %56 idi. Karyotip analizleri sonucunda 104 hastada KS saptandı. Klinefelter sendromu saptanan hastaların 22'sinde (%21.2) mikro-TESE'de sperm bulunurken, karyotip analizi normal olan hastalarda bu oran %45 idi, sperm bulma oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.001$). Delesyon testi yapılan hastaların 14'ünde Y kromozomu mikrolelesyonu saptandı. Bu hastaların 12'sinde *AZFc*, 2'sinde ise *AZFb* delesyonları mevcuttu. Y kromozomu mikrolelesyonu olan hastaların 4'ünde (%28.6) mikro-TESE'de sperm bulunurken, delesyonu olmayan hastalarda bu oran %39 idi. Mikro-TESE'de sperm bulunan 4 hastada da *AZFc* delesyonu mevcuttu. Y kromozomu mikrolelesyonu bulunan ve bulunmayan hastalar arasında mikro-TESE'de sperm bulma oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.580$). Hastalarda, infertilite süresinin, mikro-TESE'de sperm bulma oranını değiştirmediği ($p=0.712$) fakat yaş, testis boyutu, serum FSH ve testosteron seviyesinin sperm bulma oranlarında anlamlı derecede değişiklik yaptığı ($p<0,05$) saptanmıştır.

Yaptığımız çalışma; literatürde bütün genetik analiz sonuçlarının irdelendiği en geniş serili çalışmadır. Çalışmamızın ülkemizde NOA hastaları arasındaki genetik anormallik oranının ve bu hastalardaki mikro-TESE sonuçlarının belirlenmesinde faydalı bir kaynak

olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızda, KS veya Y kromozomu mikrodelsyonu olan hastalarda mikro-TESE’de sperm bulma oranı literatürdeki çalışmalara göre daha düşük bulunmuştur. Oranın düşük olması; genetik analiz bakılan hasta popülasyonuna, taramada kullanılan gen bölgelerindeki farklılığa ve farklı bölgelerdeki farklı demografik özelliklere bağlı olabilir.

Anahtar kelimeler: Nonobstrüktif azospermi, mikro-TESE, Klinefelter sendromu, Y kromozomu mikrodelsyonu, genetik analiz

ABSTRACT

Evaluation of genetic analysis results in infertile male patients with nonobstructive azoospermia

The aim of this study is to evaluate the genetic analysis results of patients who administered to our clinic with infertility and whom spermiogram tests revealed nonobstructive azoospermia (NOA) and to analyze the results of microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE) operations performed on patients with a detected genetic abnormality.

Among 944 patients underwent a micro-TESE operation because of NOA between September 2003–January 2015, 540 patients who were tested for caryotype analysis and chromosome Y microdeletion were included in our study. The sperm extraction rates of with Klinefelter syndrome (KS), deletion of chromosome Y or other genetic abnormalities were compared with NOA patients with normal genetic analysis results. In addition, the association between the age, duration of infertility, testicular size, serum FSH and testosterone levels of patients and sperm extraction rates of micro-TESE operations was also evaluated.

The overall sperm retrieval rate of NOA patients who underwent micro-TESE was 47.5%. While sperm retrieval rate was 40% for genetically tested patients (n:540), it was 56% for genetically untested patients (n:454). Among 104 patients with KS, sperm was successfully identified after micro-TESE in 22 (%21.2). This ratio was 45% for patients with normal caryotype analysis. The difference between sperm retrieval rates were statistically significant ($p < 0.001$). Fourteen patients were diagnosed with the microdeletion of chromosome Y. Among these patients 12 had AZFc and 2 had AZFb deletions. Sperm was successfully identified in 4 of the patients (28.6%), with chromosome Y microdeletion, All of these patients had AZFc deletion. Sperm retrieval rate was 39% for patients without the deletion. Difference between the sperm retrieval rates of patients with and without deletion was not found to be statistically significant ($p = 0.580$). It was detected that; while the duration of infertility does not have an affect on the sperm retrieval rates after micro-TESE ($p = 0.712$), age, testicular volumes, serum FSH and testosterone levels have a significant affect on the sperm retrieval rates ($p < 0.005$).

To our knowledge this study is the most comprehensive study in the literature evaluating the genetic analysis results. We think our study will be a good source in the

determination of genetic abnormality rates of NOA patients, and the micro-TESE results of patients with genetic abnormalities in our country. In addition, in this study the sperm retrieval rates of patients who have chromosome Y microdeletion or KS, were found to be lower when compared with other studies in the literature. This difference could be derived from the genetically tested population's structure, variance in the gene areas used for scanning and different demographic characteristics of different regions.

Key words: nonobstructive azoospermia, micro-TESE, klinefelter syndrome, chromosome y microdeletion , genetic analysis.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--------------------------------------|-------|
| Önsöz ve Teşekkür | iii |
| Özet | iv |
| İngilizce Özet | vi |
| İçindekiler | viii |
| Kısaltmalar Dizini | xi |
| Tablolar Dizini | xii |
| Şekiller Dizini | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Anamnez | 5 |
| 2.2. Erkek Genital Sistemi Anatomisi | 8 |
| 2.2.1. Skrotum | 8 |
| 2.2.2. Testis | 10 |
| 2.2.3. Epididimis | 11 |
| 2.2.4. Duktus Deferens | 11 |
| 2.2.5. Vezikula (Glandula) Seminalis | 11 |
| 2.2.6. Prostat | 11 |
| 2.3. Fizik Muayene | 12 |
| 2.3.1. Genel Muayene | 12 |
| 2.3.2. Genital Muayene | 12 |
| 2.4. Laboratuvar Değerlendirme | 13 |
| 2.4.1. Semen Analizi | 13 |
| 2.4.2. Hormonal Değerlendirme | 15 |
| 2.5. Radyolojik Değerlendirme | 17 |

| | |
|---|----|
| 2.5.1. Transrektal Ultrasonografi (TRUS) | 17 |
| 2.5.2. Skrotal Ultrasonografi | 18 |
| 2.5.3. Abdominal Ultrasonografi | 18 |
| 2.5.4. Vazografi | 18 |
| 2.6. Erkek Üreme Sistemi İle İlgili Genetik Bozukluklar | 18 |
| 2.6.1. Kromozomal Bozukluklar | 20 |
| Seks (Genom, Sayısal) Kromozomu Bozuklukları | 20 |
| Klinefelter Sendromu | 20 |
| 46, XX Erkek Sendromu | 22 |
| 47, XYY Sendromu | 22 |
| Otomozal (Yapısal) Anomaliler | 22 |
| 2.6.2. Gen Bozuklukları | 23 |
| X Kromozomu Üzerinde Olanlar | 23 |
| Kallman Sendromu | 23 |
| Androjenik Duyarsızlık Sendromu | 23 |
| Y Kromozomu Üzerinde Olanlar | 23 |
| Y Kromozomu Mikrodelesyonu | 23 |
| 2.6.3. Tek Gen Defektine Bağlı Gelişen ve Sperm Fonksiyonlarını | |
| Direkt Etkileyen Genetik Sendromlar | 26 |
| Konjenital Bilateral Vaz Deferens Yokluğu | 26 |
| Primer Siliyer Diskinezi | 26 |
| Kartagener Sendromu | 26 |
| Usher Sendromu | 27 |
| Myotonik Distrofi ve Noonan Sendromu | 27 |
| Myotonik Distrofi | 27 |

| | |
|---|----|
| Noonan Sendromu | 27 |
| Genetik Endokrinopatiler | 27 |
| GNRH'nın Üretim veya Sekresyon Bozuklukları | 27 |
| FSH ve LH Fonksiyon Bozuklukları | 28 |
| Androjen Sentez ve Fonksiyon Bozuklukları | 28 |
| Orak Hücreli Anemi | 28 |
| 2.7. Genetik Danışmanlık | 28 |
| 2.8. Azospermik Hastaya Yaklaşım | 30 |
| 2.9. Testis Biyopsisi | 32 |
| 2.10. Cerrahi Sperm Elde Etme Teknikleri | 33 |
| 2.10.1. Mikrocerrahi Epididimal Sperm Aspirasyon Teknikleri | 34 |
| Açık Tübül Tekniği | 34 |
| Perkütan Epididimal Sperm Aspirasyonu | 34 |
| 2.10.2. Mikrocerrahi Testiküler Sperm Eldesi | 34 |
| 2.11. Yardımcı Üreme Teknikleri | 36 |
| 2.11.1. Yapay İnseminasyon (IUI) | 36 |
| 2.11.2. İn-vitro Fertilizasyon (IVF) / İntra Sitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI) | 36 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 37 |
| 4. BULGULAR | 40 |
| 5. TARTIŞMA | 47 |
| 6. SONUÇ | 52 |
| 7. KAYNAKLAR | 53 |

KISALTMALAR DİZİNİ

AUA: Amerika Üroloji Derneği

EAU: Avrupa Üroloji Derneği

EMQN: Avrupa Moleküler Genetik Kalite Ağı

FISH: Floresans in-stu hibridizasyon

FSH: Folikül Stimulan Hormon

ICSI: İna Stoplazmik Sperm İnjeksiyonu

IVF: İna-vitro Fertilizasyon

KS: Klinefelter Sendromu

LH: Luteinizan Hormon

Mikro-TESE: Mikroskopik Testiküler Sperm Ekstraksiyonu

NOA: Nonobstrüktif Azospermi

TABLULAR DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Tablo 2.1: Erkek infertilitesinin etiyolojik faktörlere göre dağılımı | 4 |
| Tablo 2.2: Semen özellikleri için alt referans değerleri | 14 |
| Tablo 2.3: İnfertilite ile başvuran hastaların semen analizi bulgularına göre dağılımı | 15 |
| Tablo 2.4: Serum FSH, LH ve testosteron seviyelerinin çeşitli klinik durumlardaki düzeyleri | 16 |
| Tablo 2.5: Klinefelter Sendromlu hastalarda mikro-TESE’de sperm bulunma oranları | 21 |
| Tablo 2.6: <i>AZF</i> genindeki mikrodelsiyonların sıklığı ve neden oldukları patolojiler | 24 |
| Tablo 4.7: Nonobstrüktif azospermi saptanan ve kliniğimizde mikro-TESE operasyonu yapılan 994 hastanın tanımlayıcı verileri | 40 |
| Tablo 4.8: Genetik analiz bakılan ve mikro-TESE operasyonu uygulanan 540 hastanın tanımlayıcı verileri | 41 |
| Tablo 4.9: Karyotip analizine göre KS olan ve olmayan hastaların parametrelerinin karşılaştırmalı tablosu | 42 |
| Tablo 4.10: Y kromozomu mikrodelsiyonu olan ve olmayan hastaların karşılaştırmalı tablosu | 45 |
| Tablo 4.11: Nonobstrüktif azospermik hastalarda mikro-TESE’de sperm bulunmasını etkileyen faktörler | 44 |
| Tablo 4.12: Nonobstrüktif azospermisi olan hastalarda mikro-TESE sonucu ile sperm bulunmasına etki etmesi öngörülen parametrelerin lojistik regresyon analizi ile karşılaştırılması | 45 |
| Tablo 4.13: Nonobstrüktif azospermi tanısıyla kliniğimizde yapılan mikro-TESE operasyonu esnasında testis biyopsisi alınan 494 hastanın patolojik tanıları ve sperm bulunma oranları | 46 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2.1: Skrotum ve katları | 9 |
| Şekil 2.2: Skrotum ve testis anatomisi | 9 |
| Şekil 2.3: Testis anatomisi | 10 |
| Şekil 2.4: Y kromozomu ve Azospermi faktör (<i>AZF</i>) bölgesi | 24 |
| Şekil 3.1: Tunika Albuginea kesisi öncesi avasküler hattın belirlenmesi ve transvers insizyon | 38 |
| Şekil 3.2: Mikro-TESE operasyonu esnasında saptanan dilate-sarı renkli, sperm olması muhtemel tübüllerin bulunması ve toplanması | 38 |

1. GİRİŞ

İnfertilite, klinik olarak düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen 12 ay içerisinde gebeliğin gerçekleşmemesi durumudur (1). Bu durum kişileri sosyoekonomik açıdan ilgilendiren bir toplumsal sağlık problemidir. İnfertilite tanımını yaparken normal insan üremesindeki verimsizliğin bilinmesi çok önemlidir. Tüm evli çiftler düşünüldüğünde dünyada infertilite prevalansının %15 oranında olduğu düşünülmektedir. Normal çiftlerde yapılan gebelik çalışmaları korunmasız ilişkilerin %60-75'inde ilk 6 ay içerisinde, %90'ında ise ilk 1 yılda gebelik elde edilebileceğini göstermiştir (2). Bu nedenle infertilite açısından değerlendirme için 12 aylık korunmasız cinsel ilişki döneminin beklenmesi en yaygın kabul edilen görüştür.

Azospermi, ejakülatta sperm olmaması olarak tanımlanır ve erkeklerin % 1'inde, infertil erkeklerin ise %10-15'inde saptanır (3). Nonobstrüktif azospermi (NOA) ise testislerde tam olarak gelişmiş spermin minimal olması ya da üretilmemesi nedeniyle ejakülatta spermatozoa yokluğu olarak tanımlanır. Nonobstrüktif azospermi nedenleri arasında genetik faktörler önemli yer tutar. Genetik testler, NOA hastasına yapılacak olan mikroskopik testiküler sperm ekstraksiyonu (mikro-TESE) öncesinde sperm bulma ihtimali hakkında bilgi verebilir. Mikroskopik testiküler sperm ekstraksiyonu, testislerde spermatogenezin devam ettiği küçük odakların mikroskop altında gösterilerek, bu odaklardan matür sperm hücrelerinin elde edildiği cerrahi bir yöntemdir. Avrupa Üroloji Derneği (EAU) ve Amerika Üroloji Derneği (AUA) kılavuzlarına göre infertilite nedeniyle başvuran ve azospermisi olan hastalar dışında belirgin oligospermisi olan (sperm sayısı 5 milyondan az) hastalarda da genetik analiz yapılmasının gerekli olduğu belirtilmektedir. Kromozom anomalileri normal popülasyonda %0.5 oranında görülmekteyken infertil erkeklerde bu oran %5.8'e yükselmektedir (4). Bu sebeple kılavuzlar infertil erkeklerde ICSI (intrastoplazmik sperm injeksiyonu) öncesi genetik anomali taraması önermektedir. Bu genetik analizler seks kromozom anomalileri [Klinefelter sendromu (KS), XYY sendromu, XX erkek sendromu, Karışık gonadal disgenezi, Y kromozomu mikrolelesyonu, diğer Y kromozomu yapısal anormallikleri, cinsiyet kromozomları arasında resiprokal translokasyon], otozomal kromozomlardaki anomaliler (resiprokal translokasyonlar, robertsonian translokasyonlar, kromozomal segmental inversiyonu, diğer otozomal kromozom anomalileri) ve üreme hücrelerindeki genetik anormallikler ile ilgili yapılan genetik testleri içerir (5). Ayrıca

obstrüktif azospermide doğumsal duktus agenezisine yol açan kistik fibrozis gen mutasyonları da genetik testlerle saptanabilmektedir. İnfertil hastalarda güncel pratiğimizde en sık KS ve Y kromozomu mikrolelesyonu olan hastalarla karşılaşmaktayız.

Biz, yapacağımız bu çalışmada infertilite nedeniyle başvuran ve NOA tanısıyla mikro-TESE operasyonu yapılan hastaların genetik analizi sonuçlarının değerlendirilmesini amaçladık. Ayrıca ciddi genetik defekt nedeniyle mikro-TESE operasyonu yapılmayan hastalar da çalışmaya alınacaktır. Çalışmadaki ana amacımız, erkek infertilitesinde spermatogenezi zayıflatan ya da engelleyen genetik defektlerin mikro-TESE sonuçlarına olan etkisini değerlendirmek ve bu bireyler ile genetik anormalliği olmayan ve mikro-TESE operasyonu yapılan hastaların sperm bulma oranlarının karşılaştırılması olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

İnfertilite; son 12 aylık zaman diliminde korunmasız cinsel birleşme olmasına rağmen konsepsiyonun olmamasıdır. İnfertilite geçici veya çoğu azospermide olduğu gibi kalıcı olabilir ve bu duruma sterilite denir. Subfertilite ise spontan konsepsiyon ihtimalinin azalması ancak tamamen ortadan kalkmamasıdır. Primer erkek infertilitesi bir erkeğin bir kadını gebe bırakamaması durumudur. Sekonder erkek infertilitesi ise bir erkeğin, partnerinin aynı veya farklı olmasına ya da gebeliğin sonucuna bakılmaksızın daha önce başarılı bir konsepsiyonunun olması durumudur.

Fertilite, erkek ve kadın üreme sistemlerinin anatomik ve fonksiyonel olarak normal çalışmasına bağlıdır. Çiftlerin birinde veya her ikisinde bu faktörlerden birisinde bozukluk mevcut olabilir. Bu nedenle infertilite araştırması çiftin ortak bir problemi olarak ele alınmalıdır. İnfertilite nedeniyle tetkik edilen çiftlerin %40'ında birden fazla etiyolojik neden söz konusudur. Eski çalışmalar; infertilite olgularının %20'sini tek başına erkek faktörü ile ilişkilendirirken, %30-40'ı ise hem erkek hem de kadın faktörü patolojilerini içermekteydi (6). Daha yeni çalışmalarda ise infertilite tanı ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen %50'nin üzerindeki hastada erkek faktörünü sorumlu tutulmaktadır (7). Bu sebeple infertiliteyle başvuran çiftlerin incelenmesinde başlangıç olarak erkek partner incelenmelidir; erkeğin öncelikli araştırılması ucuz, kolay ve çabuk sonuçlanabilir olduğundan daha avantajlıdır.

İnfertilite vakalarının %50'sinde erkek üreme yetmezliği ya da disfonksiyonu rol oynar. Erkek infertilitesine yol açan nedenlerin bir kısmı edinilmiş ürogenital anomaliler, malignansiler, ürogenital enfeksiyonlar, varikozel gibi skrotumda sıcaklık artışı yaparak sperm kalitesini bozan durumlar, endokrin bozukluklar, beslenme bozuklukları ve immunolojik faktörler gibi sonradan oluşabilir, bir kısmı ise genetik kökenlidir (8). Avrupa Üroloji Derneği 2015 kılavuzuna göre infertilite nedenleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Erkek infertilitesinin etiyolojik faktörlere göre dağılımı (EAU Kılavuzu, 2015)

| HASTALIK | ORAN (%) |
|--|-----------------|
| İnfertilitenin Bilinen Sebepleri | 42.6 |
| İnmemiş Testis | 8.4 |
| Varikosel | 14.8 |
| İmmünolojik nedenler | 3.9 |
| Diğer | 5.0 |
| İdiopatik İnfertilite | 30 |
| Hipogonadizm | 10.1 |
| Klinefelter sendromu (47,XXY) | 2.6 |
| 46, XX erkek | 0.1 |
| Primer Hipogonadizm | 2.3 |
| Sekonder Hipogonadizm | 1.6 |
| Kallmann Sendromu | 0.3 |
| İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizm | 0.4 |
| Geç Başlangıçlı Hipogonadizm | 2.2 |
| Gecikmiş Puberte | 1.4 |
| Diğer | 0.8 |
| Sistemik Hastalıklar | 2.2 |
| Maligniteler | 7.8 |
| Testis Kanseri | 5.0 |
| Lösemi / Lenfoma | 2.2 |
| Sarkoma | 0.6 |
| Ereksiyon / Ejakülasyon Bozukluğu | 2.4 |
| Obstrüksiyon | 2.2 |
| Vazektomi | 0.9 |
| Kistik Fibrozis | 0.5 |

Tüm tanısal ilerlemelere rağmen infertil erkeklerin bir kısmında kanıtlanmış bir neden bulunamamıştır. Bu gruptaki hastalar spesifik tedavilere yanıtızdırlar. İdiyopatik bozukluklar olarak anılan bu grup EAU'nun 2015 kılavuzuna göre infertil erkeklerin %30'unu oluşturmaktadır. Her ne kadar infertilite araştırması için kabul gören yaygın görüş 12 aylık korunmasız cinsel birleşme döneminin beklenmesi yönünde olsa da 12 aydan önce yapılan sınırlı ama yeterli bir değerlendirme fertilitiyi azaltabilecek faktörlerin tanınması ve düzeltilmesini sağlamanın yanı sıra ruhsal olarak sıkıntılı bir durumda olan çiftlere de güven verir. Bu sayede infertiliteye bağlı anksiyetenin giderilmesi bile tek başına tedavi değerine sahiptir. Amerika Üroloji Derneği kılavuzuna göre bilateral inmemiş testis hikayesi olan ve 35 yaş üzeri kadın yaşı olan çiftlerde 1 yıllık süre beklenilmeden infertilite etiyojisini araştırmaya yönelik tetkikler yapılarak tedavi yolları belirlenmelidir.

İnfertilitede başarılı bir tanı ve tedavi için ayrıntılı tıbbi hikaye almaya dikkat edilmelidir. Değerlendirme ayrıntılı bir anamnezin yanı sıra iyi bir fizik muayene, semen analizi ve temel laboratuvar testlerini içerir şekilde noninvaziv ve maliyet koruyucu olmalıdır. Gerektiğinde ileri semen analizleri, hormonal, genetik, endokrin ve radyolojik tetkiklerden de yararlanılabilmektedir. Erkek infertilitesi değerlendirilirken kadın faktörü de mutlaka gözönünde bulundurulmalı ve temel infertilite testleri mutlaka yapılmalıdır.

2.1. Anamnez

Anamnez alırken dikkat edilmesi gereken noktalar; medikal tedavi veya yaşam tarzı değişiklikleri ile düzeltilebilecek patolojileri saptamak, infertiliteye sebep olabilecek eşzamanlı hastalıklar ve gelecek nesilleri etkileyebilecek genetik hastalıkların tespitine dayanmaktadır. Her ne kadar fertilitiyi etkileyen uzun süreli faktörler üzerinde yoğunlaşmış olsa da radyoizotop ile işaretleme çalışmalarına dayanarak spermatogenezin yaklaşık 64 günlük siklusu olduğu ve epididimlerden geçiş zamanı olarak da buna 5-10 gün eklendiğinde bu sürecin yaklaşık 74 gün olduğu gösterilmiştir (9). Semen analizinden birkaç ay önce geçirilmiş ateşli hastalık ya da ilaç kullanımı gibi faktörlerin olması spermatogenez üzerinde geçici olumsuz etkiler yaratabileceği için semen analizi hakkında daha sağlıklı bilgi edinmek amacıyla testin 3 ay sonra tekrarlanması önerilmektedir.

Çiftler infertilite nedeniyle başvurduklarında infertilitenin sebebini anlamaya yönelik anamnez alınmalıdır. Anamnezde kadın ve erkeğin ayrı ayrı önceki ve şimdiki fertilitate statüsü araştırılmalı, çiftlerin yaşı ve korunmasız cinsel ilişki süresi sorgulanmalıdır. Çiftin fertilitate

potansiyelini negatif yönde etkileyen faktörler; kadın yaşının 35'in üzerinde olması, daha önceden bilinen infertilite öyküsü, inmemiş testis, testis kanseri öyküsü, kemoterapi almış olması, endometriyozis ve pelvik inflamatuvar hastalık gibi organik bozuklukların bulunmasıdır.

İnfertilite nedeniyle başvuran çiftlerin %5'inde cinsel disfonksiyon bulunmaktadır. Cinsel öyküde ejakülasyonun olup olmadığı, ilişkide kayganlaştırıcı kullanımı, ilişkinin sıklığı ve zamanlaması sorgulanmalıdır. Vajinal lubrikanlar üreme yaşlarındaki çiftlerde sık kullanılır. Spermisid olarak pazarlanmayan çok sayıdaki lubrikanın sperm hareketini ve sperm DNA bütünlüğünü olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Sebze yağı, çiğ yumurta beyazı ve pre-seed gibi lubrikanlar minimal spermisid etkiye sahiptirler de mümkünse lubrikan kullanmaktan kaçınılması, gerekiyorsa toksisitesi en düşük olan, minimal konsantrasyonda lubrikanın kullanılması en idealidir (10).

Fertilite için cinsel ilişkinin zamanı oldukça önemlidir. Zamanlamada canlı sperm mevcut bir oosite ulaşması amaçlanmaktadır. Bu nedenle oositin mevcut olacağı siklus ortasındaki tahmini LH (Lüteinizan Hormon) piki zamanında, bu zamandan 2 gün önce ve 2 gün sonra cinsel ilişki önerilmektedir. Cinsel ilişki sıklığı fazla olursa epididim içerisinde yeterli sayıda sperm depolanamaz. Bunun yanı sıra çok seyrek cinsel ilişki de potansiyel fertilizasyon zamanının kaçırılmasına neden olabilir (11).

Erkek partnere ejakülatın miktarı ve natürü sorulmalıdır. Ejakülat hacminin ciddi azalması hipogonadizm ile ilişkili olabileceği gibi şeffaf ve çok akışkan olması seminal vezikül patolojisi, ejakülatuar kanal patolojisi veya kistik fibrozisi akla getirir. Normal orgazma rağmen ejakülasyonun olmaması retrograd ejakülasyonu düşündürmeli ve postejakülatuar idrarın sperm varlığı açısından değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır. Likefiye olmayan ejakülat prostat patolojisine işaret eder.

İnmemiş testis yenidoğan ve 1 yaşında olan çocukların % 0.8'inde görülen ve fertilite statüsünü etkileyen bir patolojidir. Tek taraflı inmemiş testis öyküsü bulunan erkeklerin %50'si, çift taraflı inmemiş testisi bulunan erkeklerin %90'ı subfertilidir. Çocukluk çağında herni onarımı %3-17 oranında vaz deferens hasarına sebebiyet vermektedir. Ergenlik döneminde geçirilen kabakulak enfeksiyonu %30 unilateral, %10 bilateral orşitle sonuçlanır ve bunun sonucunda da testis içi fibrozis dolayısıyla infertilite gelişebilmektedir (12). Testis torsiyonu veya testis travması testis atrofisinin yanı sıra antisperm antikörlerinin gelişimine yol açabilir, bu duruma bağlı sperm fonksiyonları ve motilitesi zarar görebilir (13).

Hastanın geçirmiş olduğu ya da halen devam eden hastalıkları ve bu nedenle kullandığı ilaçlar detaylıca sorgulanmalıdır. Benign prostat hiperplazisinde ve hipertansiyonda sık kullanılan alfa bloker tedavisi retrograd ejakölasyona neden olur. Finasterid ve 5-alfa redüktaz inhibitörleri gibi yine benign prostat hiperplazisinde kullanılan ilaçlar semen volümünde azalmaya yol açabilirler. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri, fenotiyazinler ve lityum gibi psikoterapik ilaçlar hipotalamus-hipofiz-gonad aksını baskılayabilir, ejakölasyon ve ereksiyon fonksiyonlarını bozabilir ve libidoyu azaltabilirler (14). İster tedavi ister uyarı amaçlı kullanılıyor olsun, dışardan alınan testosteron ve steroidler medikal ajanlar arasında fertiliteye en fazla zararlı etkiye bulunabilen ajanlardır. Eritromisin, nitrofurantoin, tetrasiklin ve gentamisinli antibiyotikler doğrudan gonadotoksik etki gösterir. Simetidin, anabolik steroidler, sulfasalazin ve nitrofurantoin ilaçları da spermatogenezi olumsuz etkilerler. Erişkin yaşlarda geçirilen sistemik hastalıklar değişik mekanizmalarla fertilitayı etkileyebilir. Diyabetes Mellitus, spinal kord travmaları ve multiple skleroz hem ejakölasyon hem de ereksiyon fonksiyonlarını bozarak etki gösterir (15, 16). Hipo ve hipertroidi ise hem steroid hormon metabolizmasını hem de sperm kalitesini etkileyerek subfertiliteye yol açabilir (17).

Genel olarak neoplazmlar, endokrinolojik bozukluk, beslenme bozukluğu, ateşle birlikte seyreden metabolizmada artış ve immunolojik faktörler nedeniyle spermatogenezde belirgin bozulma yapabilir (18). Malignitenin üreme sıklığı üzerine global etkisinin yanı sıra, Hodgkin hastalığı ve testiküler germ hücreli tümör gibi spesifik maligniteler doğrudan ciddi gonadotoksik etki yaratabilir (19). Kemoterapi ve radyoterapiyi içeren kanser tedavisi canlı germ hücreleri üzerine doğrudan toksik etki yaratır ve potansiyel olarak yıllarca spermatogenez fonksiyonlarını baskılar (20).

Geçirilmiş skrotal, inguinal ya da retroperitoneal cerrahi girişimler kanallarda tıkanıklık yaratabilir veya spermin emisyonu ya da ejakölasyonunu bozabilir. Testis kanserinde yapılan klasik retroperitoneal lenfadenektomi sıklıkla sempatik sinirlerde yaralanmayla sonuçlanabilmekte ve bu da anejakölasyon veya retrograd ejakölasyona yol açabilmektedir (21). Mesane boynu cerrahisi ve transüretal prostat rezeksiyonu da mesane boynunda yetmezlik yaparak retrograd ejakölasyona yol açabilir. Puberte yaşı bir diğer önemli parametre olup çok erken dönemde puberte bulguları konjenital adrenal hiperplazi, çok geç gerçekleşen pubertede primer hipogonadizm veya sekonder hipogonadizme bağlı olabilir.

Hastanın özgeçmişinde madde kullanımı sorgulanmalıdır; alkol, sigara, marihuana ve kokain gibi maddeler direkt gonadotoksiktir. Hastanın çevresel şartları sorgulanmalı ve gonadotoksik faktörler; aşırı sıcaklık, iyonize radyasyon, ağır metaller, ziraat ilaçlarına maruziyet açısından hasta değerlendirilmelidir. Sigara içiminde sperm konsantrasyonu, canlılığı, ileri motilitesi ve morfolojisi gibi temel semen parametrelerinin yanı sıra spermin penetrasyon potansiyel ve dolayısıyla fertilizasyon oranlarında da düşüş görülür (22, 23).

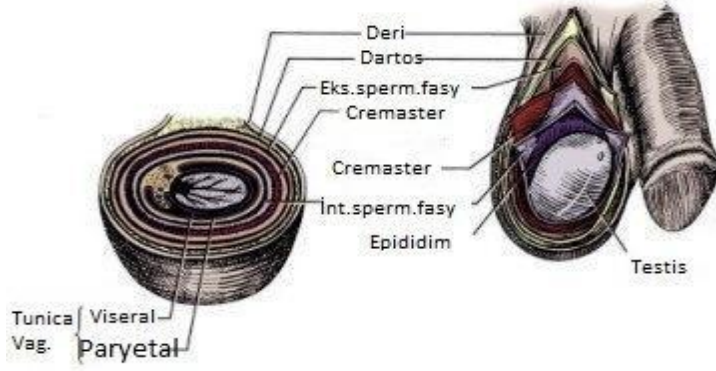
İnflamatuvar hastalıkların genital sistemin bütünlüğü ve spermatazoa fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri olabilir. Prostatit ya da chlamydia veya neisseria gonorrhoea benzeri cinsel yolla bulaşan enfeksiyöz hastalıklarda semen parametrelerinde bozulma, sperm DNA fragmentasyonunda artış ve fertilitede azalma ile sonuçlanan yüksek oksidatif stres ve lökospemi ile karşılaşılabilir (24). Sarkoidoz, tüberküloz gibi granülomatöz hastalıklar epididimde granülom oluşturarak obstrüksiyona yol açar ve sekonder infertiliteye neden olabilirler.

Son olarak anamnez alınırken kadın partnerin fertilesine yönelik değerlendirme de yapılmalıdır, çünkü infertilitenin üçte ikisinde ya tek başına ya da erkek faktörü ile birlikte kadın tarafı sorumlu tutulmaktadır. İleri yaş, düzensiz adet siklusları, endometriyozis ve pelvik enfeksiyon içeren pelvik patoloji hikayesi kadında subfertilite için risk faktörleri arasında yer alır. Doğurganlıkta 35 yaşından sonra keskin bir düşüş başlar ve 40 yaşına gelindiğinde fertilité potansiyeli %5'e kadar düşer (25).

2.2. Erkek Genital Sistemi Anatomisi

2.2.1. Skrotum

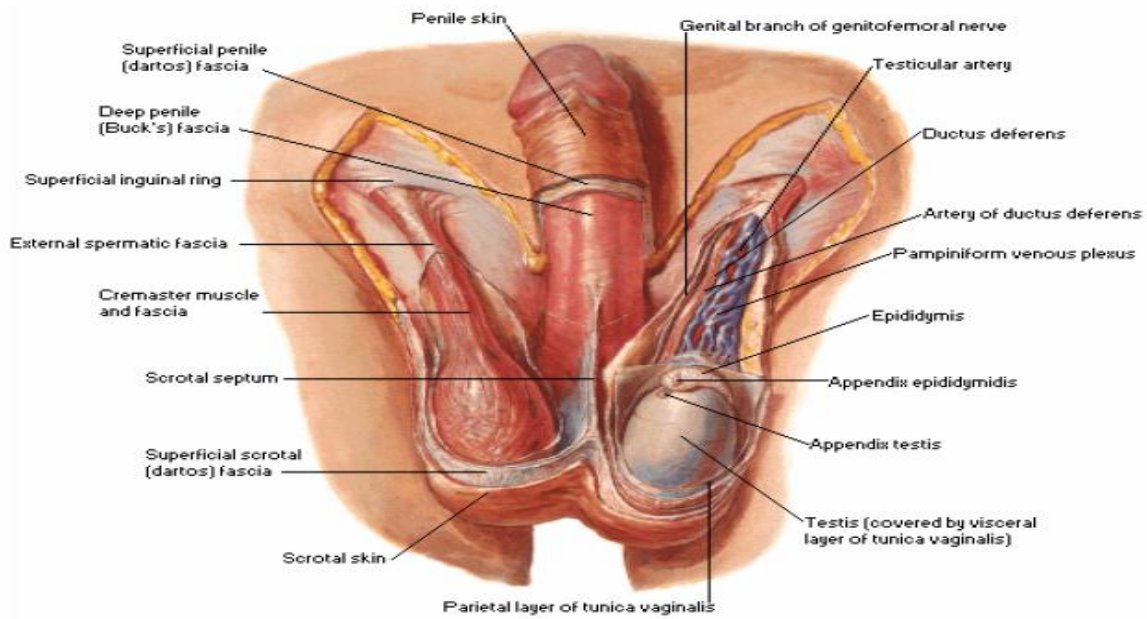
Skrotum, testis ile funikulus spermatikusun alt kısmını içine alan, deri ve fibromusküler yapıda bir torbadır. Skrotumu dıştan ikiye ayıran deri kabarıntısına raphe skroti adı verilir. Sol funikulus spermatikusun sağa göre daha uzun olmasından dolayı skrotumun sol yarımı sağa göre daha aşağıda yer alır. Skrotum dıştan içeri doğru, deri (kutis skroti), tunika dartos, fasya spermatika eksterna, fasya kremasterika ve bu fasyanın sardığı musculus kremasterika, fasya spermatika interna ve tunika vajinalis tabakalarından oluşur.



Şekil 2.1. Skrotum ve katları (Pansky B. Review of gross anatomy. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 1987. p. 483)

Tunika dartos, düz kas liflerinin (muskulus dartos) oluşturduğu bir tabakadır ve bu kas tabakasının deriye tutunmasından dolayı kasılması ile skrotum büzüşür. Bu olay skrotal ısının değişkenliğinin önüne geçmesi dolayısıyla spermatogenezis açısından çok önemlidir. Normalde testisler skrotumda, vücut ısısından 2-3 °C daha soğuk ortamda bulunurlar.

Skrotum; arteria pudenda interna 'nın, arteria pudenda eksterna ve arteria epigastrica inferior'un dalları tarafından beslenir ve aynı isimli venler ile de venöz drenaj sağlanır (26).



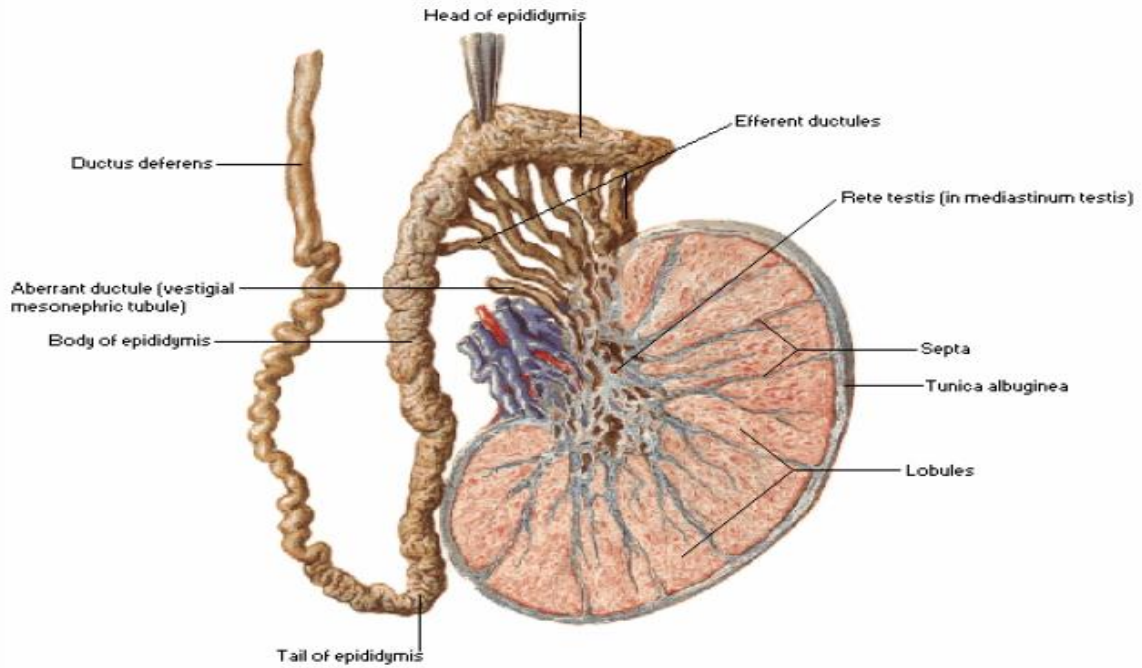
Şekil 2.2. Skrotum ve testis anatomisi (Netter 2006)

2.2.2. Testis

Testisler skrotum içerisinde yer alırlar. Testisler funikulus spermaticus aracılığıyla skrotum içinde asılı durmaktadırlar. Her biri yaklaşık 10-14 gr ağırlığındadır. Testislerin üst ucunda paramezonefrik kanal artığı olan appendix testis adı verilen küçük yassı bir yapı bulunur. Testislerin posterolaterallerinde epididimisler yer alır.

Testisler fetal hayatta karın boşluğu içerisinde fasya transversalis ve periton arasında gelişir. Doğumdan önce inguinal kanaldan geçerek skrotum içine iner. Fetal hayatta testis ile skrotum iç yüzü arasında uzanan gubernaculum testis adı verilen fibröz bir yapı bulunur. Bu yapı testisin skrotuma inmesine aracılık etmektedir.

Tunica vajinalis dışında testisleri saran iki tabaka daha bulunmaktadır bunlar dıştan içe doğru tunika albugenia ve tunika vaskülozadır. Tunika albugenia; testisleri örten kalın, fibröz bir tabakadır. Elastikiyeti ve genişleme özelliği olmayan bu tabaka arka taraftan testis içine sokularak testis içerisinde vertikal bir bölme oluşturur. Bu bölmeye mediastinum testis adı verilir. Mediastinum testisin uzantıları olan septula testisler ve onların oluşturduğu koni biçiminde lobuli testisler içinde seminifer tübüller bulunmaktadır. Bütün lobuluslardan gelen uzantılar mediastinuma sokulur ve burada rete testis denilen ağı oluşturur. Lobuli testislerde yapılan spermiumlar rete testisten ductuli efferentes testis aracılığı ile epididimise gelir.



Şekil 2.3. Testis anatomisi (Netter 2006)

Testisler aorta abdominalis'in dalları olan arteria testicularisler tarafından beslenmektedirler. Her bir testisin arka tarafından çıkan küçük venler birleşerek pleksus pampiniformis adı verilen venöz ağı oluşturur. Bu pleksus, funikulus spermatikus içerisinden yükselir ve buradan inguinal kanal içerisinden geçerek testiküler venleri oluşturur. Sol testiküler ven vena renalis'e, sağ testiküler ven ise vena cava'ya dökülür (26).

2.2.3. Epididimis

Spermiyumlar için bir depo görevi gören epididimislerin kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç kısmı vardır. Kaput epididimisin üstünde bulunan Wolf kanal artığı appendiks epididimis bulunmaktadır. Testisten çıkan duktuli efferentes testis kaput epididimis olarak devam eder (26).

2.2.4. Duktus Deferens

Spermiyumları ileten kanal sisteminin kauda epididimisten sonra gelen kısmıdır. Funikulus spermatikus içerisinde yukarı yükselir. Mesanenin arkasında üreteri çaprazlayarak vesikula seminalisin kanalı olan duktus ekskretorius ile birleşerek duktus ejakulatoryusu oluşturur (26).

2.2.5. Vesikula (Glandula) Seminalis

Mesanenin arka alt yüzü ile rektum arasında bulunan 5cm'lik bir çift organdır. Duktus ekskretorius adı verilen kanalları duktus deferens ile birleşir ve duktus ejakulatoriusları oluşturur. 2 cm uzunluğundaki bu kanal prostatik üretraya açılır (26).

2.2.6. Prostat

Pelvis minörde mesanenin alt tarafında diafragma urogenitalenin üstünde rektumun önünde bulunan fibromuskuler doku içine yerleşmiş glandüler yapılardan oluşan bir organdır. Pubis ile arasında bulunan bağ dokusuna ligamentum puboprostatikum adı verilir. Prostat tubuloalveolar bezlerden ve bu bezlerin arasını dolduran ara dokudan meydana gelir. Prostat salgısı hafif alkali olmakla birlikte, asit fosfataz, sitrik asit ve fibrinolizin içerir. Prostat; arteria pudenda interna, arteria vesikalis inferior ve arteria rektalis mediadadan gelen dallar tarafından beslenir (26).

2.3. Fizik Muayene

2.3.1. Genel Muayene

Fertilite, genel sağlık durumunun göstergesi olabileceği için fizik muayene sadece genital muayene ile sınırlı olamamalıdır. Vücudun genel yapısı ve virilizasyon düzeyi androjenizasyon ile ilgili ipuçları vermektedir. Androjen yetersizliğinde vücut kıllarında azalma, temporal bölgede erkek tipi saç dökülmesinin olmaması ve jinekomasti saptanmaktadır. Vücut yapısında saptanan bu tür anormallikler, düşük testosteron düzeyi, hiperprolaktinemi, östrojen-testosteron oranının bozulması, adrenal bezin disfonksiyonu ve subvirilizasyona neden olan KS gibi genetik anomalileri ayırıcı tanıda düşündürmektedir. Puberte döneminden itibaren androjen düzeyinin düşük seyretmesi epifizde kapanmanın gecikmesine ve dolayısıyla uzun kol ve bacak görünümüne neden olmaktadır. Tiroid bezinin hiper ve hipofonksiyonu infertilite sebepleri arasında yer aldığından tiroid bezi muayene edilerek nodül aranmalıdır. Batın muayenesinde hepatomegali saptanması halinde steroid metabolizmasının bozukluğuna yol açan karaciğer disfonksiyonu akla gelmelidir. Hastada eski operasyonlara sekonder skar izleri varsa bunlar not edilmelidir.

2.3.2. Genital Muayene

Genital muayeneye fallusun dikkatli muayenesi ile başlanmalıdır; penil kurvatur, kordi veya hipospadias vajinada sperm birikimine engel olabilir. Testis muayenesi hem ayakta hem yatarak yapılmalı, kremasterik kasların gevşemesine yardımcı olmak için sıcak bir ortam sağlanmalıdır. İnfertilite testis maligniteleri için risk oluşturduğundan testis kitlelerini ekarte etmek için tüm testis yüzeyi dikkatlice palpe edilmelidir. Testis hacmi mutlaka hesaplanmalıdır; bunun için orşidometri veya ultrasonografi kullanılmalıdır. Sağlıklı genç bir erkekte, oval şekildeki testis longitudinal olarak 4.5-5.1cm boyutlarında ve 15-25 ml hacminde olmalıdır (27). Testis volümünün %85'i sperm yapımıyla ilişkili olduğu için düşük testis hacmi spermatogenezde bozukluğu işaret etmektedir. Epididimler endurasyon veya genişlemeyi tespit etmek için dikkatli bir şekilde muayene edilmelidir. Epididimlerde genişleme obstrüktif patolojiyi, endurasyon ise enflamasyonu akla getirmelidir. Tüberküloz veya sarkoidozda epididimde granülatöz değişiklikler oluşmaktadır. Epididimde küçük kistler sık görülmekte ve spermatoseli işaret etmekte iken kistadenomlar nadir görülürler ve Von Hippel Lindau hastalığını düşündürmektedir.

Spermatik kordun supin ve özellikle ayakta muayenesi varikosel varlığı açısından yapılmalıdır. Varikosel normal popülasyonda %15 oranında görülürken infertil erkeklerde bu oran %19-40 arasında değişmekte fakat sekonder infertil erkeklerde bu oran %80'e kadar çıkmaktadır (28). Varikosel sıklıkla sol tarafta görülür. Sağ tarafta unilateral varikosel varlığı veya supin pozisyonda kaybolmayan sağ varikosel varlığı retroperitoneal kitleyi düşündürmeli ve acil batin görüntüleme yapılmalıdır. Spermatik kord muayenesinin diğer önemli unsuru vaz deferensdir. Vaz deferensin unilateral veya bilateral yokluğu aynı tarafta renal ageneziyi veya kistik fibrozis gibi genetik nedenleri akla getirmelidir.

Son olarak parmakla rektal muayene yapılarak ejakülatuar kanal obstrüksiyonuna neden olabilecek prostat orta hat kistleri, prostatite işaret eden ödem ve hassasiyet değerlendirilmelidir. Normalde seminal vezikül rektal digital muayenede palpe edilmezken obstrüktif ejakülatuar kanal patolojilerinde palpe edilebilmektedir.

2.4. Laboratuvar Değerlendirme

2.4.1. Semen Analizi

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde ilk yapılması gereken laboratuvar analizi, semen analizidir. Fertilité derlendirilmesinde temel olarak ayrıntılı bir öykü, fizik muayene ve en az 2 semen analizi ile değerlendirilmeye başlanması kabul görmüştür. Eğer ilk semen incelemesi güvenilir ve Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre normal ise ikinci teste gerek duyulmayabilir. Temel sperm analizi pahalı olmayan bir testtir ve spermatozoa kalitesini ve sayısını ortaya koyar.

Hekimler hastadan semen toplama işlemini standart kılavuzlar ışığında yapmalıdır. Semen suboptimal toplanması semen analizinde yapılan en sık yanlışlardan biridir. Toplama öncesi 2-7 günlük cinsel perhiz süresi gereklidir. En az 7 gün arayla iki farklı örnek incelenmelidir. Motilite sonuçlarını bozabileceğinden dolayı kayganlaştırıcı kullanımından kaçınılmalıdır. Koitus interruptus (geri çekme) yöntemi ile spermin çoğunu içeren semenin ilk parçasının elde edilemeyebileceği için sonuçların hatalı çıkmasına yol açabilmektedir.

Önerilen yöntem klinik ortamda yapılan masturbasyondur. Glans ve penis ıslak bir kağıt mendil ile silinmelidir sabun kullanılmamalıdır. Kayganlaştırıcı kullanılmamalıdır ancak mutlaka kullanılacaksa da glansa sürülmemelidir. Bazı erkeklerde ereksiyon bozukluğu veya ejakülasyon bozukluğu durumunda işlemden önce fosfodiesteraz 5 inhibitörü gibi ilaçlar oral

yoldan verilmek kaydıyla uygulanabilir. Hasta, masturbasyonla sperm verme konusunda sıkıntılı ise bu durumda spermid içermeyen seminal poşlar, seksüel aktivite ile sperm alınmasına yardımcı olabilir. Penis etrafında vakum oluşturarak basınç farkına sebep olan ve korpuları kanla doldurarak ereksiyona sebep olan cihazlar kullanılabilir. Spinal kord hasarı olan ve seviyesi T8 ve üzeri olan hastalarda vibrasyonla stimülasyon kullanılabilir. Rektal proba elektro stimülasyon, hipogastrik plexusun efferen fiberlerini uyararak ejakülasyonu sağlar. T6 ve üzeri gibi yüksek seviyeli hasarı olanlarda bu durum otonomik disrefleksi ile hayatı tehdit eden hipertansiyona yol açabileceği için gereken hastalarda işlem öncesi bu duruma yönelik tedbirler alınmalıdır. Avrupa Üroloji Derneği kılavuzuna göre semen parametreleri Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Semen özellikleri için alt referans değerleri (EAU Kılavuzu, 2015)

| Parametre | Alt referans sınırı |
|--|---------------------|
| Semen hacmi (mL) | 1,5 (1,4-1,7) |
| Toplam sperm sayısı (10^6 ejakülat) | 39 (33-46) |
| Sperm konsantrasyonu (10^6 /mL) | 15 (12-16) |
| Total motilite (İH + YH) | 40 (38-42) |
| İleri hareketli (İH, %) | 32 (31-34) |
| Canlılık (canlı spermatozoa, %) | 58 (55-63) |
| Sperm morfolojisi (normal formlar, %) | 4 (3,0-4,0) |
| Diğer uzlaşmış eşik değerleri | |
| pH | >7,2 |
| Peroksidaz-pozitif lökosit (10^6 /ml) | <1 |
| Opsiyonel incelemeler | |
| MAR testi | <50 |
| İmmunobead test | <50 |
| Seminal çinko (μ mol/ejakülat) | $\geq 2,4$ |
| Seminal fruktoz (μ mol/ejakülat) | ≥ 13 |
| Seminal nötral glikozidaz (mU/ejakülat) | ≤ 20 |

Semen örneği, üretildikten ve laboratuara alındıktan sonra 1 saat içerisinde incelenmeye alınmalıdır. İncelemedeki gecikmeler motilitede bozulmaya yol açmaktadır.

Spermatoza sayısının 15 milyon/mL den düşük olmasına oligospermi denilmektedir. Sperm hareket bozukluğuna, yani hareketli spermatozoa sayısının %40'ın altında olmasına astenospermi, normal sperm morfolojisinin Kruger sınıflamasına göre %4 'ün altında olmasına ise teratospermi denilmektedir. Genellikle bu üç anomali birlikte bulunur ve bu duruma Oligo-asteno-teratospermi sendromu denmektedir. Azospermisi ve ciddi oligospermisi olan hastalarda genital sistem obstrüksiyonu ve genetik anomali insidansı artmaktadır. İnfertil hastalarda semen parametrelerine göre hastalar gruplandırıldığında Tablo 2.3'te gösterildiği gibi en sık karşılaşılan sonuç % 55 ile normal olan gruptur (29).

Tablo 2.3. İnfertilite ile başvuran hastaların semen analizi bulgularına göre dağılımı

| TİP | GÖRÜLME SIKLIğI (%) |
|---------------------------|----------------------------|
| Anormal semen parametresi | 37 |
| Hareket bozukluğu | 26 |
| Astenospermi | 24 |
| Oligospermi | 8 |
| Aglütinasyon | 2 |
| Hacim | 2 |
| Morfoloji | 1 |
| Azospermi | 8 |
| Tüm parametreler normal | 55 |

2.4.2. Hormonal Değerlendirme

Erkek infertilitesinin sık bir sebebi olmasa da infertil erkeklerin yaklaşık %3'ünde altta yatan bir endokrin patoloji söz konusudur. Bazı yazarlar, tüm hastalarda hipotalamo-hipofizo-gonadal aksın rutin incelemesini önersele de, konsensus görüşü endokrin değerlendirmenin, anormal düşük sperm konsantrasyonu (özellikle 10 milyon/ml'nin altı), bozulmuş seksüel fonksiyon veya testis hacminin anlamlı derecede düşük olması veya jinekomasti gibi endokrinopati düşündüren durumlarda yapılması yönündedir (30).

Endokrin değerlendirme endikasyonu olan hastalarda başlangıç testleri serum Folikül Stimülan Hormon (FSH) ve sabah serum testosteron düzeylerini içermelidir. Gonadotropinler

ve testosteron pulsatil salınım göstermektedir. Kabul gören görüş serum örneğinin sabah alınması şeklindedir. Normal şartlarda FSH sekresyonu, sertoli hücrelerinden sentezlenen inhibin B tarafından inhibe edilir. Serum FSH seviyesindeki artış, primer testiküler yetmezlik (hipergonadotropik hipogonadizm) gibi spermatogenez bozukluklarına işaret eder. Normal FSH düzeyi spermatogenez bozukluğunu ekarte ettirmez. Obstrüktif azospermide genelde normal gonadotropin ve testosteron düzeyleri mevcuttur. Düşük testosteron düzeyi, hipofiz veya hipotalamus kaynaklı hipogonadizme veya primer testiküler yetmezliğe işaret edebilir. Başlangıç testleri anormal ise total ve serbest testosteronu içerecek şekilde testosteron düzeyi tekrar edilmeli, LH ve serum prolaktin düzeyi ölçümü yapılmalıdır. Serum FSH ve LH düzeylerinde düşüklük olması Kallmann sendromu gibi hipogonadotropik hipogonadizm sebeplerine işaret eder. Bu durumda tiroid stimulan hormon, adrenokortikotropik hormon ve büyüme hormonu ölçümlerini de içerecek şekilde tam bir hipofiz değerlendirmesi gerekmektedir (31). Serum FSH, LH ve testosteron seviyelerinin çeşitli klinik durumlardaki düzeyleri Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Serum FSH, LH ve testosteron seviyelerinin çeşitli klinik durumlardaki düzeyleri (Campbell-Walsh 2012, Bölüm 21)

| Tanı | FSH (mIU/mL) | LH (mIU/mL) | Testosteron (ng/dl) |
|---------------------------------------|--------------|--------------------|---------------------|
| Normal | Normal | Normal | Normal |
| Obstrüksiyon | Normal | Normal | Normal |
| Primer Testiküler Yetmezlikler | | | |
| Hipospermatogenez | Yüksek | Normal veya Yüksek | Düşük |
| Germ Hücre Aplazisi | Yüksek | Normal veya yüksek | Normal veya Düşük |
| Matürasyon Arrest | Normal | Normal | Normal |
| Klinefelter Sendromu | Yüksek | Yüksek | Düşük |
| Hipogonadotropik Hipogonadizm | Düşük | Düşük | Düşük |

Östrojen fazlalığı, kaynağı ne olursa olsun hipotalamustan gonadotropin relasing hormon salınımını azaltarak hipofiz bezinden gonadotropin salınımının azalmasına yol açar. Bu durumda klinik olarak jinekomasti, azalmış libido, erektil disfonksiyon görülmektedir. Artmış serum östrodiol düzeyleri, eksojen alıma bağlı olabilse de daha sıklıkla adipoz dokuda testosteronun östrodiol aromatisasyonuna bağlıdır. Östrodiol, serum serbest testosteron seviyesini düşüren seks hormonu bağlayıcı globulin üretimini artırır.

Nadiren de olsa adrenal veya tiroid fonksiyonlarını bozan durumlar da erkek infertilitesi ile karşımıza çıkabilir. Konjenital adrenal hiperplazi hastalarında puberte prekoks öyküsü ve epifiz plaklarının erken kapanmasına bağlı kısa boy mevcuttur. Bu hastalar genel olarak fertil olmalarına karşın birçoğunda artmış androjen seviyelerine sekonder olarak hipofizer baskı oluşur. Bu da testiküler yetmezliğe yol açar. Tiroidin hem hiper hem de hipofonksiyonu erkek infertilitesi ile ilişkili olabilir ancak subklinik hipotiroidizm semen parametrelerini etkilemez (32).

2.5. Radyolojik Değerlendirme

İnfertil erkeklerde, radyografik değerlendirme vaz deferens veya ejakülatuar kanalda genital trakt obstrüksiyonu olup olmadığını ortaya koymaya veya testiküler kitle ve renal anomali gibi ilişkili patolojileri ekarte etmeye yöneliktir. Burada tarif edilen testler her hastada gerekli değildir ancak uygun endikasyonda mutlaka makul biçimde kullanılmalıdır.

2.5.1. Transrektal Ultrasonografi

Transrektal ultrasonografi prostat, seminal veziküller, vaz deferens ampullası ve ejakülatuar kanallar hakkında mükemmel bilgi verir. Transrektal ultrasonografi primer olarak ejakülatuar duktus obstrüksiyonu şüphesi olan hastalarda kullanılır. Bu hastalarda genellikle düşük ejakulat volümü, azospermi (hacim < 1 mL), asidik pH ve negatif semen fruktozu vardır. Verumontanumun dikkatli muayenesi ile wolf ya da müler kanal kistleri gibi orta hat prostatik kistleri ya da ejakülatuar kanalları tıkayan taşlar ortaya çıkarabilir. Ejakülatuar kanallar genellikle iyi görüntülenemez ancak seminal veziküllerin dilatasyonu ejakülatuar kanal obstrüksiyonunun fiili göstergesi olarak kabul edilir. Her zaman ejakülatuar kanal obstrüksiyonu ile birlikte görülme de seminal vezikül genişliğinin 12-15 mm'nin üzerinde olması veya ejakülatuar kanal çapının 2,3 mm'nin üzerinde olması obstrüksiyon için destekleyici bulgudur (33).

2.5.2. Skrotal Ultrasonografi

İnfertil erkeklerde skrotal doppler ultrason rutin yapılmaya bile primer olarak klinik varikozel varlığını konfirme etmek için kullanılır. Valsalva manevrası sırasında venöz kan reflüsü olması ya da spermatik ven çaplarının 3 mm ve üzerinde olması varikozel tanısını destekler. Subklinik varikozel tedavisinin klinik faydası gösterilmediği için bunların taranması için skrotal doppler ultrason kullanımını önerilmemektedir. Ayrıca ultrason, epididim ve testisin anatomisini mükemmel biçimde ortaya koymaktadır. Epididimit, epididim kistleri veya spermatosel gibi epididim boşalmasını obstrükte eden durumlar ultrason ile anlaşılabilir. Testiküler germ hücre tümörleri subfertil hastalarda daha sık görülmektedir. Palpe edilemeyen (<0,5 cm) tümörlerde bile skrotal ultrasonografi kullanılabilir.

2.5.3. Abdominal Ultrasonografi

İnfertil erkeklerde abdominal ultrasonografi vaz agenezi olan erkeklerde eşlik eden renal anomalileri ekarte etmek için kullanılır.

2.5.4. Vazografi

Erkek duktus sisteminin patensinin değerlendirilmesinde altın standart test halen vazografidir. Testis biyopsisinde normal spermatogenez saptanan azospermik hastalarda tıkanıklığın yerini tespit etmek için vazografi endikasyonu vardır. Bazen de geçirilmiş inguinal cerrahi gibi iatrojenik hasara bağlı unilateral vaz obstrüksiyonu şüphesi olan ağır oligospermik hastalarda kullanılır. Vazografi invaziv bir tetkik olması sebebiyle ideal olarak rekonstruksiyon planlanan zamanda yapılmalıdır. Böylelikle eş zamanlı onarım yapılması uygun olacaktır (34).

2.6. Erkek Üreme Sistemi ile İlgili Genetik Bozukluklar

Erkek infertilitesine yol açan birçok neden bulunmaktadır. Bu nedenlerin bir kısmı sonradan ortaya çıkabileceği gibi bir kısım hastada ise genetik nedenlere bağlı infertilite görülebilmektedir (35).

Erkek infertilitesinin genetik nedenleri;

1. Kromozomal bozukluklar (%5.8)

a. Seks (Genom, Sayısal) kromozomu bozuklukları (%4.3)

Klinefelter Sendromu (47,XXY)

46,XX Erkek Sendromu

47,XYY Sendromu

b. Otozomal (yapısal) kromozom bozuklukları (%1.5)

2. Gen bozuklukları (%10–15)

a. X kromozomu üzerinde olanlar

Kallman sendromu

Androjen duyarsızlık sendromu

b. Y kromozomu üzerinde olanlar (%8.2)

Y kromozom mikrolelesyonları

3. Tek gen defektine bağlı gelişen ve sperm fonksiyonlarını direkt etkileyen genetik sendromlar

a. Konjenital vaz deferens agenezisine neden olan kistik fibrozis gen mutasyonları (%2)

b. Primer silier diskinezi

Kartagener sendromu

Usher sendromu

c. Myotonik distrofi ve Noonan sendromu

Myotonik Distrofi

Noonan Sendromu

d. Genetik Endokrinopatiler

GnRH'nın üretim veya sekresyon bozuklukları

FSH ve LH Fonksiyon Bozuklukları

Androjen Sentez ve Fonksiyon Bozuklukları

e. Orak Hücreli Anemi

2.6.1. Kromozomal Bozukluklar

Normal insan somatik hücreleri 22 çift otozom ve 1 çift seks kromozomu olmak üzere total 46 kromozomlu diploid hücrelerdir. Erkekler X ve Y olmak üzere 2 farklı seks kromozomuna sahiptir. Kromozom anomalileri, sayısal ve yapısal anomaliler olmak üzere ikiye ayrılır (38). Sayısal kromozom anomalileri arasında en sık görüleni KS'dir. Diğer sayısal anomaliler ise 46,XX Erkek Sendromu ve 47,XXY Sendromu olarak sayılabilir. İnfertil bireylerde seks kromozomu anomalileri otozomal kromozom anomalilerinden daha sık görülmektedir. Kromozom anomalileri normal popülasyonla (%0,5) kıyaslandığı zaman, tüm infertil erkek hastalarda yaklaşık %5.1 oranında gözlemlenirken, bu oran azospermik erkek hastalarda %13.7 ve oligospermik erkek hastalarda %4.6 civarında saptanmıştır. Yapısal kromozom anomalileri delesyon, inversiyon, duplikasyon ve translokasyonlardır (39).

Sex Kromozomu Bozuklukları

Klinefelter Sendromu (47,XXY): Klinefelter sendromu veya 47,XXY erkek sendromu, NOA'nın en sık genetik sebebidir ve bu hastaların %10'unda görülmektedir (40). Bu hastaların çoğunda parental gametlerin mayotik fazında ayrılmamaya bağlı pür 47,XXY mevcutken, %10'unda mitoz sırasında ayrılmamaya bağlı mozaik karyotip izlenir. Fazla X kromozomu anne veya baba kaynaklı olabilir. Artan baba yaşı ve XY sperm KS'li çocuk için risk faktörüdür. Fazla X kromozomunun subfertilite üzerine etkisi tam olarak bilinmese de bu karyotipe sahip hastalarda ağır spermatogenetik ve androjenik bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Klinefelter, 1942 yılında jinekomasti, hipogonadotropik hipogonadizm ve infertiliteden oluşan triadı ilk kez tanımlamıştır (41). Bu ilk tanımlamadan sonra KS'nin birçok başka özelliği ortaya konmuştur. En ağır formunda puberte olmamakta veya gecikmekte, virilizasyon yetersiz olmakta ve anükoid görünüm izlenmektedir. Bu hastalar uzun bacaklar, dar omuzlar, kısa gövde ile uzun ince bir vücut yapısına sahiptirler. Genellikle adölesan dönemde doktora giderler ve puberte indüksiyonu için testosteron replasmanı uygulanabilir. Bir diğer grup ise puberte için yeterli androjen seviyesine sahip ancak erişkin dönemde fertilite değerlendirilmesi sırasında KS saptanan hastalardır. Her iki grupta da başta küçük testis boyutu (<8-10 ml testis hacmi), artmış gonadotropin düzeyleri ve azospermi olmak üzere ortak klinik özellikler vardır (42).

Çoğu KS hastasında azospermi bulunmakla birlikte bazı hastalarda yardımcı üreme yöntemlerine gerek duyulmaksızın gebelik oluşabilmektedir. Klinefelter sendromlu hastalarda

santrifüje edilmiş semenin ağır oligospermi veya kriptospermi açısından daha dikkatli değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu hastalarda baskın testiküler histoloji, germinal hücre aplazisi ile birlikte seminifer tübül sklerozudur. Ancak küçük alanlarda spermatogenez komplet olarak izlenebilir. Mikrodiseksiyon gibi yeni teknikler sayesinde KS hastalarında %69'a varan oranlarda sperm elde etme başarısı sağlanmıştır (43). Ancak bu hastaların çocuklarında da KS genotipi olduğuna dair yayınlar vardır. Bu nedenle tüm KS hastalarına cerrahi sperm ekstraksiyonu öncesinde, kendi sağlık durumları ve çocukları üzerine etkilerinden dolayı genetik danışma verilmelidir. Klinefelter Sendromlu hastalarda, mikro-TESE'de sperm bulunma oranlarının araştırıldığı çalışmalar ve sperm bulunma oranları Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5. Klinefelter Sendromlu hastalarda mikro-TESE'de sperm bulunma oranları

| Araştırmacı | Hasta Sayısı | Sperm Bulma Oranı (%) |
|--------------------|--------------|-----------------------|
| Tournaye (1997) | 15 | 47 |
| Levron (2000) | 20 | 40 |
| Westlander (2001) | 19 | 21 |
| Friedler (2001) | 12 | 42 |
| Madgar (2002) | 20 | 45 |
| Yamamoto (2002) | 24 | 50 |
| Vernaev (2004) | 50 | 48 |
| Seo (2004) | 25 | 16 |
| Schiff (2005) | 42 | 69 |
| Okada (2005) | 51 | 51 |
| Bakırcıoğlu (2006) | 74 | 56 |
| Kyono (2007) | 17 | 35 |
| Ramasamy (2009) | 68 | 66 |
| Selice (2010) | 77 | 37 |
| Madureira (2014) | 65 | 38 |
| Sabbaghian (2014) | 134 | 28 |

Klinefelter Sendromunun testiküler fonksiyonlara olan olumsuz etkileri yanında ciddi gelişimsel, neoplastik ve metabolik etkileri de mevcuttur. Klinefelter Sendromlu hastalarda

meme kanseri riskinin normal popülasyona göre 50 kata kadar artabileceği bilinmektedir. Ayrıca non-hodgkin lenfoma ve ekstragonadal mediastinal germ hücre tümörü riskinin de arttığı saptanmıştır (44). Klinefelter sendromlu hastalarda, hipogonadizme bağlı olarak abdominal obezite, hiperlipidemi, diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalıklarla giden metabolik sendrom daha sık görülmekte veya kardiyovasküler komplikasyonlardan ölüm olasılığı artmaktadır (45).

46,XX Erkek Sendromu: Seks reversal sendromu olarak da bilinen 46,XX erkek sendromu 1/20000-25000 canlı doğumda bir görülmektedir (46). Küçük testis boyutu, jinekomasti ve azospermi gibi özellikleri KS ile benzerken boyları ortalama erkekten daha kısadır. Bu hastalarda hipospadias insidansı artmıştır. Kognitif fonksiyonları normaldir. Hastaların %90'ında, Y kromozomunun kısa kolu (Yp) üzerinde bulunan testis determinan (*SRY*) geni, X kromozomlarından birine veya bir otozoma transloke olmakta ve bipotent gonadın testis yönünde farklılaşmasını sağlamaktadır. Klinefelter sendromlu hastaların aksine bu erkeklerde *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* bölgeleri bulunmamakta ve spermatogenez gerçekleşmemektedir. Bu hastalarda mikro-TESE operasyonu yapılsa dahi sperm elde edilemediği bilinmektedir (47).

47,YYY Sendromu: Erkek doğumlarının %0.1'inde görülen 47,YYY karyotipinde normal erkek genotipi ve endokrin profili bulunmaktadır. Oligospermi veya komplet azospermi ile başvururlar ancak tipik olarak spermatogenez bir miktar korunmuştur. Spermatogoniaların çok az bir kısmında anormal genetik yapı olması, spontan gebelik veya ICSI ile doğacak çocuklarında genetik kusur riskinin az olduğunu düşündürmektedir. Bu hastalarda sperm ekstraksiyonu veya yardımcı üreme teknikleri öncesinde genetik danışmanlık verilmesi önerilmektedir (48).

Otozomal (Yapısal) Anomaliler

Yapısal kromozom anomalileri; delesyon, inversiyon, kromozomun bir kısmının duplikasyonu ya da bir kromozomun bir parçasının diğer kromozoma translokasyonu şeklinde gerçekleşir. Yapısal kromozom bozukluğu olan translokasyonlar, infertil erkeklerde normal popülasyona göre 8.5 kat, inversiyonlar ise 8 kat daha fazla görülmektedir (49). Translokasyonu olan erkeklerde anormal spermiyogram bulgularına rastlanırken, taşıyıcılarda ise normal semen parametreleri bulunabilir (50)

2.6.2. Gen Bozuklukları

X Kromozomu Üzerinde Olanlar

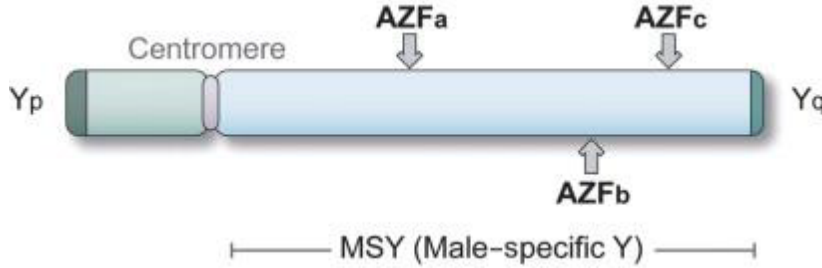
Kallman Sendromu: Erkek infertilitesinde en sık rastlanan X'e bağlı kalıtım gösteren bozukluktur. X kromozomunun uzun kolunda lokalize olan *Kal* (Xp22.3) genindeki bir mutasyon hipotalamustan GnRH sekresyonunda bozulmaya neden olur. Bunun klinik yansıması olarak hipogonadotropik hipogonadizm, anozmi ve erkek infertilitesi ortaya çıkmaktadır. Bu bireylerde serum FSH ve LH düzeyi çok düşük veya saptanamayacak seviyede olup, buna bağlı olarak testosteron seviyeleri de düşüktür. Fenotip olarak uzun boyludurlar. Konjenital sağırlığa, kraniyum ve yüz asimetrisine, yarık damak, serebellar disfonksiyon, kriptorşidizm ve renal anomalilere de sahip olabilirler. Kallman sendromlu pek çok hastada, FSH veya human koryonik gonadotropin (hCG) ile hormonal tedavi uygulanarak fertilitate başarılabilir (51).

Androjen Duyarsızlık Sendromu: Androjen reseptör (*AR*) geni, X kromozomunda lokalize olup, mutasyonu end organların androjene duyarsızlığına neden olur. Seçilmemiş infertil erkek topluluğunda %2 oranında gözlenir. Androjenlere cevapsızlık komplet (testiküler feminizasyon) veya parsiyel olabilir. Komplet androjen duyarsızlığında, intraabdominal testisi olan fenotipik olarak dişi bireylere neden olur, ancak karyotipi 46,XY'dir. Parsiyel duyarsızlıkta internal duktal gelişimi ile birlikte eksternal genitaliyanın değişik androjenizasyonuna bağlı geniş bir yelpazede fenotipe sebep olurlar. Ambiguous genitalia, mikropenis ve hipospadias sık görülen anomalilerdir. Gonadlarda %10-22 oranında gonadoblastoma gelişme riski nedeniyle puberte döneminde gonadektomi önerilmektedir (52).

Y Kromozomu Üzerinde Olanlar

Y Kromozomu Mikrodelesyonları: Nonobstrüktif azospermisi olan ve ağır azospermisi olan hastalarda (konsantrasyon<5 milyon/ml) cerrahi sperm ekstraksiyonunun prognozunu belirlemek ve çiftlere genetik danışmanlık vermek için Y kromozomu mikrodelesyonu araştırılması endikasyonu vardır. Y kromozomunun normal moleküler yapıda olması gonadal gelişim ve sperm üretimi açısından kritik önem taşımaktadır. Y kromozomu 60 milyon baz çiftinden oluşan akrosentrik bir kromozomdur. Kısa kol (Yp) ve uzun kol (Yq) ile bunları birleştiren bir sentromere sahiptir. Y kromozomunda iki önemli bölge bulunur, ökromatik bölge olan Yp, sentromer ve Yq'nun proksimal parçasını içerir. Heterokromatik bölge distal Yq'dan oluşur. Distal Yq'nun transkripsiyonel fonksiyonu yoktur ancak ökromatik bölge

normal spermatogenezin oluşması için kritik önem taşıyan genetik lokuslara sahiptir. Seks belirleyici faktör (*SRY*) Yp üzerinde lokalizedir, embriyonik evrede gonadların testis yönünde gelişmesinde rol oynayan dönüşümü başlatır (53).



Şekil 2.4. Y kromozomu ve Azospermi faktör (*AZF*) bölgesi. (Campbell-Walsh Urology, 10. Baskı, Bölüm 7, Kısım 21, syf: 641, 2011)

Y kromozomu üzerindeki kritik bölgelerdeki delesyonlar veya mutasyonlar spermatogenezin kesintiye uğramasına neden olabilir. İnfertil erkekler üzerinde yapılan çalışmalar Yp üzerinde azospermik faktör (*AZF*) olarak adlandırılan bir bölgenin normal spermatogenez üzerinde çok önemli etkisi olduğunu göstermiştir (54).

Literatürde en sık rastlanan delesyon tipleri *AZFc* ve *AZFb*'dir. Y kromozomu üzerindeki *AZF* bölgesinde meydana gelen delesyon tipleri ve görülme sıklıkları Tablo-6'da verilmiştir (55).

Tablo 2.6. *AZF* genindeki mikrodelesyonların sıklığı ve neden oldukları patolojiler

| DELESYON | ORAN % | PATOLOJİNİN YERİ |
|------------------|---------------|---|
| <i>AZF a</i> | 3 | Sperm maturasyonunda rol alan proteinlerin kodlanması |
| <i>AZF b</i> | 9 | Sperm maturasyonunda rol alan proteinlerin kodlanması |
| <i>AZF c</i> | 79 | Spermatogenezdeki mRNA kodlanması |
| <i>AZF b+c</i> | 6 | Maturasyon bozukluğu + mRNA kodlanması |
| <i>AZF a+b+c</i> | 3 | Maturasyon bozukluğu + mRNA kodlanması |

Kromozomal moleküler haritalama yöntemlerinin gelişmesi ile Y kromozomu üzerindeki mikrolelesyonların 3 bölgede olduğu ortaya çıkarıldı: *AZFa*, *AZFb*, ve *AZFc* (54). Y kromozom mutasyonları bakımından taranan 4.800 infertil erkek hastada yapılan bir meta-analiz çalışmasında, infertil erkeklerin %8.2'sinde, fertil erkeklerin ise %0.4'ünde *AZF*'de bir ya da daha fazla bölgede delesyon saptanmıştır (57). Aynı çalışmada Y mikrolelesyon olgularının yaklaşık %60'ını *AZFc*, %16'sını *AZFb*, %8'ini *AZFb+c*, %5'ini *AZFa*, %4'ünü *AZFa+b+c* ve %6'sını *AZF* dışı delesyonların oluşturduğu gösterilmiştir. *AZFa* bölgesinde bulunan *DDX3Y* (aynı zamanda *DBY* olarak da adlandırılan) ve *USP9Y* genlerinin normal spermatogenez için önemli olduğu tespit edilmiştir (58). *AZFa* mikrolelesyonlarında testis histolojisinde germ hücre aplazisi olduğu görüldüğünden ve şu ana kadar var olan literatür bilgisine göre sperm bulma şansının çok düşük olmasından dolayı testisten sperm elde etme operasyonları önerilmemektedir (59). *AZFa* bölgesinde olduğu gibi *AZFb* bölgesindeki mikrolelesyonlar sık görülmez ve diğer lokuslardaki delesyonlarla birlikte görüldüğünde testisten sperm elde edilemez (60). En sık karşımıza çıkan *AZFc* bölgesindeki mikrolelesyonlardır, azospermik erkeklerin %13'ünde ve şiddetli oligospermik erkeklerin %6'sında görülür. *AZFc* bölgesi, primer olarak spermatogoniada bulunan bir RNA bağlayıcı proteini kodlayan 'Deleted in Azoospermia' (*DAZ*) geninin bulunduğu yerdir (61). Bu gen spermatogonia'da RNA bağlayıcı proteinin kodlanmasında rol oynar. Kent-First ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, *AZFb* ve *AZFc* arasındaki bölgede *AZFd* adlı bir bölge daha olduğu ortaya çıkarılmıştır (62). Ancak Y kromozomu mikrolelesyonlarının araştırıldığı çalışmaların çoğunda, bu bölge analiz edilmemiştir (63, 64). İzole *AZFc* mikrolelesyonları azospermik erkeklerin %50'sinin üzerinde testisten sperm elde edilmesi nedeniyle daha iyi prognoza sahiptir (65). Y kromozomu mikrolelesyonlarının infertilite alanı dışında direkt sağlık problemlerine neden olmamasına karşın çiftlerin sperm elde edilme işlemi ve ICSI tedavisi öncesi genetik danışmanlık almaları önerilir. Bu çiftlerin doğacak erkek çocukları, normal fenotipe sahip olsalar da babadan alacakları delesyonlu Y kromozomundan dolayı aynı fertilitate problemi ile yetişkin dönemde karşı karşıya kalacaklardır.

2.6.3. Tek gen defektine bağlı gelişen ve sperm fonksiyonlarını direkt etkileyen genetik sendromlar

Konjenital Bilateral Vaz Deferens Yokluğu

Kistik Fibrozis transmembran konduktans regülatör (*CFTR*) disfonksiyonunun en ağır formu kistik fibrozisken, en hafif formu konjenital bilateral vaz deferens yokluğudur (*CBAVD*). Kistik fibrozis otozomal resesif geçiş gösteren konjenital bir hastalıktır. Hastalıkla aynı ismi taşıyan *CFTR* genindeki mutasyonlara bağlı gelişir. Bu mutasyon epididimden itibaren spermatik kord ve seminal veziküllerin oluşumunu engeller. Azospermik hastalarda %1.4 oranında spermatik kord agenezisi bulunmaktadır. Bu hastaların %85'inde kistik fibrozis(*CF*) gen mutasyonu tanımlanmıştır (66).

Normal vas deferens skrotum cildinden palpasyonla çok rahatlıkla hissedildiği için tek taraflı veya iki taraflı vas agenezisi sadece skrotal muayene yoluyla anlaşılabilir. Bu erkeklerde epididimin kaput bölgesi var olabilir ancak distal üçte ikisi ile birlikte vas deferens yoktur; ayrıca vezikülo seminalislerde hipoplazi veya atrofi görülebilir. Vezikülo seminalis yokluğunda azospermi ile birlikte ejakülat volümü çok düşük (0.5 ml) ve seminal asidik pH (6.5) olarak tespit edilir. Transrektal ultrason ile vezikülo seminalis yokluğu tespit edilebilir ancak genellikle tanı klinik belirtilere ve semen analizi bulgularına göre konulur. Bu erkeklerde %40 olasılıkla renal anomali görülebildiği için renal agezisi açısından taranmalıdır. Bu hastalarda spermatogenezis genellikle normal olduğu için sperm elde etme yöntemleri perkütan veya açık cerrahi yöntemlerle kaput epididimden veya testisten yapılabilir (67).

Primer Siliyer Diskinezi

Silialı hücrelerin aksonemlerine ait bazı defektleri içeren birçok sendrom tanımlanmıştır. Kartagener ve Usher sendromları bu konudaki en iyi örneklerdendir (68).

Kartagener Sendromu: Aynı zamanda İmmotil Silya Sendromu olarak da bilinen Primer Siliyer Diskinezi, flagellumun, sperm motilitesinin yanı sıra tüm respiratuar yolların ve sinüs yollarının yüzeyini etkileyen ultrastrüktürel anomalilerini içeren bir spektrumdur. Bu hastalar nadiren ilk şikayet olarak infertilite problemi ile doktora başvururlar. Bundan daha sık olarak, çocukluk döneminde mukusun üst solunum yollarına ve sinüslere doğru olan hareketinin bozulması sonucu gelişen sinüzit ve bronşiektazi görülmektedir. Primer Siliyer Diskinezi'nin

bir tipi olan Kartagener sendromunun kronik bronşit ve bronşiektazi, hareketsiz sperm veya düşük motilitesi ile birlikte olan infertilite ve sitüs inversus olmak üzere üç komponenti vardır. Tanı, silier aksonemal yapıların elektron mikroskop ile incelenmesi ile doğrulanabilir (68).

Usher Sendromu: Retinal fotoreseptörler ve odyovestibüler organlardaki silier defekte bağlı olarak retinitis pigmentosa ve sağırılık ile birlikte görülür. İnfertilite ise sperm motilitesindeki bozukluk sonucu ortaya çıkmaktadır (69).

Myotonik Distrofi ve Noonan Sendromu

Myotonik Distrofi: Otozomal dominant geçişlidir. Myotonik distrofi, adult dönemde başlayan, müsküler distrofi ve atrofinin en sık nedeni olarak bilinen, katarakt ve endokrinopatilerle beraber seyreden bir hastalıktır. Hastalık 19. kromozom üzerinde serin-treonin-kinaz proteinini kodlayan bir gendeki CTG trinükleotid tekrar artışı ile oluşur. Olguların %30'unda erkek infertilitesi, seminifer tübül hasarı, sperm kapasitasyonunda defekt ve akrozom kaybına bağlı gelişir. %80'inde testiküler atrofi mevcuttur (70).

Noonan Sendromu: Otozomal dominant geçişlidir. Noonan sendromu (NS), birçok ortak özellikten dolayı erkek Turner sendromu olarak da adlandırılmaktadır. Dişi Turner sendromunun (45,X0) aksine NS'de, normal bir 46,XY karyotipi ve otozomal dominant kalıtım söz konusudur. Kısa yapı, yele boyun, kubitus valgus, pulmoner stenoz, hipertrofik kardiyomyopati, düşük ense çizgisi ve pitozis en belirgin özellikleridir. Fertilite normal olabilirse de bu hastaların % 77'sinde kriptorşidizm ve buna bağlı olarak spermatogenez bozukluğu ile artmış gonadotropin düzeyleri saptanmaktadır (71).

Genetik Endokrinopatiler

GNRH'nin Üretim veya Sekresyon Bozuklukları: GnRH'nin anormal salınımı ve sentezi veya GnRH'nin salınımını takiben FSH ve LH'da anatomik bir sebep olmaksızın oluşan düşük düzeyde salınım sonucunda oluşan bozukluklar idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) olarak ifade edilir. Gonadotropinler normal düzeylerde değilse androjen üretimi ve spermatogenezis yetersizdir. Kalman sendromu ve Prader Willi sendromu bu grupta yer alan ve IHH ile karakterize iki hastalıktır. Prader Willi sendromu; obezite, kriptorşidizm, hafif ya da orta derecede mental gerilik ve IHH ile karakterizedir. 15. kromozomun kısa kolundaki mutasyon ya da delesyon (15q11q13) hastanın babasından geçer ya da daha az sıklıkla bu

lokusun 2 kromozomal kopyası hastanın annesinden geçer. Tedavide FSH ve hCG replasmanı yapılır (4).

FSH ve LH Fonksiyon Bozuklukları: Bu hormonlar hipofizden salgılanır. Biyolojik olarak inaktif LH üretimine neden olan mutasyonlar başta virilizasyon bozukluğuna neden olur. Lüteinizan hormon reseptör mutasyonları ise psödopuberte prekoksia ve psödohermafroditizme sebep olabilir. Folikül stimulan hormon reseptör mutasyonları daha az gözlenir (68).

Androjen Sentez ve Fonksiyon Bozuklukları: Androjen sentezinde yer alan enzimlerin mutasyonları infertiliteye neden olur. Kolesterolde testosteron sentezi yapılabilmesi için 5 enzimin düzenli çalışması gereklidir. Sentezde gerekli olan ilk üç enzimin disfonksiyonuna neden olan mutasyonlar konjenital adrenal hiperplaziye sebep olur. Bu hastalarda kortikosteroid, minerelokortikoid ve androjen sentezi bozuktur. Virilizasyon bozukluğu ve infertilite gözlenir. Son iki enzimin mutasyonları ise psödohermafroditizme ya da kriptorşid testisle beraber feminize genital görünüme neden olur. Testesteronun dehidrotestesterona dönüşümünü sağlayan 5-alfa redüktaz enzimidaki defektlere yol açan mutasyonlar eksternal genitalin gelişimini bozar. Sperm salınım bozukluğu vardır. Yine androjen reseptör gen defektleri de virilizasyon bozukluğuna neden olan diğer bir infertilite sebebidir. Bu sendromlara androjen insensitivite sendromları denir (72).

Orak Hücreli Anemi

Hemoglobinopatilerin en tipik olanı ve en sık görülenidir. Globin zincirini kodlayan gendeki mutasyon sonucu gelişen hemoglobin orak şeklindedir. Otozomal resesif geçiş gösterir. Onbirinci kromozomda lokalize olan genin, zincirinin 6. pozisyonunda bulunan glutamin aminoasidinin yerine valin aminoasidinin gelmesi ile hastalık oluşur. Testiküler disfonksiyon, hipotalamik-hipofizer defektler ve çok sayıda kan transfüzyonuna bağlı olarak gonadlarda demir depolanması sonucu hastalık oluşmaktadır (73).

2.7. Genetik Danışmanlık

Dünya Sağlık Örgütü tanımına göre genetik danışmanlık, aile içinde bir genetik hastalık oluşabileceğine dair problemler ile uğraşan bir iletişim sürecidir. Eğitimsel danışmanlık hizmeti, genetik bir hastalığa sahip olan ya da bu hastalık açısından risk altında olan aile ya da bireylerin konu hakkında bilgi sahibi olmasını ve kararlarını bu doğrultuda

vermelerini sağlar. Genetik danışmanlık, bu konuda özelleşmiş hekimler tarafından verilmelidir. Genetik danışma verilen çeşitli hasta grupları arasında yardımcı üreme yöntemleri uygulanacak eşler bilinen en yüksek genetik risklere sahiptirler. Bu sebeple genetik danışmanlık alma gereksinimleri vardır.

İnfertil erkeklerde çeşitli kromozom anomalileri daha sık görülmektedir. Bu yüzden bu hastalarda periferik kandan kromozom analizi rutin olarak yapılmalıdır. Kromozom anomalisine yönelik genetik danışma verilmeli ve doğacak bebeklerde ortaya çıkabilecek riskler açısından aile mutlaka bilgilendirilmelidir. Danışma yönlendirici olmamalı ve aile oturumun sonunda ICSI veya IVF (in-vitro fertilizasyon) yaptırmak isteyip istemediğine karar verebilecek kadar bilgi sahibi olmalıdır (74).

Erkek, dengeli otozomal anomali taşıyıcısı ise çiftler gebelik başarı oranının düşebileceğini ve düşük için artmış bir riskin bulunacağını öğrenmelidirler. Fetusun multipl konjenital anomali, mental retardasyon ve kısa yaşam süresi ile sonuçlanacak kromozom anomalisinden etkilenmiş olabileceğini veya fetusun normal veya babası ile aynı kromozom yapısına sahip olabileceği olasılığını aile bilmelidir. Erkek; sadece cinsiyet kromozomlarını ilgilendiren yapısal anomali taşıyıcısı ise, infertiliteyi veya diğer bozukluk ve malformasyonları gelecek nesile aktarma riski fazladır. Erkekte cinsiyet kromozom anöploidisi varsa; eşler ICSI başarı oranının değişken olabileceği ve düşük riskinin ve anöploidiyi çocuklara aktarma riskinin olabileceği konusunda bilgilendirilmelidir. İntrastoplazmik sperm injeksiyonu ile meydana gelecek bir gebelikte prenatal tanı mutlaka önerilmelidir. Aile preimplantasyon tanı amaçlı floresans in-situ hibridizasyon (FISH) ile embriyo taraması yapılması için şansları olduğunu bilmelidir. Son olarak aileye ICSI için donör ile inseminasyon şansı da tanınmalıdır (75).

Erkek infertilitesi nedeniyle ICSI uygulanan bireylerin çocuklarında cinsiyet kromozom anöploidisi insidansı hafifçe artmış (%1) olarak bulunmuştur. Normal populasyonda %0.14-0.19'lük insidans söz konusudur. %1'lik bu risk, ikinci trimester amniyosentezde kabul edilen genel %0.5'lik riske oranla daha yüksektir. Erkek infertilitesi nedeniyle ICSI uygulanarak gebe kalan çiftlere prenatal tanı önermek mantıklıdır. Diğer kromozom anomalileri veya ailevi parental faktörler bulunmuyorsa ICSI konjenital malformasyonlar açısından ek risk getirmez (74).

2.8. Azospermik Hastaya Yaklaşım

Azospermi, ejakülatta sperm olmaması olarak tanımlanır ve erkeklerin %1'inde, infertil erkeklerin ise %10-15'inde saptanır (3). Azospermi, yetersiz hormonal stimülasyon (hipogonadotropik hipogonadizm), spermatogenez anormallikleri ya da duktal obstrüksiyon nedeni ile oluşabilir. Nonobstrüktif azospermi ise testislerde tam olarak gelişmiş sperm minimal olması ya da üretilmemesi nedeniyle ejakülatta spermatozoa yokluğu olarak tanımlanır. İleri tanı testlerine geçilmeden önce amaç, en az iki ayrı kez santrifüje edilmiş semen örneği ile azosperminin doğrulanması ve oligosperminin ekarte edilmesi olmalıdır. Bu şekilde, azosperminin spermatogenez eksikliğinden mi yoksa duktal obstrüksiyondan mı kaynaklandığına dair bir ön bilgi sahibi olunur. Santrifüje edilmiş semende 1 adet bile sperm görülmesi komplet duktal obstrüksiyonu ekarte ettirir ve gerektiğinde ICSI için kullanılmak üzere sperm kriyoprezervasyona izin verir. Yapılan bir çalışmada, nonobstrüktif azospermik hastaların %35'inde semen santrifüjü ile sperm bulunduğunu gösterilmiştir (76).

Hikaye ve fizik muayene bulgusu azosperminin sebebi hakkında fikir verse de esas etiolojiye yönlendiren unsurlar testis boyutları, serum FSH düzeyi ve fizik muayenede vaz deferenslerin ele gelip gelmemesidir. Bu nedenle fizik muayenede ilk basamak vaz deferenslerin bulunup bulunmadığının kontrol edilmesidir. Çünkü konjenital bilateral vaz deferens yokluğu obstrüktif azosperminin yaygın bir nedenidir. Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu fizik muayeneye dayanan klinik bir tanı olup, kistik fibrozis transmembran kondüktans regülator proteini genindeki bozukluktan kaynaklanır (77). Böyle olguların büyük kısmında spermatogenez normal olup, testis hacimlerinin de normal olması durumunda tedavi planlanmadan önce sadece serum FSH testi ile tetkik edilmeleri yeterli olur. Eğer hikaye, fizik muayene ya da laboratuvar çalışmaları spermatogenez bozukluklarını düşündürüyor ise testis biyopsisi yapılabilir.

Fizik muayene ile saptanabilen küçük testis hacmi, primer ya da sekonder testiküler yetmezlik olduğunu düşündürmelidir. Testiküler yetmezlik tanısını koymak kadar hem fonksiyonel hem de nonfonksiyonel hipofiz tümörlerini belirleyebilmek amacıyla testosteron, LH, FSH ve prolaktini içeren serum hormon testleri istenmelidir. Küçük testis ve normalin 2 katından fazla serum FSH düzeyi primer testiküler yetmezlik göstergesi olabilir. Günümüzde bu grup hastalarda obstrüktif etiolojiyi ekarte etmek için testiküler biyopsi yapılması önerilmemektedir. Azospermi ile kendini gösteren primer testiküler yetmezlik, en iyi şekilde testisküler sperm elde etme yöntemleri ile tedavi edilmektedir. Vaz deferenslerin bulunduğu,

testis hacimleri ve serum FSH düzeyi normal olan hastalara matürasyon arresti gibi spermatogenez bozuklukları ile duktal obstrüksiyon ayırımı yapabilmek için testis biyopsisi yapılabilir (3). Testis biyopsisinin normal olması obstrüksiyon için patognomiktir. Vazografi, testislerden biyopsi alınırken değil, rekonstrüktif cerrahi sırasında skrotal eksplorasyon sırasında yapılmalıdır. Tek taraflı duktal obstrüksiyonu bulunan hastalar tipik olarak normal sperm sayısına ve fertilité potansiyeline sahiptirler. Nadiren, tek taraflı obstrüksiyonu olan hastalar obstrükte olmamış karşı testisin anormal yapıda olması nedeni ile oligospermi ya da azospermi ile gelebilirler (78).

Başlangıç değerlendirmesinin ardından gerekli görülen hastalarda ilave ileri testler yapılabilir. Bu testlerin yapılmasındaki amaç, erkek infertilitesinin spesifik nedenlerini ortaya çıkarmak veya ekarte etmektir. Bu testlerin her biri için uygun endikasyonlar gerekmektedir ve rutin araştırmada yer almadıkları akılda tutulmalıdır. Hikaye, fizik muayene ve laboratuvar testlerinin sonuçları, hastanın tanısai bir kategori içerisine yerleştirilmesine olanak sağlar. Azospermiye yol açan birçok neden bulunmaktadır ve bu nedenler üç kategoriye ayrılır; pretestiküler, testiküler, posttestiküler nedenler.

Pretestiküler nedenler; sekonder testiküler yetmezlik olarak da adlandırılırlar ve genellikle altta yatan endokrin bir bozukluk bulunmaktadır. Konjenital (Kalman sendromu) veya kazanılmış hipogonadotropik hipogonadizme bağıli ortaya çıkabilirler.

Testiküler nedenler; primer testiküler yetmezlik olarak anılırlar ve intrinsik spermatogenez bozuklukları sonucu ortaya çıkarlar. Anorşi, testis travması, testis torsiyonu, inmemiş testis, KS, germ hücre aplazisi, fokal hipospermatogenez, matürasyon arresti, orşit, radyasyon, sıcaklık artışı, gonodotoksik ajana maruziyet, karaciğer sirozu ve böbrek yetmezliğı gibi sistemik hastalıklar, testis tümörleri, varikosel, testis vaskülarizasyonunu bozabilecek cerrahi girişimler ve idiyopatik nedenler, primer olarak testisi etkileyerek spermatogenezi bozmaktadırlar. Testis biyopsisinin patolojik incelenmesi, Y kromozomu mikrolezyonu veya kromozomal anormallikler gibi genetik nedenleri, varikosele bağıli testis hasarı, ilaç veya çevresel faktörlerin neden olduğı gonadotoksik etkileri ve idiyopatik infertiliteden ayırt etmeye yardımcı olur. Nonobstrüktif azosperminin kesin tanısı testis biyopsisiyle konmakla birlikte, dilate olmayan epididimlerle beraber küçük ve yumuşak kıvamlı testisler, artmış serum FSH düzeyi, azalmış testosteron/östradiol oranı gibi bazı parametreler testiküler yetmezlik ön tanısını düşündürmelidir. Bu hastalarda histopatolojik

inceleme yapıldığında túbüler skleroz, germ hücre aplazisi, matürasyon arresti ve hipospermatogenez saptanabilir (79). Bazı çalışmalar biyopsi ile bu durumdaki testislerin yarısından fazlasında sperm bulunduğunu belirtmektedir. Bu nedenle biyopsiyle beraber sperm elde etme yöntemleri kullanılması önerilmektedir (80). İnfertil hastalarda üremeye yardımcı yöntemler için sperm elde etmeye geçmeden önce varsa azospermiye eşlik eden patolojiler düzeltilmelidir. İleri derecede varikoselin düzeltilmesi, hormonal bozukluğun tedavisi, radyasyon alımı, aşırı sıcaklık, kemoterapi ve maruz kalınan gonodotoksinler varsa bunlardan duruma göre 3-9 ay uzak kalınması sağlanmalıdır.

Posttestiküler nedenler; EAU 2015 kılavuzuna göre azospermi vakalarının %15-20'sini oluştururlar (81). Obstrüktif azospermide obstrüksiyonun nedeni %15 intratestiküler, %51 epididimal, %18 bilateral vas deferens agenezisi, %3 unilateral vaz deferens agenezisi, %12 vaz deferens tıkanıklığı ve %1 ejakülatuar kanal tıkanıklığı şeklinde bildirilmiştir. Tıkanıklığın seviyesine göre uygulanacak cerrahi girişimler ile obstrüksiyon giderilebilir. Ancak başarılı olunamayan durumlarda yardımcı üreme yöntemlerine başvurmak gerekebilir. Obstrüktif azospermide sperm üretiminin normal devam ettiği ancak sperm kalitesinin bozulduğu ve özellikle epididimin kuyruk kısmında olmak üzere çok sayıda makrofaj ve dejenerasyona uğramış spermatozoaların olduğu belirtilmiştir (82).

2.9. Testis Biyopsisi

Testis hacminin %85'ten fazlası, progresif olarak olgunlaşan germ hücrelerinden oluşan seminifer túbüllerden ve onları destekleyen sertoli hücrelerinden oluşur. İçeriğin geri kalanı ise kan damarları ve interstisyel alandaki Leydig hücrelerinden oluşmaktadır.

Testis biyopsisinin erkek infertilitesinde iki rolü vardır; bunlardan birincisi obstrüktif ile non-obstrüktif testiküler patoloji ayrımının yapılması, ikincisi ise ICSI'de kullanılmak üzere sperm elde edilmesidir. Tanısal testis biyopsisi, primer olarak normal testis boyutları ve kıvamı olan, serum FSH düzeyleri de normal olan, azospermik, klinik olarak obstrüksiyon düşünülen hastalarda düşünülebilir. Azospermik hastanın obstrüksiyon değerlendirilmesinde, tek taraflı testis biyopsisi genellikle yeterlidir. Kriptorşidizm gibi tek taraflı testiküler yetmezlik düşündürülen veya daha önceki inguinal cerrahi sırasında vaz hasarı olduğu düşünülen hastalarda, bilateral testis biyopsisi alınabilir. Daha önce vazektomi öyküsü olan veya vaz agenezi gibi bilinen obstrüktif etyolojisi olan hastalarda biyopsi endikasyonu yoktur (83).

Testis biyopsilerinin yorumlanması, kantitatiften daha çok tanımlayıcı analiz gerektirdiği için deneyimli bir patolog gerektirir. Hipospermatogenezde tüm germ hücre sayıları azalmıştır ancak histolojik kesitte spermatogenezin tüm basamakları mevcuttur. Azalmanın derecesi azospermik veya oligospermik olmayı belirler. Maturasyon arresti ise sperm maturasyonunun, sperm yolağının spesifik bir noktasında durmasıdır. Sertoli cell-only sendromunda germinal aplazi vardır, yani tamamiyle germ hücrelerinden yoksun küçük seminifer tübüller vardır. Sertoli hücreleri ve bazal membranlar dahil olmak üzere diğer interstisyel bileşenler normaldir (42). Azospermi durumunda testis biyopsisinin normal olması, duktal obstrüksiyon için patognomiktir.

2.10. Cerrahi Sperm Elde Etme Teknikleri

Erkek infertilitesi için cerrahi yöntemler ve endikasyonlardaki gelişmeler arttıkça, erkek infertilitesinin tedavisindeki başarılar da giderek artmaktadır. Bu gelişmeler; cerrahi tedavi için hasta seçiminde genetik ve moleküler biyolojik belirteçlerin kullanımının artmasını, obstrüksiyonun mikrocerrahi yöntemlerle tedavi edilmesini, azospermik ve şiddetli oligospermik hastalarda spermatogenezin iyileştirilmesi amacıyla varikoselektominin kullanımının yaygınlaşmasını ve nonobstrüktif azospermik erkeklerin tedavisinde IVF ve ICSI ile kombine edilen sperm elde etme yöntemlerinin ilerlemesini kapsamaktadır. Bir zamanlar ümitsiz olgular olarak kabul edilen KS'ye bağlı nonobstrüktif azospermik erkekler artık yardımcı üreme teknikleri ile baba olabilmektedirler (84).

Konjenital vaz deferens yokluğu veya vaz deferensin parsiyel aplazisi olan erkekler ile cerrahi olarak düzeltilemeyen obstrüksiyonu olan olgular günümüzde sperm elde etme teknikleri ile bağlantılı IVF/ICSI kullanılarak tedavi edilebilir (85). İntraoperatif olarak elde edilen spermler eş hazır ise taze olarak IVF'de veya dondurularak saklanarak rekonstrüktif cerrahinin sonucu başarısız olursa IVF/ICSI'de kullanılır. Kronik obstrükte sistemden elde edilen spermler genellikle kötü motilite ve azalmış fertilizasyon yeteneğine sahiptir. Optimal sonuç için IVF ile kombine edilen ICSI yapılması esastır.

Sperm elde etme amacıyla iğne aspirasyon, perkütan testis biyopsisi, açık testis biyopsisi veya konvansiyonel TESE ve mikro-TESE kullanılabilir. İğne aspirasyonu ve perkütan testis biyopsisi daha az invaziv olup düşük maliyetli olması yönünden avantajlıdır. Konvansiyonel TESE'de geniş doku eksizyonu yapıldığı için testiküler devaskularizasyon ve atrofi riski daha fazladır. İntratestiküler kanama ve skar oluşumu spermatogenezini ve hormon

üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. Nonobstrüktif azospermi hastalarında sperm elde etmede kullanılan en başarılı yöntem mikro-TESE'dir (86).

2.10.1. Mikrocerrahi Epididimal Sperm Aspirasyon Teknikleri

Açık Tübül Tekniği

Bu teknik, vazoepididimostomi sırasında intraoperatif olarak veya konjenital vazal agenezi veya düzeltilemeyen obstrüksiyonu saptanan erkeklerde izole işlem olarak kullanılabilir (87). Skrotum cildi rafeden açılır, testis doğurtulduktan sonra tunika vajinalis açılır ve mikroskop altında epididim inspekte edilir. Dilate bir tübül izole edilir ve mikrobiçak ile kesilir. Kesi yerindeki epididimal sıvıya bir cam slayt dokundurular ve üzerine insan tubal medyumunu damlatılır. Slaytın üzeri lamel ile kapatılarak mikroskop altında incelenir. Sıvıda sperm bulunamaz ise epididimal tübül ve tunika sırasıyla 10-0 ve 9-0 monoflamen naylon sütün ile kapatılır ve sperm bulunana kadar epididime daha proksimalden veya yine bulunamaz ise efferent kanal seviyesinden bir kesi yapılır. Motil sperm bulununca, kuru bir mikropipet ile kesi yerinden epididimal eflüks çekilir. Spermeler basit kapiller hareket ile mikropipet içine çekilir. Mikropipet içeriği, mikropipete bağlanan 3-5cm uzunluğunda silikon bir tüp ve şırınga yardımıyla steril bir toplama kabına alınır. Bu teknik ile elde edilen taze veya dondurulmuş epididimal spermeler ile ICSI uygulayarak %60 oranında gebelik elde edilebilir (88).

Perkütan Epididimal Sperm Aspirasyonu

Sperm elde etmek ve gebelik oluşturmak için ince iğne ile perkütan olarak epididime giriş işlemidir. Teknik, açık elde etme yöntemine göre daha az güvenilir olup elde edilen sperm örneği bazen dondurmak için yetersiz kalabilir. Yapılan bazı çalışmalarda bu yöntemle elde edilen gebelik oranlarının açık teknik ile elde edilenin yarısı kadar olduğu saptanmıştır (89). In-vitro fertilizasyon için harcanan emek ve büyük paralar göz önüne alındığında, mikroskop altında yapılan açık epididimal sperm eldesi önerilen tetkiktir.

2.10.2. Mikrocerrahi Testiküler Sperm Eldesi

Günümüzde erkeklerde infertilite olgularının tedavisinde en önemli ilerleme, NOA olgularında testislerde spermatogenezin devam etmekte olduğu odakların gösterilerek bu odaklardaki matür sperm hücrelerinin elde edilmesi olmuştur. Elde edilen matür sperm hücreleri ICSI'da kullanılarak gebelik sağlanabilmektedir. İntrasitoplazmik sperm

injeksiyonu, 1992 yılında ilk kez Palermo tarafından uygulanmış ve ilk gebelik elde edilmiştir (90). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için gerekli spermatozoanın elde edilmesi amacıyla azospermik olgularda perkütan yaklaşımla testis veya epididimden sperm aspirasyonu (Testiküler Sperm Aspirasyonu veya Perkütan Epididimal Sperm Aspirasyonu), mikrocerrahi yöntemler ile epididimden sperm aspirasyonu (Mikroskopik Epididimal Sperm Aspirasyonu) veya biyopsi yöntemleri ile testisten alınan doku içerisinde spermatozoa eldesi gibi uygulamalar ile yapılan çalışmalarda %30-80 oranında spermatozoa elde edilebileceği belirtilmiştir (91, 92). Amer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TESE işlemi sırasında tek veya çoklu biyopsi başarısı karşılaştırıldığında tek biyopsi ile %14 olan spermatozoa elde edebilme oranı, çoklu biyopsiler uygulandığında %63'e ulaşmaktadır (93). Biyopsi sayısının artırılması her ne kadar spermatozoa bulma şansını arttırsa bile doku travmasına ve küçük testislerde serum testosteronunun düşmesine neden olmaktadır. Testiküler sperm ekstraksiyonu, eskiden konvansiyonel çoklu biyopsilerle yapılmaktayken artık birçok merkezde mikrodiseksiyon yöntemi ile (mikro TESE) uygulanmaktadır. Mikro-TESE, ilk defa Schlegel tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır (82). Yapılan çalışmalarda konvansiyonel TESE ile spermatozoa bulma oranları % 0-45 arasında iken mikro-TESE ile bu oran %43-63 arasında belirtilmektedir (94). Turunç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise konvansiyonel TESE ile sperm bulma oranı %33.7 iken, sperm bulunamayan hastalara aynı seansta mikro-TESE yapılmasıyla bu oran %50.8'e yükselmiştir (95). Nonobstrüktif azospermi tanımlı hastalarda TESE sonrası spermatozoa bulma oranı ortalama %50 olup ICSI sonrası %35 ile %52 arasında gebelik gerçekleşebilmektedir (96, 97). Nonobstrüktif azospermi olgularında ilk TESE denemesinde sperm bulunamayan olgularda belirli bir süre sonra işlemin tekrarlanması önerilmektedir. Günümüzde iki TESE işlemi arasında en az 6 ay zaman aralığı olması gerektiği fikri kabul görmüştür. Önerilen maksimum TESE uygulama sayısı dördür. Daha fazla girişim hücre bulma şansını arttırmamaktadır (98).

Genel veya lokal anestezi altında medial rafeden geçen tek veya skrotal cilt damarlarının arasından iki taraflı transvers skrotal kesilerden birisi kullanılarak testisler eksplore edilir. Testisler dışarıya doğurtulur. Tunika vajinalis açılır ve ameliyat mikroskobu altına getirilir. Tunika albuginea'nın ön yüzünde 15-25X büyütme altında avasküler bir alan belirlenir. Tunika albuginea, bistüri ile kan damarlarının arasındaki avasküler alandan transvers olarak kesilir. Seminifer tübüller mikroskop altında incelenir. Spermatogenezin olduğu tübüller daha geniş, kalın, dolgun ve sarı renkli görülür. Sertoli cell only içeren

tübüller ise ince, beyaz ve saç teli gibi görülür. Mikroportegü yardımıyla seminifer tübüller diseke edilerek daha kalın tübüller ortaya çıkarılır ve keskin eğri iris makası ile eksize edilir. Çıkarılan örnek insan tubal sıvı medyumu içine konur. Sperm bulunduktan sonra koter ile hemostaz yapılır ve tunika albuginea kesisi 6-0 naylon sütür ile kapatılır. Testis tekrar skrotum içine yerleştirilir ve tunika vajinalis 5-0 vikril ile kapatılır (99).

2.11. Yardımcı Üreme Teknikleri

Yardımcı üreme teknikleri; idiyopatik erkek infertilitesi, açıklanamayan infertilite ve tedavisi olmayan durumlar ile diğer infertilite tedavilerinin başarısız sonuçlandığı durumlarda kullanılan ve giderek popüler hale gelen bir tedavi seçeneğidir.

2.11.1. Yapay İnseminasyon (IUI)

Yapay inseminasyon, seçilmiş çiftlerde infertilite tedavisinde kullanılan bir yardımcı üreme tekniğidir. Diğer yardımcı üreme tekniklerine göre daha ucuz ve daha az invaziv olması en önemli avantajlarıdır. Bu teknikteki amaç, fertilizasyonun gerçekleştiği bölgedeki gamet yoğunluğunu artırmaktır. Eski tekniklere kıyasla yeni dönemde uygulanan semen örneğinin endoserviks içine yerleştirilmesinin (intraservikal inseminasyon), idiyopatik infertilite, servikal faktörlere bağlı infertilite veya ılımlı erkek kaynaklı infertilite gibi hasta gruplarında yüksek gebelik oranları sağladığı tespit edilmiştir (100).

2.11.2. İn-Vitro Fertilizasyon (IVF) / İntra Stoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI)

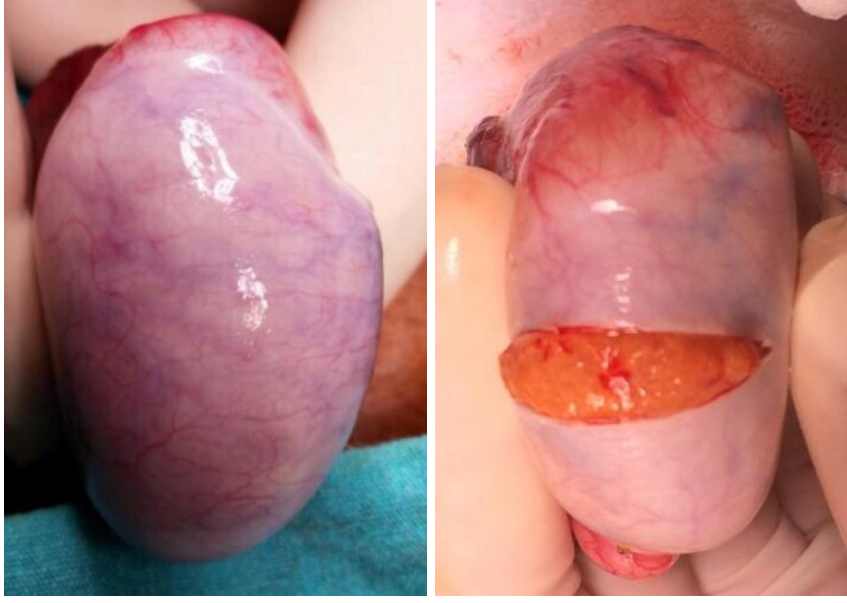
İn-vitro fertilizasyon, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon kullanılarak dişi partnerden her siklusta çok sayıda oosit elde edilmesini sağlar. Ovumlar ovulasyon gerçekleşmeden hemen önce ultrason kılavuzluğunda iğne aspirasyonu ile alınır. Elde edilen oositler işlenmiş sperm ile karıştırılarak IVF gerçekleştirilir. Gelişmekte olan embriyolar 2-3 gün kültür ortamında inkübe edildikten sonra transservikal yolla uterusu yerleştirilir. Transfer edilen embriyoların sadece %20-30'u gebelikle sonuçlanır. İn-vitro fertilizasyonun başarısız olduğu veya yeterli sayıda sperm elde edilemediği durumlarda spermin tek bir oosit ile intrasitoplazmik injeksiyon yoluyla döllendiği teknik olan ICSI kullanılır. Gebelik şansı %45'i bulan ICSI ile spermin fonksiyonel kalitesinden bağımsız olarak epididim veya testisten elde edilecek immatür spermatozoa da fertilizasyon için kullanılabilir (101).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Üroloji polikliniğine Eylül 2003-Ocak 2015 tarihleri arasında çocuk sahibi olamama şikayeti nedeniyle başvurmuş olan ve yapılan tetkikler neticesinde NOA olduğu tespit edilerek değerlendirilen 1076 hastanın verileri incelendi. Bu hastalardan mikro-TESE operasyonu yapılan 994 hasta çalışmamıza dahil edildi. Hastalardan ayrıntılı anamnez alındı. Anamnez alınırken hastaların yaşları ve infertilite süreleri sorgulandı. Fizik muayenede testis boyutları orşidometre ile ölçülerek kaydedildi. Serum FSH ve testosteron düzeylerine bakıldı. Bu hastalar arasından genetik testleri (Karyotip analizi ve Y kromozomu mikrodelesyonu) mevcut olan 622 hasta belirlendi. Hastaların dosyaları retrospektif olarak tarandı, bu gruptaki 540 hastaya mikro-TESE operasyonu yapıldığı belirlendi. Genetik analiz sonucu bulunan ve mikro-TESE operasyonu sonucu sperm bulunan ve bulunmayan hastalar ayrı ayrı not edildi.

Mikro-TESE operasyonunda, hastanın sedasyonu sağlandıktan sonra uygun saha arıtımı ve örtümünü takiben No:15 bistüri ile skrotumda raphe hattından yaklaşık 4 cm'lik longitudinal kesi ile insizyon yapıldı. Künt ve keskin diseksiyonlarla skrotumun katları açılarak hangi taraf testisten işleme başlanacaksa o taraf testis doğurtuldu. Tunika albuginea üzerinde avasküler bir alan belirlenerek No:15 bistüri ile transvers kesi yapılarak seminifer tübüllere ulaşıldı (Şekil 3.1). Mikroskop altında 40X büyük büyütme ile görüntülenen daha dilate ve daha opak görümlü tübüllerden örnek alınarak steril tüplere konuldu ve sperm bulunup bulunmadığının incelemesi için embriyoloji laboratuvarına gönderildi (Şekil 3.2).

Embriyoloji laboratuvarına gönderilmiş olan materyallerin içerisinde sperm bulunursa mikro-TESE operasyonuna son verilerek testis kapatıldı; ancak sperm bulunamadıysa mikroskop altında diğer testis de aynı yöntem ile açılarak örnek alınmaya devam edildi. İşlem esnasında ayrıca testisten patoloji için doku örneği alındı. İşlem sonrası hastalara pansuman yapılarak ayaktan taburculuk işlemi yapıldı.



Şekil 3.1. Tunika Albuginea kesisi öncesi avasküler hattın belirlenmesi ve transvers insizyon (Görüntü Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Üroloji kliniğinden alınmıştır)



Şekil 3.2. Mikro-TESE operasyonu esnasında saptanan dilate-sarı renkli, sperm olması muhtemel tübüllerin bulunması ve toplanması (Görüntü Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Üroloji kliniğinden alınmıştır)

Genetik analiz sonucuna göre KS saptanan ve Y kromozomu mikrolelesyonu bulunan hastalar ile genetik analiz sonucunda anormallik saptanmayan hastalar mikro-TESE operasyonunda sperm bulma olasılığı açısından ayrı ayrı karşılaştırıldılar. Ayrıca genetik analiz sonucu olan ve olmayan hasta grupları yaş, infertilite suresi, serum FSH ve testosteron duzeyleri ve testis volümü açısından da karşılaştırıldılar. Genetik analiz sonucu bulunan ve mikro-TESE yapılan hastaların testis biyopsi sonuçları da değerlendirildi. Çalışmamıza Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından KA14/277 proje numarası ile onay alındı.

İstatistiksel analizler SPSS v.22 (Statistical Package for Social Sciences) programı kullanılarak yapıldı. Sürekli değerkenler, ortalama \pm standart sapma ve ortanca (minimum-maksimum) değerleri ile; kategorik değerkenler ise sayı ve yüzde olarak sunulmuştur. Klinefelter sendromu ve Y kromozomu mikrolelesyonu bulunma durumuna göre yaş, infertilite suresi, testis volümü, serum FSH ve testosteron seviyelerinin değerlendirilmesinde ‘bağımsız gruplarda t testi’ kullanıldı. Mikro-TESE sonucu ile yaş, infertilite suresi, testis volümü, FSH ve testosteron ilişkisinin saptanmasında ‘bağımsız gruplarda t testi’, Mikro-TESE sonucunun, KS ve Y kromozomu mikrolelesyonu ile ilişkisinin saptanmasında ise ‘Ki-kare testi’ kullanıldı. Tek yönlü analizlerde mikro-TESE sonucunu etkilediği saptanan değerkenler ile model oluşturularak lojistik regresyon analizi yapıldı ve mikro-TESE sonucunu etkileyen faktörler saptandı. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi ‘ $p < 0.05$ ’ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen hastalar içerisinde NOA olan ve kliniğimizde mikro-TESE operasyonu yapılmış olan toplam hasta sayımız 994 idi. Bu hastaların yaş ortalaması 34.37 (± 6.30) yıl, ortalama infertilite süreleri 6.85 (± 5.05) yıl, ortalama testis volümleri 12.62 (± 6.60) mL, ortalama serum FSH düzeyleri 17.37 (± 13.30) mIU/mL, ortalama serum testosteron düzeyleri ise 4.31 (± 2.04) ng/mL olarak tespit edildi. Bu hastaların 472'sinde (%47.5) sperm saptanırken, 522'sinde (%52.5) sperm bulunamadı. 994 hastanın tanımlayıcı verileri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Nonobstrüktif azospermi saptanan ve kliniğimizde mikro-TESE operasyonu yapılan 994 hastanın tanımlayıcı verileri

| | Hasta Sayısı (n=994) | Ortalama \pm Standart Sapma | Ortanca (minimum-maksimum) |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Yaş (yıl) | 994 | 34.37 \pm 6.30 | 34.00 (19-65) |
| İnfertilite süresi (yıl) | 986 | 6.85 \pm 5.05 | 5.00 (1-35) |
| Testis Volümü (mL) | 994 | 12.62 \pm 6.60 | 12.00 (1-25) |
| FSH (mIU/mL) | 929 | 17.37 \pm 13.30 | 14.00 (1-132) |
| Testosteron (ng/mL) | 848 | 4.31 \pm 2.04 | 4.00 (0.7-20) |

Genetik analiz yapılan (karyotip analizi ve Y kromozomu mikrolelesyonu) toplam hasta sayımız 622 idi. 579 hastaya karyotip analizi yapıldı. 532 hastada ise Y kromozomu mikrolelesyonu incelemesi yapıldı. Hem karyotip analizi hem de Y kromozomu mikrolelesyonu yapılan hasta sayımız ise 490 idi.

Karyotip analizlerine göre, 145 (%25) hastada nonmozaik KS (47,XXY); 3 hastada mozaik KS (47,XXY[98]/46,XY[2]); 2 hastada 47,XYY; 1 hastada 46,Y,t(X;3)(q26;q23); 2 hastada 46,XX; 1 hastada 45,X[46]/46,X,idel(Y)(p11.3)[54]; 1 hastada

mos45,X[17]/46,XY[13]; 2 hastada inversiyon; 1 hastada translokasyon; 1 hastada ise translokasyon+inversiyon saptandı. Klinefelter sendromu saptanan 41 hasta, çeşitli nedenlerden dolayı mikro-TESE operasyonundan vazgeçti ve çalışma dışında bırakıldı.

Y kromozomu mikrolelesyonu bakılan hastaların sadece 24'ünde (%4.5) Y kromozomu mikrolelesyonu vardı. Bu hastaların 11'inde (%2) *AZFc* delesyonu, 6'sında (%1.1) *AZFc+d* delesyonu, 3'ünde (%0.6) *AZFb+c+d* delesyonu, 2'sinde (%0.4) *AZFb* delesyonu ve 1'inde (%0.2) *AZFa+b+c* delesyonu, 1'inde (%0.2) ise *AZFa* delesyonu saptandı. Bu hastalardan Y kromozomu mikrolelesyonu saptanan 10 hasta operasyondan vazgeçti. Bu hastaların 3 tanesinde *AZFb+c+d* delesyonu, 2 tanesinde *AZFc* delesyonu, 2 tanesinde *AZFc+d* delesyonu, 1 tanesinde *AZFa+b+c*, 1 tanesinde ise *AZFa* delesyonu mevcuttu.

Genetik anomali saptanan hastaların önemli bir bölümüne Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı tarafından genetik danışmanlık verildi.

Genetik analiz bakılarak mikro-TESE operasyonu uyguladığımız 540 hastanın yaş ortalaması 33.59 (± 5.88) yıl, ortalama infertilite süreleri 6.40 (± 4.72) yıl, ortalama testis boyutları 11.19 (± 6.77) mL, ortalama serum FSH değerleri 18.64 (± 13.66) mIU/mL, ortalama serum testosteron değerleri ise 4.12 (± 2.11) ng/mL olarak tespit edildi. Bu hastaların tanımlayıcı verileri Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Genetik analiz bakılan ve mikro-TESE operasyonu uygulanan 540 hastanın tanımlayıcı verileri

| | Hasta Sayısı (n=540) | Ortalama \pm Standart Sapma | Ortanca (minimum-maksimum) |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Yaş (yıl) | 540 | 33.59 \pm 5.88 | 33.00 (22-62) |
| İnfertilite süresi (yıl) | 536 | 6.40 \pm 4.72 | 5.00 (1-25) |
| Testis Volümü (mL) | 540 | 11.19 \pm 6.77 | 10.00 (1-25) |
| FSH (mIU/mL) | 523 | 18.64 \pm 13.66 | 16.00 (1-86) |
| Testosteron (ng/mL) | 490 | 4.12 \pm 2.11 | 4.00 (0.7-20) |

Genetik analiz sonuçları bulunan ve mikro-TESE operasyonu yapılan NOA hastalarında sperm bulma oranı %40 (218/540) iken genetik analiz bakılmayan 454 hastada bu oran %56 (253/454) idi.

Karyotip analizi yapılan ve opere olan hasta sayısı 497 idi. Bu hastaların 104'ünde (%20.9) KS saptandı. Bu 104 hastanın 22'sinde (%21.2) mikro-TESE'de sperm bulunurken, kromozom analizi normal olan 393 hastanın 176'sında (%45) sperm bulundu. Karyotip analizi normal olan hastalar ile KS olan hastalar arasında mikro-TESE'de sperm bulma oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Sperm bulma oranı KS olan hastalarda daha düşüktü ($p < 0.001$).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz ve mikro-TESE operasyonu yapılan 104 KS'li hastanın yaş ortalaması $32.74 (\pm 5.55)$ yıl, ortalama testis boyutları $5.19 (\pm 3.37)$ mL, ortalama serum FSH değerleri $30.99 (\pm 13.57)$ mIU/mL, ortalama serum testosteron değerleri ise $3.29 (\pm 2.61)$ ng/mL olarak tespit edildi. Karyotip analizi normal olan 393 hastanın yaş ortalaması $33.78 (\pm 6.06)$ yıl, ortalama testis boyutları $12.24 (\pm 6.59)$ mL, ortalama serum FSH değerleri $15.55 (\pm 11.57)$ mIU/mL, ortalama serum testosteron değerleri ise $4.31 (\pm 1.96)$ ng/mL olarak tespit edildi. Bu iki hasta grubunun, yaş, testis volümü, FSH ve testosteron düzeylerinin ortalama dağılımları ile bu gruplardaki sperm bulma oranları Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Karyotip analizine göre KS olan ve olmayan hastaların parametrelerinin karşılaştırmalı tablosu

| | *KS (-) (ortalama±SD) | *KS (+) (ortalama±SD) | P değeri |
|--------------------------------------|--|--|-----------------|
| Yaş (yıl) | 33.78 ± 6.06 | 32.74 ± 5.55 | 0.115** |
| Testis Volümü (mL) | 12.24 ± 6.59 | 5.19 ± 3.37 | <0.001** |
| FSH (mIU/mL) | 15.55 ± 11.57 | 30.99 ± 13.57 | <0.001** |
| Testosteron (ng/mL) | 4.31 ± 1.96 | 3.29 ± 2.61 | <0.001** |
| Sperm Bulunma Oranı (n, %) | 176 / 393 (%45) | 22 / 104 (%21,2) | <0.001*** |

* KS: Klinefelter Sendromu ** Bağımsız gruplarda t testi *** Ki-kare testi

Y kromozomu mikrolelesyonu bakılan ve mikro-TESE operasyonu yapılan NOA hasta sayısı 450 idi. Bu hastaların 14'ünde (%3.1) Y kromozomu mikrolelesyonu olduğu saptandı. Bu hastaların 12'sinde *AZFc* delesyonu, 2'sinde *AZfb* delesyonu mevcuttu. Bu 14 hastanın yaş ortalaması 31.86 (\pm 5.80) yıl, ortalama testis boyutları 15.93 (\pm 5.56) mL, ortalama serum FSH değerleri 14.26 (\pm 8.69) mIU/mL, ortalama serum testosteron değerleri ise 5.12 (\pm 3.15) ng/mL olarak tespit edildi. Y kromozomu mikrolelesyonu olmayan 436 hastanın yaş ortalaması 33.36 (\pm 5.64) yıl, ortalama testis boyutları 11.56 (\pm 6.77) mL, ortalama serum FSH değerleri 18.27 (\pm 13.63) mIU/mL, ortalama serum testosteron değerleri ise 4.13 (\pm 1.82) ng/mL idi. Mikrolelesyon saptanan 14 hastanın 4'ünde (%28.6) mikro-TESE'de sperm bulunurken, 10 hastada sperm bulunamadı. Sperm bulunan 4 hastada da *AZFc* delesyonu mevcuttu. Y kromozomu mikrolelesyonu olmayan 436 hastanın 170'inde (%39) mikro-TESE'de sperm bulundu. Her iki grup arasında mikro-TESE'de sperm bulma oranı açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.580$). Bu iki hasta grubunun, yaş, testis volümü, FSH ve testosteron düzeylerinin ortalama dağılımları ile bu gruptaki sperm bulma oranları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10. Y kromozomu mikrolelesyonu olan ve olmayan hastaların karşılaştırmalı tablosu

| | *Y-mik(+) (ortalama\pmSD) | *Y-mik (-) (ortalama\pmSD) | P değerı |
|--------------------------------------|---|--|-----------------|
| Yaş (yıl) | 31.86 \pm 5.80 | 33.36 \pm 5.64 | 0.329** |
| Testis Volümü (mL) | 15.93 \pm 5.56 | 11.56 \pm 6.77 | 0.012** |
| FSH (mIU/mL) | 14.26 \pm 8.69 | 18.27 \pm 13.63 | 0.276** |
| Testosteron (ng/mL) | 5.12 \pm 3.15 | 4.13 \pm 1.82 | 0.284** |
| Sperm Bulunma Oranı (n, %) | 4 / 14 (%28,6) | 170 / 435 (%39) | 0.580*** |

* Y-mik: Y kromozomu mikrolelesyonu ** Bağımsız gruplarda t testi *** Ki-kare testi

Genetik analizi olan ve mikro-TESE operasyonu yapılan 540 hastanın, yaşları, infertilite süreleri, testis boyutları, serum FSH ve testosteron seviyeleri ile genetik anomalilerinin olup olmaması gibi bağımlı değişkenlerin, mikro-TESE operasyonunda sperm bulunma oranını etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla yapılan tek yönlü analizler neticesinde, yaş, testis volümü, serum FSH ve testosteron düzeyi ile KS varlığının Mikro-TESE’de sperm bulma oranını etkilediği ($p<0.05$), buna karşın infertilite süresi ile Y kromozomu mikrolelesyonu varlığının sperm bulma oranını etkilemediği ($p>0.05$) tespit edildi. Nonobstrüktif azospermisi olan hastalarda mikro-TESE’de sperm bulunmasını etkileyen faktörler Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11. Nonobstrüktif azospermik hastalarda mikro-TESE’de sperm bulunmasını etkileyen faktörler

| | | TESE SONUÇ | | P |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| | | 0 | 1 | |
| Klinefelter Sendromu | Var (n=104) | %78.8 | %21.2 | <0,001* |
| | Yok (n=393) | %55 | %45 | |
| Y- mikrolelesyonu | Var (n=14) | %71.4 | %28.6 | 0.580* |
| | Yok (n=436) | %61 | %39 | |
| Yaş (yıl) | | 33.82±6.01 | 34.99±6.55 | 0.004** |
| İnfertilite Süresi (yıl) | | 6.92±5.12 | 6.80±4.97 | 0.712** |
| Testis Volümü (mL) | | 11.21±6.55 | 14.18±6.32 | <0.001** |
| FSH (mIU/mL) | | 19.67±13.60 | 14.75±12.50 | <0.001** |
| Testosteron (ng/mL) | | 4.13±2.08 | 4.53±1.98 | <0.001** |

* Ki-kare testi ** Bağımsız gruplarda t testi

Mikro-TESE operasyonlarını etkileyen faktörlerin tümünün bir arada değerlendirildiği lojistik regresyon analizi sonuçları tablo 4.12’de verilmiştir. Tüm faktörler bir arada değerlendirildiğinde sadece karyotip analizinin normal olması yani hastada KS olmamasının, Mikro-TESE’de sperm bulma olasılığını etkilediği saptanmıştır; KS olmayanlarda sperm bulma olasılığı, KS olanların 2.073 katıdır.

Tablo 4.12. Nonobstrüktif azospermisi olan hastalarda mikro-TESE sonucu ile sperm bulunmasına etki etmesi öngörülen parametrelerin lojistik regresyon analizi ile karşılaştırılması

| | B | p | OR | %95 Güven Aralığı |
|---|----------|----------|-----------|--------------------------|
| Sabit | -1.934 | 0.005 | | |
| Yaş | 0.024 | 0.156 | 1.024 | 0.991 – 1.058 |
| Testis volümü | 0.023 | 0.174 | 1.024 | 0.990 – 1.058 |
| FSH düzeyi | -0.024 | 0.261 | 0.990 | 0.972 – 1.008 |
| Testosteron düzeyi | 0.027 | 0.561 | 1.028 | 0.937 – 1.127 |
| Klinefelter Sendromu Yok | 0.729 | 0.020 | 2.073 | 1.124 – 3.824 |

Genetik analiz yapılarak mikro-TESE operasyonuna alınan 540 hastanın 494’ünün patolojik incelemesi mevcuttu. Testis dokularının patolojik incelenmesi neticesinde, 19 (%3.5) hastada hipospermatogenez, 93 (%17.2) hastada inkomplet maturasyon aresti, 183 (%33.8) hastada komplet maturasyon aresti, 101 (%18.7) hastada Sertoli cell only sendromu, 98 (%18.1) hastada fibrozis ve atrofi saptandı. Patoloji derecesi hipospermatogenezisten fibrozise doğru gittikçe, mikro-TESE’de sperm bulma oranlarının azaldığı sonucuna ulaşıldı. Bu oran istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$). Patoloji sonuçlarının tanımlayıcı analizi Tablo 4.13’ te verilmiştir.

Tablo 4.13. Nonobstrüktif azospermi tanısıyla kliniğimizde yapılan mikro-TESE operasyonu esnasında testis biyopsisi alınan 494 hastanın patolojik tanıları ve sperm bulunma oranları

| | | PATOLOJİ SONUCU | | | | |
|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| | | Hipo-spermatogenez | İnkomplet Spermatozitik Arest | Komplet Spermatozitik Arest | Sertoly Cell Only | Fibrozis ve Atrofi |
| TESE SONUÇ | Sperm Var (%) | 19 (%100) | 67 (%72) | 56 (%30) | 21 (%20) | 17 (%17) |
| | Sperm Yok (%) | 0 (%0) | 26 (%28) | 127 (%70) | 80 (%80) | 81 (%83) |
| SAYI (n=494) | | 19 | 93 | 183 | 101 | 98 |

5. TARTIŞMA

İnfertil hastaların %10-15'inde azospermi olduğu bilinmektedir (3). Avrupa Üroloji Derneği 2015 kılavuzuna göre azospermik hastaların %80-85'inde NOA saptanmaktadır. Günümüzde çocuk sahibi olma istemiyle hastaneye başvuran ve spermiyogram tetkikinde NOA saptanan hastalara uygulanan altın standart tedavi yöntemi mikroskopik testiküler sperm ekstraksiyonudur (88). Bu grup hastalarda altta yatan nedenler araştırılmakta, tüm hastalara rutin genetik analiz incelemesi yapılmaktadır. Bu hasta grubuna ilaveten EAU ve AUA kılavuzlarına göre infertilite nedeniyle başvuran ve belirgin oligospermisi olan (sperm sayısı 5 milyondan az) hastalarda da genetik analiz yapılmasının gerekli olduğu belirtilmektedir. Şiddetli oligospermik ve azospermik hastaların ortalama %15'inde genetik kusurlar bulunmaktadır (36).

İnfertiliteye neden olan çok sayıda genetik hastalık bulunmaktadır. Klinefelter sendromu gibi seks kromozomu bozuklukları, delesyon, inversiyon ve translokasyon gibi otozomal (yapısal) kromozomal bozukluklar, Y kromozomu mikrolelesyonu, konjenital vaz agenezisine yol açan genetik hastalıklar, genetik endokrinopatiler ve orak hücreli anemi infertiliteye neden olan başlıca genetik hastalıklar olarak sayılabilir. Genetik analizin infertil erkeklerdeki temel endikasyonu azospermi ve ağır oligospermidir. Androloji kliniğinde çalışılan temel genetik testler; kromozom analizi ve diğer sitogenetik analizler (örn. FISH), PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile Y kromozom mikrolelesyon analizi ve seçilmiş bazı genlerin sekanslanmasıdır. Güncel infertilite pratiğinde genetik hastalıklar içerisinde en sık karşımıza çıkanlar KS ve Y kromozomu mikrolelesyonu olan hastalardır. Bu nedenle özellikle NOA hastalarında genetik analiz olarak en sık karyotip analizi ve Y kromozomu mikrolelesyonu araştırılmaktadır. Obstruktif azospermide ve CBAVD'de ise kistik fibrosis mutasyon analizi gereklidir (102, 103, 104). Çalışmamızda genetik analiz sonucu bulunan ve mikro-TESE operasyonu yapılan NOA hastalarını değerlendirdik. Bu hastalar arasında sıklık bakımından daha çok rastlanan KS ve Y kromozomu mikrolelesyonu ön plana çıkmış ve çalışmamız bu genetik anormalliklerin mikro-TESE sonuçları üzerinde yoğunlaşmıştır.

Kılavuzlarda sperm sayısı 5 milyonun altında olan oligospermik hastalara karyotip analizi ve Y kromozomu mikrolelesyonu testlerinin yapılması önerilmesine rağmen kliniğimizdeki bu hasta grubuna rutin genetik analiz yapılmamıştır. Bunun sebebinin klinisyenin bu durumu göz ardı etmesi olduğunu düşünüyoruz, çünkü kliniğimizde maalesef

azospermik hastaların önemli bir bölümünde bile genetik analiz tetkikinin yapılmamış olduğu göze çarpmaktadır. Ayrıca genetik analiz yapılması önerilmesine rağmen analiz yaptırmak istemeyen hasta sayısı da azımsanmayacak ölçüde fazladır. Bununla birlikte, kliniğimizde son yıllarda bütün azospermik hastalardan ve seçilmiş bazı oligospermik hastalardan rutin genetik analiz istenmektedir.

Günümüzde genetik anomalisi olan NOA hastalarında genetik danışmanlığın verilmesi çok önemlidir. Genetik danışmanlık genetik uzmanları tarafından hasta ve yakınlarına anlatılmalı ve doğacak bebeklerde ortaya çıkabilecek riskler açısından aile mutlaka bilgilendirilmelidir. Danışmanın sonunda aile mikro-TESE ile beraber ICSI/IVF yapıp yapılmaması konusunda kararı verebilecek kadar bilgiye sahip olmalıdır (74). Fakat, *AZFa*, *AZFb* ve her iki delesyonu içeren kombine Y kromozomu mikrolezyonları ya da 46,XX gibi karyotip anomalilerinde mikro-TESE’de sperm bulunma ihtimali olmadığı aileye anlatılmalıdır. Bizim çalışmamızda, genetik danışmanlık sonrası azımsanmayacak sayıda bir hasta grubu mikro-TESE operasyonu olmaktan vazgeçmiş ya da poliklinik takiplerine gelmemiştir. Bu hasta grubunun operasyondan vazgeçme gerekçesi mikro-TESE operasyonundaki sperm bulunma ihtimalinin düşük olduğunun öğrenilmesi ya da olası doğacak olan çocuklarındaki genetik anomali riski olabilir. Ayrıca maddi imkansızlıklar da hastaların operasyondan vazgeçmelerinin başka bir sebebi olabilir.

Klinefelter sendromu; jinekomasti, hipergonadotropik hipogonadizm ve infertilite triadı ile karakterize olan ve erkeklerde en sık rastlanan seks kromozomu bozukluğudur (40, 105). En sık rastlanan karyotip, nonmozaik 47,XXY’dir (%80-85) (106). Daha az sıklıkla mozaik (46,XY/47,XXY) formu görülür. Bizim çalışmamızda da KS saptanan 155 hastanın sadece 3’ünde mozaik KS saptanmıştır. Sperm elde etme açısından riskli grup olarak kabul edilen KS’li hastalarda mikro-TESE ile başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Literatürde KS hastalarına yapılan mikro-TESE operasyonlarında sperm elde etme oranları %20-70 arasında değişmektedir (107, 108). Avrupa Üroloji Derneği’nin 2015 klavuzlarına göre KS olan hastalarda sperm elde etme oranı %30 olarak belirtilmiştir.

Klinefelter sendromu olan hastalarda sperm bulunma oranlarını inceleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sabbaghian ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınlamış oldukları ve şu ana kadar yapılmış en geniş serili çalışma olan 134 hastalık çalışmada, KS’li hastalarda mikro-TESE operasyonlarında sperm elde etme oranı %28.4 olarak bulunmuştur (109). Schiff

ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, 20 KS'li hastaya uygulanan toplam 27 mikro-TESE operasyonu neticesinde 19 işlemde (%70.4) sperm bulunmuştur, bu oran KS hastalarında mikro-TESE operasyonunda şu ana kadar saptanan en yüksek sperm elde etme oranıdır (110). Bakırcıoğlu ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış oldukları 379 hastalık çalışmada, 106 KS'li hastanın 50'sinde (%47) sperm bulunmuştur (111). Ramasamy ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı 68 KS olan hastaları içeren çalışmada, %69 oranında sperm bulma başarısı elde edilmiştir (112). Çalışmamızda KS'li hastaların sadece %21.2'sinde mikro-TESE operasyonlarında sperm bulundu. Bu oranın literatürde yer alan diğer çalışmalardaki oranlara göre düşük olması; farklı coğrafi bölgelerdeki farklı demografik özelliklere, cerrahi tecrübe eksikliğine veya teknik imkansızlıklara bağlı olabilir. Ancak yine çalışmamızda görüldüğü üzere kliniğimizde yapılan mikro-TESE operasyonlarında tüm hastalardaki sperm bulunma oranı %47 olarak literatürdeki sperm bulma oranlarıyla uyumlu bulunmuştur. Bu durum cerrahi tecrübe ve teknik yetersizlik durumlarını ekarte etmektedir. Yaptığımız çalışma, KS olan hastalarda, karyotip analizi normal olan hastalara göre mikro-TESE'de sperm bulunma ihtimalinin bariz bir şekilde düştüğünü ortaya koymasından da önemlidir.

Mikro-TESE yaptığımız bütün hasta gruplarında ortalama sperm bulma oranımız %47 iken genetik analizi bulunan hastalarda sperm bulma oranı %40'a düşmektedir. Aradaki farklılık, daha çok testis volümü düşük ve serum FSH düzeyi daha yüksek olan hastalarda daha sık genetik analiz istenmesine bağlı olabilir. Çalışmamızda bu hasta gruplarında mikro-TESE'de sperm bulma oranının daha düşük olduğu göze çarpmaktadır.

Y kromozomu mikrolelesyonu; azospermik erkeklerin %10-15'inde, şiddetli oligospermik erkeklerin ise %7-10'unda görülür ve literatürde en sık rastlanan delesyon tipi *AZFc* delesyonudur (46,52). *AZFc* delesyonları ve parsiyel *AZFb* delesyonu olan hastaların %50'sinden sperm elde edilebilirken, komplet *AZFb* ve *AZFa* delesyonunda matür spermatozoa bulunma şansı neredeyse yok kabul edilmektedir. *AZFc* bölgesini içeren veya bu bölgeye uzanan delesyonlar (*AZFb+AZFc* ve *AZFa+AZFb+AZFc*), testiküler spermatozoanın total yokluğu ile ilişkili bulunmuştur (65).

Y kromozom mikrolelesyonunun sıklığı, Türk popülasyonunda yapılan Balkan ve arkadaşlarının çalışmasında %1.3 (113), Sargın ve arkadaşlarının çalışmasında %3.3 (63), Akın ve arkadaşlarının çalışmasında %3.93 (114), Tağa'nın tez çalışmasında %6.3 (115),

Çetinkaya'nın tez çalışmasında %9.09 (64), Müslümanoğlu ve arkadaşlarının çalışmasında ise %22.64 (116) olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise Y kromozomu mikrolelesyonu oranı %4.5 olarak bulunmuştur. Literatürde Y kromozomu mikrolelesyonu sıklığı yüksek oranlarda bulunmasına rağmen ülkemizde bizim çalışmamızda da olduğu gibi literatürde beklenen oranın altında bulunmaktadır. Çalışmamızda Y kromozomu mikrolelesyonlarının taranması, Avrupa Moleküler Genetik Kalite Ağı (EMQN) tanı kılavuzuna göre taranması gereken bölgeleri minimum ve ek 8 bölgeyi içerecek şekilde yapılmıştır. Mikrolelesyon sıklığının düşük saptanması çevresel farklılıklara ve hasta seçimlerine bağlı olabilir. Buna ek olarak; Y mikrolelesyonları kromozom üzerinde yamalı şekilde lokalize olmaktadır. Sıklıklar arasındaki bu değişkenliğin taranan bölgelerin sayısı ve kromozom üzerindeki yerlerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Son yıllarda yayınlanan makalelerde EMQN kriterlerinin tanımladığı bölgeler ağırlıklı olarak taranmaya başlanmış ve bildirilen Y mikrolelesyonu sıklıkları düşmüştür (117)

Oates ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada *AZFc* mikrolelesyonları olan 42 infertil erkekte, %42'lik sperm bulma oranı sonucu ve ICSI ile elde edilmiş 18 çocuk olduğunu bildirmişlerdir (118). Bu çalışmada incelenen 42 erkeğin %38'inin ağır oligospermik, %62'sinin azospermik olduğu görülmüştür. Simoni ve arkadaşları ise 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, *AZFc* mikrolelesyonu saptanan azospermik infertil erkeklerde TESE ile sperm bulma oranını %60 olarak belirtmişlerdir (119). Mulhall ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada *AZFc* bölgesini etkileyen delesyonlarda %50 oranında sperm bulunma oranından bahsedilmektedir (120). Bizim çalışmamızda ise Y kromozomu mikrolelesyonu olan hastalarda sperm bulma oranı %28 olarak bulunmuştur. Bu sperm bulma oranı literatürden daha düşüktür. Bu düşüklüğün bir nedeni, sperm bulma ihtimali neredeyse hiç olmayan *AZFb* delesyonu olan 2 hastaya mikro-TESE operasyonu yapılmasıdır. Her iki hastada da mikro-TESE'de sperm bulunamamıştır ve literatürde de belirtildiği gibi bu grup hastalara mikro-TESE operasyonu önerilmemelidir. Çalışmamızda 12 *AZFc* delesyonu olan hastanın 4'ünde (%33) sperm bulunmuştur ve bu oran da literatürdeki oranlardan daha düşüktür. Mikro-TESE operasyonu yapılan Y kromozomu mikrolelesyonlu hasta sayısının oldukça az olması da operasyonda az sayıda sperm bulunmasının bir nedeni olabilir. Unutulmaması gereken önemli bir ayrıntı ise genetik anomalisi olan infertil hastaların bu sorunu doğacak olan çocuklarına da aktarmaları ihtimali olduğudur. Page ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada ICSI ile çocuk sahibi olan ve *AZFc* delesyonu saptanan 3 erkeğin

çocuklarının da bu delesyonu taşıdığını bildirmişlerdir. Mikrodelesyonu babasından alan erkek çocuk aynı infertilite sorununu gelecekte yaşayacaktır.

Literatüre bakıldığında KS ve Y kromozomu mikrodelesyonunun her ikisini içeren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Altıntaş ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları 165 hastalık çalışma bunlardan birisidir. Çalışmalarında tüm olgularda mikro-TESE'de %37.5 oranında sperm saptanırken, *AZFc* delesyonu mevcut olan 10 hastada %27.2 oranında sperm elde edilmiş, KS olan 7 hastada ise sperm bulunamamıştır (121). Balkan ve arkadaşlarının Türkiye'de 80 infertil erkek üzerinde yaptıkları çalışmada, hastaların 71 tanesi normal karyotipte bulunmuş, 7 hastada KS saptanmış, 2 hastada ise otozomal kromozomal bozukluk saptanmıştır (113). Bu çalışmalar dışında literatürde her iki genetik bozukluğun bir arada değerlendirildiği çok daha düşük serili çalışmalar olmakla birlikte, mevcut çalışmalar NOA hastalarında TESE operasyonlarında sperm bulma oranlarının bir arada değerlendirildiği çalışmalar değildir.

6. SONUÇ

Çalışmamız, literatürde nonobstrüktif azospermisi olan infertil hastalarda Y kromozomu mikrolelesyonu ile kromozom analizi sonuçlarını birlikte irdeleyen ve bu hastalarda mikro-TESE operasyonlarındaki sperm bulma oranlarını araştıran en yüksek serili çalışmadır. Çalışma, ülkemizde infertil hastalardaki genetik anomali sıklığını ve bu genetik anomalilerde mikro-TESE’de sperm bulunma oranını göstermesi açısından da referans bir çalışma olabilir. Çalışmamızda NOA hastalarında literatüre göre KS saptanma oranı belirgin derecede daha yüksek iken Y kromozomu mikrolelesyonu saptanma oranı ise literatürdeki çalışmalara göre belirgin derecede daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, KS veya Y kromozomu mikrolelesyonu olan hastalarda mikro-TESE’de sperm bulma oranı ise literatürdeki çalışmalara göre daha düşük bulunmuştur. Oranın düşük olması; genetik analiz bakılan hasta popülasyonuna, taramada kullanılan gen bölgelerindeki farklılığa ve farklı bölgelerdeki farklı demografik özelliklere bağlı olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl* 7: 1–53, 1987.
2. Spira A. Epidemiology of human reproduction. *Hum Reprod* 1 (2): 111-115, 1986.
3. Jarow JP, Espelan MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azospermie patient. *J Urol* 142: 62-67, 1989.
4. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 126: 13-25, 2003.
5. Özpak L, Pazarbaşı A. Erkek İnfertilitesinin Sitogenetiği. *Çukurova Üniversitesi Arşiv Kaynak Dergisi* 20: 230-245, 2011.
6. Simmons FA. Human İnfertility. *N Engl J Med* 255(25): 1186-1192, 1956.
7. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 56(2): 192-193, 1991.
8. Tuttelman F, Nieschlag E. Classification of andrological disorders. In: Nieschlag E, Behre HM and Nieschlag S (eds). *Andrology: Male reproductive health and dysfunction* (3rd edition) Berlin: Springer Verla 87-93, 2010.
9. Heller CG, Clermont Y. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* 140: 184–186. 1963.
10. Oberg K, Fugl-Meyer AR, Fugl-Meyer KS. On categorization and quantification of women's sexual dysfunctions: an epidemiological approach. *Int J Impot Res* 16(3): 261-269, 2004.
11. Tur-Kaspa I, Maor Y, Levran D, Yonish M, Mashiach S, Dor J. How often should infertile men have intercourse to achieve conception? *Fertil Steril* 62(2): 370-375, 1994.
12. Werner CA. Mumps orchitis and testicular atrophy; a factor in male sterility. *Ann Intern Med* 32(6): 1075-1086, 1950.

13. Puri P, Barton D, O'Donnell B. Prepubertal testicular torsion: subsequent fertility. *J Pediatr Surg* 20(6): 598-601, 1985.
14. Nudell DM, Monoski MM, Lipshultz LI. Common medications and drugs: how they affect male fertility. *Urol Clin North Am* 29(4): 965-973, 2002.
15. Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* 49(4): 508-513. 1997.
16. Sonksen J, Biering-Sorensen F. Fertility in men with spinal cord or cauda equina lesions. *Semin Neurol* 12(2): 106-114, 1992.
17. Abalovich M, Levalle O, Hermes R, Scaglia H, Aranda C, Zylbersztein C, Oneto A, Aquilano D, Gutierrez S. Hypothalamic-pituitary-testicular axis and seminal parameters in hyperthyroid males. *Thyroid* 9(9): 857-863, 1999.
18. Costabile RA, Spevak M. Cancer and male factor infertility. *Oncology (Williston Park)* 12(4): 557-570, 1998.
19. Rueffer U, Breuer K, Josting A, Lathan B, Sieber M, Manzke O, Grotenhermen FJ, Tesch H, Bredenfeld H, Koch P, Nisters-Backes H, Wolf J, Engert A, Diehl V. Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. *Ann Oncol* 12(9): 1307-1311, 2001.
20. Nalesnik JG, Sabanegh ES Jr, Eng TY, Buchholz TA. Fertility in men after treatment for stage 1 and 2A seminoma. *Am J Clin Oncol* 27(6): 584-588, 2004.
21. Kedia KR, Markland C, Fraley EE. Sexual function after high retroperitoneal lymphadenectomy. *Urol Clin North Am* 4(3): 523-528, 1977.
22. Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 79(2): 287-291, 2003.
23. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 154(3): 1030-1034, 1995

24. Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology* 55(6): 881-885, 2010.
25. Robins JC, Carson SA. Female fertility: what every urologist must understand. *Urol Clin North Am* 35: 173-181, 2008.
26. Sancak B, Cumhuri M. Baş-boyun ve iç organlar. *Fonksiyonel Anatomi* (Sancak B. ed) 2. Baskı. Ankara. ODTÜ Geliştirme Vakfı, , 2: 261-297, 2002.
27. Tisher PV. Diameter of testicles. *N Eng J Med* 285(26): 1489-1493, 1971.
28. Karagüzel E. Leydig Hücresi ve işlevleri. *Erkek üreme sistemi hastalıkları ve tedavisi* (Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçiöglü O, Kadioğlu A, ed) *İstanbul Tıp Kitabevi* 79-86, 2013.
29. Lipshultz L. Subfertility. *Current Urologic Theraphy* (Kaufmann JJ, ed). Philadelphia, WB Saunders, 1980.
30. ASRM: New guidelines for the use of semen donor insemination, 1990.
The American Fertility Society. *Fertil Steril* 53: 1-13, 1990.
31. Sussman EM, Chudnovsky A, Niederberger CS. Hormonal evaluation of the infertile male: has it evolved? *Urol Clin North Am* 35(2): 147-155, 2008.
32. Trummer H, Ramschak-Schwarzer S, Haas J, Habermann H, Pummer K, Leb G. Thyroid hormones and thyroid antibodies in infertile males. *Fertil Steril* 76(2): 254-257, 2001.
33. Smith JF, Walsh TJ, Turek PJ. Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North Am* 35(2): 221-227, 2008.
34. Matsuda T. Diagnosis and treatment of post-herniorrhaphy vas deferens obstruction. *Int J Urol* 7 Suppl: 35-38, 2000.
35. Poongathai J Gopenath T S, Mononayaki S. Genetics of human male infertility. *singapore Med J* 50: 336-347, 2009.
36. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. *Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi* 232-237, 2004.

37. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions State-of-the-art. *Int J Androl* 2: 5-19, 2014.
38. Düzcan F, Atmaca M, Özcan ÇG, Bağcı H. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acto Obstet Gynecol Scand* 82: 53-56, 2003.
39. Van Asche E, Boundella M, Tournaye H. Cytogenetics of infertile men. *Human Reprod* 11: 1-24, 1996.
40. Visootsak J, Graham JM Jr. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet J Rare Dis* 24: 1-42, 2006.
41. Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia aspermatogenes without A-Leydigism and increased excretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2: 615-627, 1942.
42. Sabanegh E, Agarwal A. Male infertility. *Campbell-Walsh Urology* (Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA) 10th Edition. Philadelphia, Elsevier Limited, 1: 616-647, 2014.
43. Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6263-6267, 2005.
44. Oates RD. The genetic basis of male reproductive failure. *Urol Clin North Am* 35 (2): 257-270, 2008.
45. Ishikawa T, Yamaguchi K, Kondo Y, Takenaka A, Fujisawa M. Metabolic syndrome in men with Klinefelter's syndrome. *Urology* 71(6): 1109-1113, 2008.
46. Ergun-Longmire B, Vinci G, Alonso L, Matthew S, Tansil S, Lin-Su K, McElreavey K, New MI. Clinical, hormonal and cytogenetic evaluation of 46,XX males and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 18: 739-748, 2005.
47. Turunç T, 46,XX testiküler bozukluk. *Androloji Bülteni* 16(59): 274-279, 2014.

48. Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Egozcue J. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 17(6): 307-309, 2000.
49. Foresto. C, Ferlin A, Gianaroli I, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couple. *Eur J Hum Genetic* 10: 303-312, 2002.
50. Antonelli A, Gandini L, Petrinelli P, Marcucci L, Elli R, Lombardo F: Chromosomal alterations and male infertility. *J Endocrinal Invest* 23: 677, 2000.
51. Patrizio P, Broomfield D, The genetic basis of male infertility. Glover TD, Barrett CLR, eds. *Male fertility and infertility*. 1st ed. Cambridge: University Press 162-179, 1999.
52. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Pakla D, Foresta C. Male infertility; role of genetic background. *RBM online* 14: 734-745, 2007.
53. Jager RJ, Harley VR, Pleiffer RA. A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet* 92: 350-355, 1992.
54. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 38: 119-124, 1976.
55. Fujisawa M, Shirakawa T, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Y chromosome microdeletion and phenotype in cytogenetically normal men with idiopathic azoospermia. *Fertility and Sterility* 76: 491-495, 2001.
56. Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 4: 739-744, 1998.
57. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22: 226-239, 2001.
58. Kamp C, Hirschmann P, Voss H. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 9(17): 2563-2572, 2000.
59. Blagosklonova O, Fellmann F, Clavequin MC. AZFa deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study. *Mol Hum Reprod* 6(9): 795-799, 2000.

60. Ma K, Inglis JD, Sharkey A. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 75: 1287-1295, 1993.
61. Collier B, Gorgoni B, Loveridge C, et al: The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *EMBO J* 24(14): 2656-2666, 2005.
62. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 53: 27-41, 1999.
63. Sargin CF, Berker-Karauzum S, Manguoglu E, Erdogan T, Karaveli S, Gulkesen KH. AZF microdeletions on the Y chromosome of infertile men from Turkey. *Ann Genet* 47: 61-68, 2004.
64. Çetinkaya M. Azoospermik infertil türk erkeklerinde y-kromozom mikrodelesyon sıklığının araştırılması ve yorumlanması. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2008.
65. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, et al: Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 13: 3332-3337, 1998.
66. Bertuzzo CS, Pýnto Jr W. Molecular screening of CFTR gene in Brazilian men with bilateral agenesis of the vas deferens. *Human Fertil* 9: 53-56, 2006.
67. Phillipson GT, Petrucco OM, Matthews CD. Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15(2): 431-435, 2000.
68. Rutland J, de long RU. Random ciliary orientation. A cause of respiratory tract disease. *N Engl J Med.* 323: 1681-1687, 1990.
69. Akdere H, Burgazlı M, Erkek infertilitesine genetik yaklaşım. *Androloji Bülteni* 15(54): 207-211, 2013.

70. Harley HG, Rundle SA, MacMillan LC, Mayring J, Brook JD, Crow S. Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 52: 1164-1174, 1993.
71. Sharland M, Patton MA, Burch M. A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child* 67: 178-183, 1992.
72. Kopar AP, Özçelik N, Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme. *S.D.Ü. Tıp Fak. Dergisi* 14(3): 48-51, 2007.
73. Osegbe DN, Akiyanju OO. Testicular dysfunction in men with sickle cell disease *Postgrad Med J* 63: 95-100, 1987.
74. Johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 70: 397-411, 1998.
75. Şahin F. Erkek infertilitesinde genetik yaklaşım. *J Turk Soc Obstet Gynecol* 3(3) 147-151, 2006.
76. Ron-El R, Strassburger D, Friedler S, Komarovski D, Bern O, Soffer Y, et al. Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 12(6): 1222-1226, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/12.6.1222>, 1997.
77. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB, Milunsky A. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 267(13): 1794-1797, 1992.
78. Matsuda T, Horii Y, Yoshida O. Unilateral obstruction of the vas deferens caused by childhood inguinal herniorrhaphy in male infertility patients. *Fertil Steril* 58(3): 609-613, 1992.
79. Hopps CV, Goldstein M, Schlegel PN. The diagnosis and treatment of the azoospermic patient in the age of intracytoplasmic sperm injection. *Urol Clin North Am* 29(4): 895-911, 2002.

80. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 14(1): 131-135, 1999.
81. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. Male Infertility. *EAU Guidelines* 1-42, 2015.
82. Schlegel PN. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America* (Werthman PE, ed). Saunders Company, 539-555, 1999.
83. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1(1): 2-25, 1970.
84. Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES, Veeck LL, Zaninovic N, Menendez S, Rosenwaks Z. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med* 26; 338(9): 588-590, 1998.
85. Levine LA, Dimitriou RJ, Fakouri B. Testicular and epididymal percutaneous sperm aspiration in men with either obstructive or nonobstructive azoospermia. *Urology* 62(2): 328-332, 2003.
86. Dabaja AA, Schlegel PN. Microdissection testicular sperm extraction: an update. *Asian J Androl* 15: 35-39, 2013.
87. Matthews GJ, Goldstein M. Microsurgical autogenous sperm reservoir with simultaneous epididymal sperm aspiration: a novel approach for the man with surgically unreconstructable obstruction. *Tech Urol* 1(3): 120-125, 1995.
88. Nudell DM, Conaghan J, Pedersen RA, Givens CR, Schriock ED, Turek PJ. The mini-micro-epididymal sperm aspiration for sperm retrieval: a study of urological outcomes. *Hum Reprod* 13(5): 1260-1265, 1998.
89. Sheynkin YR, Ye Z, Menendez S, Liotta D, Veeck LL, Schlegel P. Controlled comparison of percutaneous and microsurgical sperm retrieval in men with obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 13(11): 3086-3089, 1998.

90. Palermo GD, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340 (8810): 17-18, 1992.
91. Schlegel PN, Li PS. Microdissection TESE: sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod Update* 4(4): 439-443, 1998.
92. Tournaye H, Camus M, Vandervorst M, Nagy Z, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 3: 69-73, 1997.
93. Amer M, Ateyah A, Hany R, Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum Reprod* 15(3): 653-656, 2000.
94. Okada H, Dobashi M, Yamazaki T, Hara I, Fujisawa M, Arkawa S, Kamidono S. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. *J Urol* 168(3): 1063-1067, 2002.
95. Turunc T, Gul U, Haydardedeoglu B, Bal N, Kuzgunbay B, Peskircioglu L, Ozkardes H. Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermic patients: a prospective comparative study. *Fertil Steril* 94(6): 2157-2160, 2010.
96. Nicopoullou JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Ramsay JW. The results of 154 ICSI cycles using surgically retrieved sperm from azoospermic men. *Hum Reprod* 19(3): 579-585, 2004.
97. Vernaev V, Bonduelle M, Tournaye H, Camus M, Van SA, Devroey P. Pregnancy outcome and neonatal data of children born after ICSI using testicular sperm in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 18(10): 2093-2097, 2003.
98. Friedler S, Raziel A, Schachter M, Strassburger D, Bern O, Ron-El R. Outcome of first and repeated testicular sperm extraction and ICSI in patients with nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod* 17(9): 2356-2361, 2002.
99. Goldstein M. Surgical management of male. *Campbell-Walsh Urology* (Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA) 10th Edition. Philadelphia, Elsevier Limited, 1(22): 648-687, 2014.

100. Keck C, Gerber-Schafer C, Wilhelm C, Vogelgesang D, Breckwoldt M. Intrauterine insemination for treatment of male infertility. *Int J Androl* 20 Suppl 3: 55-64, 1997.
101. Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z. ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med* 27 (2) : 191-201, 2009.
102. Claustres M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod Biomed Online* 10(1): 14–41, 2005.
103. Samli H, Samli MM, Yilmaz E, Imirzalioglu N. Clinical, andrological and genetic characteristics of patients with congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD). *Arch Androl* 52(6): 471–477, 2006.
104. Bareil C, Guittard C, Altieri JP, Templin C, Claustres M, des Georges M. Comprehensive and rapid genotyping of mutations and haplotypes in congenital bilateral absence of the vas deferens and other cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related disorders. *J Mol Diagn* 9(5): 582–588, 2007.
105. Yoshida A, Miura K, Shirai M. Chromosome abnormalities and male infertility. *Assist Reprod Rev* 6: 93–100, 1996.
106. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364: 273–283, 2004.
107. Westlander G, Ekerhovd E, Granberg S, Hanson L, Hanson C, Bergh C. Testicular ultrasonography and extended chromosome analysis in men with nonmosaic Klinefelter syndrome: a prospective study of possible predictive factors for successful sperm recovery. *Fertil Steril* 75: 1102-1105, 2001.
108. Madgar I, Dor J, Weissenberg R, Raviv G, Menashe Y, Levron J. Prognostic value of the clinical and laboratory evaluation in patients with nonmosaic Klinefelter syndrome who are receiving assisted reproductive therapy. *Fertil Steril* 77: 1167-1169, 2002.
109. Sabbaghian M, Modarresi T, Hosseinifar H, Hosseini J, Farrahi F, Dadkhah F, Chehrizi M, Khalili G, Sadighi Gilani MA. Comparison of sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with and without Klinefelter syndrome. *J Urol* 83(1): 107-110, 2014.

110. Schiff JD, Palermo GD, Takeuchi T. Success of TESE-ICSI in men with non-mosaic Klinefelter syndrome. *Fertil Steril* 78(1): 248, 2002.
111. Bakircioglu ME, Ulug U, Erden HF, Tosun S, Bayram A, Ciray N, Bahceci M. Klinefelter syndrome: does it confer a bad prognosis in treatment of nonobstructive azoospermia? *Fertil Steril* 95(5): 1696-1699, 2011.
112. Ramasamy R, Ricci JA, Palermo GD, Gosden LV, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome. *J Urol* 182(3): 1108-1113, 2009.
113. Balkan M, Tekes S, Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet* 25: 559-565, 2008.
114. Akin H, Onay H, Turker E, Ozkinay F. Primary male infertility in Izmir/ Turkey: a cytogenetic and molecular study of 187 infertile Turkish patients. *J Assist Reprod Genet* 28: 419-423, 2011.
115. Tağa S. Çukurova bölgesindeki infertil erkeklerde y kromozomu (Azf genleri) mikrodelesyonlarının saptanması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2008.
116. Muslumanoglu MH, Turgut M, Cilingir O, Can C, Ozyurek Y, Artan S. Role of the AZFd locus in spermatogenesis. *Fertil Steril* 84: 519-522, 2005.
117. Peter Harper. *Practical Genetic Counselling* 6th Edition, Part I General aspects of genetic counselling, 1. Genetic counselling: an introduction. Arnold, London, 3-20, 2014
118. Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. 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.* 17: 2813-2824, 2002.
119. Simoni M, Tuttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience. *Reprod Biomed Online* 16: 289-303, 2008.
120. Mulhall JP, Reijo R, Alagappan R, Brown L, Page D, Carson R, 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 12: 503-508, 1997.

121. Altıntaş R, Durmaz AA, Karamazak S, Tavmergen E, Onay H, Altay AB. Testiküler sperm ekstraksiyonu sonuçlarının AZF gen mutasyonları ile ilişkisi. Türk Üroloji Dergisi - Turkish Journal of Urology 37 (3): 229-234, 2011.