



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÜROLOJİ ANA BİLİM DALI

**TESTİS DOKUSUNDAKİ CAJAL BENZERİ HÜCRELERİN SPERM
MATÜRASYON EVRELERİNE OLASI ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ERAY HASIRCI

ANKARA, 2012



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÜROLOJİ ANA BİLİM DALI

**TESTİS DOKUSUNDAKİ CAJAL BENZERİ HÜCRELERİN SPERM
MATÜRASYON EVRELERİNE OLASI ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ERAY HASIRCI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tahsin TURUNÇ

ANKARA, 2012

Bu çalışma KA11/142 proje numarası ile Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hekimlik mesleğinin öğrenilmesinde ara kademelerden biri olan asistanlık eğitiminin sonuna gelmiş bulunuyorum. Mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek ve hastalara zarar vermeden faydalı olmak için önümde aşmam gereken birçok engel olduğunun farkında olarak;

Üroloji eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam sayın Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ'e, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Ç. Levent PEŞKİRCİOĞLU'na, sayın Prof. Dr. M. İlteriş TEKİN'e, sayın Prof. Dr. Y. Cem AYGÜN'e, sayın Doç. Dr. Ayhan DİRİM'e, sayın Yrd. Doç. Dr. A. İbrahim OĞUZÜLGEN'e, tez çalışmam sırasında arada mesafeler olmasına rağmen sınırsız desteğini, sabrını ve mesaisini esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç. Dr. Tahsin TURUNÇ'a ve tez çalışmamın patoloji ile ilgili kısmında yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Nebil BAL'a,

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım asistan arkadaşlarıma, Üroloji hemşire arkadaşlarıma ve çalışanlarıma,

Bugünlere ulaşmamda büyük pay sahibi olan, yardım ve desteğini esirgemeyen, sevgisi ile her zaman yanımda olan eşim Dr. Senem HAS HASIRCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Eray HASIRCI

ANKARA, 2012

ÖZET

Cajal hücreleri, gastrointestinal sistemde motiliteyi düzenleyen pacemaker hücrelerdir. Üriner sistemde de Cajal benzeri hücrelerin motilite regülasyonunda rol oynadıkları düşünülmektedir. Bu hücrelerin testiste rol aldıkları görev bilinmemektedir. Çalışmamızda nonobstrüktif azoospermi nedeniyle Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) yapılan hastaların testis biyopsilerinde Cajal benzeri hücrelerin sayı ve dağılımlarındaki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda nonobstrüktif azoospermi nedeniyle TESE yapılan 99 çalışma grubu olgusu subgruplara ayrılmış (hipospermatogenez grubunda 19, matürasyon arresti grubunda 40, Sertoli cell only sendromu grubunda 20 ve testiküler atrofi ve fibrozis grubunda 20 olgu) ve obstrüktif azoospermi nedeniyle TESE yapılan 20 kontrol grubu olgusu ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen kesitlerde CD117 kullanılarak Cajal benzeri hücrelerin sayı ve dağılımları immünohistokimyasal olarak incelenmiştir.

Kontrol grubuna göre tüm çalışma gruplarında Cajal benzeri hücre sayıları daha fazla idi. Bu artış matürasyon arresti ve Sertoli cell only sendromu subgruplarında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Tüm gruplarda Cajal benzeri hücrelerin dağılımları birbirlerine benzerdi.

Cajal benzeri hücrelerin nonobstrüktif azospermili hastalardaki sayıca artışı, bu hücrelerin spermatogenezi olumsuz yönde etkiledikleri ya da spermatogenezden bağımsız rolleri olabileceğini düşündürmektedir. Testiste Cajal benzeri hücrelerin morfolojik yapısını ve fonksiyonlarını daha iyi tanımlamak için elektrofizyolojik ve elektron mikroskopik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Cajal benzeri hücreler, infertilite, testis, spermatogenez, azoospermi

İNGİLİZCE ÖZET

Evaluation of Probable Effects of Cajal Like Cells in Testis Tissue on Sperm Maturation Stages

Cajal cells are pacemaker cells regulating gastrointestinal tract motility. Cajal like cells are known to play a role in the regulation of motility in the urinary tract, too. The role of these cells in the testicular tissue is unclear. In this study we aimed to investigate changes in the number and distribution of Cajal like cells in testis biopsies obtained during testicular sperm extraction (TESE) in patients with nonobstructive azoospermia.

In this study, 99 cases with nonobstructive azoospermia who underwent TESE were divided into subgroups (19 cases in hypospermatogenesis group, 40 cases in group of maturation arrest, 20 cases in group of Sertoli cell only syndrome, 20 cases in group of testicular atrophy and fibrosis) and 20 cases undergoing TESE due to obstructive azospermia formed the control group. The number and distribution of Cajal like cells were examined with immunohistochemical method using CD117.

The number of Cajal like cells were higher in all study groups compared to the control group and this was statistically significant in maturation arrest and Sertoli cell only syndrome subgroups ($p < 0.05$). Distribution of Cajal like cells were similar to each other in all groups.

The increased number of Cajal like cells in nonobstructive azoospermic patients suggest that these cells negatively effect spermatogenesis or they are independent of spermatogenesis. Electrophysiological and electron microscopic studies are needed to define morphology and function of Cajal like cells in the testis, better.

Keywords: Cajal like cells, infertility, testis, spermatogenesis, azoospermia

İÇİNDEKİLER

	<i>Sayfa</i>
Önsöz ve Teşekkür	iii
Özet	iv
İngilizce Özet	v
İçindekiler Dizini	vi
Kısaltmalar Dizini	viii
Tablolar ve Şekiller Dizini	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis	3
2.1.1. Anatomi	3
2.1.2. Embriyoloji	3
2.1.3. Histoloji	4
2.1.4. Vaskülarizasyon	6
2.1.5. İnervasyon	7
2.1.6. Fizyoloji	7
2.1.7. Fonksiyonu	8
2.2. İnfertilite	10
2.2.1. Genel Bakış	10
2.2.2. Erkek İnfertilitesinde Öykü	12
2.2.3. Fizik Muayene	12
2.2.4. Temel Laboratuvar Analizleri	13
2.2.5. Radyolojik Tanı Yöntemleri	20

2.2.6. Testis Biyopsisi	22
2.2.7. Erkek İnfertilitesinde Tanı ve Tedavi Kategorileri	25
2.2.8. İnfertilite Medikal Tedavisi	32
2.2.9. Azoospermi	38
2.2.10. Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE)	44
2.3. Cajal'ın İnterstisyel Hücreleri	47
2.3.1. Tarihçe	47
2.3.2. Terminoloji	48
2.3.3. Embriyolojik Orijinleri	48
2.3.4. Yapıları	49
2.3.5. Ayırıcı Tanı	50
2.3.6. Saptama Yöntemleri	51
2.3.7. Cajal'ın İnterstisyel Hücrelerinin Patolojik Bulgular ile İlişkileri	53
2.3.8. Üriner Sistemde Cajal Benzeri Hücreler	54
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	63
4. BULGULAR	66
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
7. KAYNAKLAR	79

KISALTMALAR

ASMC: Atipik Düz Kas Hücresi

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

DHT: Dihidrotestosteron

DNA: Deoksiribonükleik asit

FDA: Food and Drug Administration

FSH: Folikül Stimulan Hormon

GİS: Gastrointestinal Sistem

GnRH: Gonadotropin Salgılatan Hormon

hCG: Human Chorionic Gonadotropin

hMG: Human Menopausal Gonadotropin

ICSI: İntrastoplazmik Sperm İnjektasyonu

IUI: İntrauterin İnseminasyon

IVF: In Vitro Fertilizasyon

KAH: Konjenital Adrenal Hiperplazi

LH: Lüteinize Edici Hormon

NOA: Nonobstrüktif Azoospermi

SCOS: Sertoli Cell Only Sendromu

SRY: Sex Determining Region on Y Chromosome

TESE: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu

ÜYT: Üremeye Yardımcı Teknikler

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

TABLO VE ŞEKİLLER

	<i>Sayfa</i>
Tablo 2.1. Semen analizi için en düşük referans değerler	16
Tablo 2.2. İnfertilite ile başvuran hastaların semen analizi bulgularına göre dağılımları	25
Tablo 2.3. Erkek infertilitesinin etiyolojik faktörlere göre dağılımı	26
Tablo 4.1. Gruplara göre Cajal benzeri hücre sayılarının dağılımları	67
Şekil 4.1. Gruplara göre toplam Cajal benzeri hücre sayıları	67
Şekil 4.2. Kontrol grubu olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)	68
Şekil 4.3. Hipospermatogenez grubundaki olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)	68
Şekil 4.4. Matürasyon arresti grubundaki olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)	69
Şekil 4.5. SCOS grubundaki olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)	69
Şekil 4.6. Testiküler atrofi ve fibrozis grubundaki olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)	70

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Cajal'ın interstisiyel hücreleri ilk olarak 1893 yılında bir nörohistolog olan İspanyol Ramon Y. Cajal tarafından tanımlanmıştır. Bu hücrelerin gastrointestinal sistem (GİS)'de özefagustan internal anal sfinktere kadar tüm sistem boyunca submukozal ve intramusküler tabakalarda bulundukları saptanmıştır (1). Bu hücreler GİS'de yavaş dalga akımı üretilmesinde, elektriksel iletinin kolayca yayılmasında ve enterik sinirler ile düz kas hücreleri arasında nörotransmisyonu aracılık etmede önemli fizyolojik görevler üstlenirler (2). Bu hücrelerin sayıca azalmalarının ya da dağılım anormalliklerinin GİS motilite bozukluğu ile seyreden bazı hastalıkların etiyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (3).

Üriner sistemde Cajal benzeri hücreler ise ilk kez 1999 yılında gösterilmiştir (4). Günümüzde bu hücreler; hayvanlarda sıçan vaz deferensinde, sıçan ureterinde, kobay prostatında, kobay mesanesinde ve tavşan uretrasında gösterilmiştir. İnsanlarda ise ureteropelvik bileşke, renal pelvis, ureter, vezikoüreteral bileşke, mesane ve uretrada gösterilmiştir (5-9). Solari ve arkadaşları yaptıkları çalışmada konjenital ureteropelvik bileşke darlığında bu hücrelerin sayılarının azaldığını tespit etmişlerdir. Dolayısıyla konjenital ureteropelvik bileşke darlığının etiyolojisinde Cajal benzeri hücrelerin azlığının rol oynayabileceği düşünülmüştür (8). Bir başka çalışmada ise bu hücrelerin sıçan vaz deferenslerinde motiliteden sorumlu hücreler olabilecekleri belirtilmiştir (9). Yine bir başka çalışmada, insan mesanesinin trigonal bölgesinde, ön duvarına oranla Cajal benzeri hücre sayısının trigonun fonksiyonundan dolayı fazla olduğu ileri sürülmüştür (6). Ayrıca mesane ve prostatta bu hücrelerin kontraktıl aktivitenin düzenlenmesinde de rol oynayabileceklerine ilişkin çalışmalar vardır (5, 10). Testiste Cajal benzeri hücreler ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışma söz konusudur.

Günümüzde Cajal benzeri hücrelerin tespiti için genellikle c-kit antikoru kullanılmaktadır (11). Testiste yapılan bir çalışmada embriyofetal ve immatür testisli olgularda c-kit pozitif boyanan hücrelerin membran reseptörlerinin somatik hücreler (Sertoli ve Leydig hücreleri) ve germ hücreleri (Spermatogonyum tip A ve tip B) tarafından eksprese edildikleri gösterilmiştir (12). Rodríguez tarafından yapılan bir başka çalışmada ise testis interstisyumunda c-kit ile pozitif boyanan Cajal benzeri hücreler gösterilmiş ve bu hücrelerin peritübüler alandaki kontraktiliteden sorumlu olduğu düşünülen myoid hücreler ile yakın komşulukları olduğu bulunmuştur (13). Bu konu ile

ilişkili olarak yapılan bir çalışmada c-kit reseptör ekspresyonunun seminifer tübül epitelinin proliferasyonunu ve tübüler motiliteyi düzenleyebileceği, dolayısıyla spermatogenezi oluşturan faktörler üzerinde de bu reseptörlerin etkili olabileceği öne sürülmüştür (14).

Bu çalışmada, birinci aşamada nonobstrüktif azoospermisi (NOA) olan ve bu nedenle testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) yapılan hastalardan alınan biyopsi materyallerinde c-kit pozitif Cajal benzeri hücrelerin eksprese edilip edilmedikleri incelenecektir. İkinci aşamada ise TESE ile alınan dokularda bu hücrelerin normal spermatogenez ile spermatogenezin farklı matürasyon evrelerinde (hipospermatogenez, matürasyon arresti, Sertoli cell only sendromu ve Leydig hücre hiperplazisi) birbirlerinden sayıca ve dağılım yönünden farklılık gösterip göstermediklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Cajal benzeri hücrelerin spermatozoa elde edilemeyen olgularda sayıca azalmış olduklarının bulunması, bu hücrelerin spermatogenezin indüksiyonunda da görevli hücreler olabileceklerini gösterebilir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Testis

2.1.1.Anatomi

Sağlıklı genç bir erkekte, oval şekildeki testis 15-25 ml hacminde ve longitudinal olarak 4.5-5.1cm boyutlarındadır (15). Testis parankimi sırasıyla en dışta tunika vaginalisin visseral yaprağı, tunika albuginea ve en içte tunika vaskülozadan oluşan üç tabakalı bir kapsül ile çevrilidir. Testis parankimi septalar ile kompartmanlara bölünmüştür. Her bir septum, seminifer tübülleri en az bir sentrifugal arter içeren loblara böler. Seminifer tübüller, germ hücreleri ve interstisiyel dokuları barındırır. İnterstisiyel doku sinir, kan ve lenfatik damarlar ile birlikte Leydig hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlardan meydana gelir. İnsanlarda interstisiyum total testis hacminin % 20-30'unu oluşturur (16).

Epididim, testisin posterolateral yüzeyine yapışır. Bu noktada tunika albuginea, damarların ve duktusların testiküler kapsülü geçtiği noktada mediastinum testisi oluşturmak için içeri doğru uzanır. Septa radiata, mediastenden tunika albugineanın iç yüzeyine sayıları 200-300 arasında değişen koni şekilli lobülleri (her biri bir ya da daha fazla konvüle seminifer tübülünden oluşur) oluşturmak için yapışır. Tübülleri çevreleyen gevşek doku içerisinde testosteron üreten interstisiyel hücreler vardır. Lobüllerin tepelerine doğru seminifer tübüller kıvrımlarını kaybedip düzelirler (tübüli rekti) ve mediastende rete testisi oluştururlar. Rete testis, testiküler sıvı ve spermatozoanın epididim baş kısmına aktarılmasında rol oynayan 6-12 efferent kanalcığın birleşmesi ile oluşur (17). Her bir lobülünden gelen duktus tek bir epididim duktusuna drene olur. Yaklaşık 3-4 metre uzunluğunda ve tunika vaginalisin bağ dokusu kılıfı ile sıkıca sarılmış olan bu kanal, kuyruğa doğru ilerledikçe çapı ve kalınlığı artarak duktus deferensi meydana getirir (18).

2.1.2.Embriyoloji

Erkek vücut yapısının gelişimi, fertilizasyon esnasında baba sperminden gelen Y kromozomu ile anne oositinden gelen X kromozomu tarafından belirlenir. Embriyogenesis sırasında, erkek ve kadın embriyolarında gonadal farklılaşma ayrı zamanlarda meydana gelir. Başlangıçta embriyonik over ve testis morfolojik olarak birbirinden ayrılamaz.

Gonad, ilkel böbreğin (mezonefroz) yüzeyinde çöломik epitelin bir kalınlığı olarak başlar. Bu kalınlık, gonadal kabartıya doğru büyür ve takiben primordial germ hücreleri epitelin içine doğru hareket eder. Primordial germ hücreleri, yolk kesesinden (allontois) genital kabartıya doğru kemotaktik sinyaller kullanarak ve embriyodaki gerçek lokalizasyonlarına yerleşmelerini sağlayan ekstraselüler matriks proteinlerinin izinde psödopodial hareket ile göç ederler. Farklılaşmamış gonad evresinde gonodal kabartıdan sonra epitelyal dokunun medüller kordonları gelişir. Konsepsiyondan sonra yaklaşık 7. haftada, over ve testis farklılaşmasında ilk tanımlanabilir ayrım basamağı primordial germ hücrelerinin medüller kordlar içine hareketidir. Sertoli hücre prekürsörleri ile sarılı primordial germ hücreleri bundan sonra seminifer kordlar olarak tanımlanır ve bu değişiklik testiste interstisiyel ve seminifer olarak iki yeni bölüm ortaya çıkarır.

Testisin erken farklılaşmasındaki morfogenetik olaylar SRY (*Sex Determining Region on Y chromosome*) geni (Y kromozomunda cinsiyet belirleyici bölge) tarafından kontrol edilir. Testis belirleyici faktör olan SRY geninin tanımlanması, Y kromozomunda SRY delesyonu olan erkeklerin fenotip olarak kadın, diğer taraftan X kromozomuna SRY geni translokasyonu olanların ise genotip olarak XX, fenotip olarak erkek yapıda olduklarını gösteren çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Daha sonraki çalışmalar göstermiştir ki, SRY geni testis gelişimi için gerekli değildir. SRY geni tarafından düzenlenen sinyallerin başlangıcından sorumlu morfogenetik olaylar araştırma aşamasındadır. Mezonefrozdaki testise migrasyon olan hücreler, daha sonra Leydig hücrelerine differansiye olacak mezenkimal kök hücrelerin kaynağı olarak değerlendirilir. Sertoli hücre öncülleri kadın reproduktif organ dokularının regresyonuna neden olan anti-müllerian hormon sekrete ederler (19). Fetal Leydig hücrelerinden testosteron sekresyonu daha sonra epididim, vaz deferens ve aksesuar seks bezlerini oluşturacak olan Wolf kanal sisteminin farklılaşmasını sağlar. Cinsiyet belirleyici genin (SRY) etkisi altındaki bir diğer transkripsiyon faktörü olan steroidojenik faktör-1 ise Leydig hücrelerinde sitokrom P-450 steroidojenik enzimlerinin varlığını sağlar ve Sertoli hücreleri ile pituitar gonodotropların farklılaşmasını da başlatır (20).

2.1.3.Histoloji

İnterstisiyum

İnterstisiyum; kan damarları, lenfatik damarlar, fibroblastik destek hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri ve Leydig hücreleri içerir. Testiküler makrofajların testiste

Leydig hücrelerini de içeren parankimal hücrelerin düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (21). Leydig hücreleri tek başına total testis hacminin yaklaşık % 5-12'sini oluşturur ve testiküler steroid üretiminin çoğunluğundan sorumludurlar (22). Kolesterolde sentezlenen testosteron, insan testisinde sentezlenen ana steroiddir (23). Testosteronun kolesterolde üretimi için ilk olarak kolesterolün mitokondri iç membranına taşınması gereklidir. Bu taşınma, iki transport proteini ile sağlanır. Bu iki transport proteini steroid akut regülatör protein ve periferik benzodiyazepin proteinidir. Lüteinize edici hormonun (LH) bağlanması, Leydig hücrelerinde protein sentezine neden olur. Dolayısıyla testosteron üretiminin primer regülasyonu temel olarak LH tarafından sağlanır. Lüteinize edici hormonun bağlanması bazı hücre içi olaylar aracılığıyla mitokondri içine kolesterol transportunu başlatır (24).

Seminifer Tübüller

Germinal elemanlar ve destek hücrelerini içeren seminifer tübüller germ hücrelerinin üretimi için uygun bir çevre oluştururlar. Destekleyici hücreler, bazal membranın destek hücreleri ve Sertoli hücrelerini içerirler. Germinal elemanlar ise yavaş büyüyen primitif kök hücre grupları, hızla proliferen olan spermatogonyum, mayoza giden spermatositler ve metomorfoz spermatidleri içeren epitelyal hücre gruplarından oluşur (25).

Peritübüler Yapılar

Seminifer tübüller insanlarda birkaç tabakalı peritübüler doku ile çevrilidir. Tübülden interstisiyel dokuyu ayıran, fibrositlerin dış adventisyal tabakasıdır. Diğer tabaka bağ doku tabakaları arasında dağılmış myoid hücreleri içerir. Üçüncü peritübüler tabaka seminifer epitelin hemen altındaki bazal membrana komşudur. Bu kalın iç tabaka büyük miktarda kollajen içerir (26). İnsanlarda peritübüler myoid hücrelerin primer olarak kontraktıl fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Ratlarda bu hücrelerin kontraktıl fonksiyonu termal ve endokrin çevre yapısına oldukça duyarlıdır ve deneysel kriptorşidizm oluşturulmasını izleyen 5 gün içinde bu kontraksiyonlar, spermatogenezi etkileyen peritübüler yapılardaki kalınlaşmayı takiben kaybolmaktadır (27).

Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri; düzensiz kenarlı nükleusları, belirgin nükleolusları, düşük mitotik indeksleri, germ hücreleri ile aralarındaki bağlantılar ve komşu Sertoli hücre membranları

arasındaki sıkı tek tip bileşke yapıları ile karakterizedirler. Sertoli hücreleri seminifer tübül bazal membran üzerinde yer alırlar ve tübül lümenine doğru ipliksi sitoplazmik dallanmalar gönderirler. Germinal hücreler ise sertoli hücrelerinin bu sitoplazmik uzantıları arasında yer alırlar. Birbirini izleyen daha ileri evre spermatosit ve spermatidler bu epitelin daha üst seviyelerinde ve diferansiye olmamış spermatogonyum bazal membranının yakınında yer alırlar (28).

2.1.4.Vaskülarizasyon

Testis ve epididimin arteriyel kanlanması üç kaynaktan olur; internal spermatik arter, deferensiyel arter ve eksternal spermatik ya da kremasterik arter (29). Spermatik arter renal arterin hemen altında abdominal aortadan çıkar, iç inguinal halka üzerinde spermatik kordun bir parçası olur ve sonuçta plexus pampiniformisi oluşturan venlerin anastomoz ağıyla yakın ilişki içinde bulunur. Bazı bölgelerde sadece vasküler duvarın kalınlığı ile ayrılan, karşı akımlı arter ile venlerin pampiniform plexustaki vasküler düzeni, ısı ve küçük moleküllerin karşılıklı geçişine izin verir (30). Spermatik kord içinde ısının karşılıklı değişimi ile normal bireylerde rektal ısıdan $2-4^{\circ}\text{C}$ daha düşük sıcaklıkta olacak şekilde testiküler kan akımı sağlanır (31). Pampiniform plexustan ayrılan ve testisin mediastinal yüzüne yayılan spermatik arter, testise girmeden önce aşırı kıvrımlı bir hal alır ve dallanır. Özellikle internal spermatik arter ile deferensiyel arter arasındaki yoğun bağlantılar, bazı erkeklerde internal spermatik arterin kesilmesinden sonra bile testisin atrofiye gitmesini engeller. Testiküler arter, testiküler parankimi penetre eden santrifugal arter serilerine ayrılır. Sonraki dallar ise özel olarak intertübüler ve peritübüler kapillerleri besleyen bir çift arteriole ayrılırlar. Seminifer tübüller yanında ip merdiveni şeklinde uzanan kapillerler, *peritübüler kapillerler* olarak adlandırılırken, interstisyum kolonları içinde uzanan kapillerler ise *intertübüler kapillerler* olarak adlandırılırlar (32).

Testis venlerinin uygun intratestiküler arterler ile birlikte seyretmemesi sıktır. Parankimdeki küçük venler testisin yüzeyel venlerine ya da rete bölgesine doğru ilerleyen mediastinuma yakın bir grup ven içine dökülür (16). Bu iki grup ven pampiniform plexusu oluşturmak üzere deferensiyel venler ile birleşir. Testiste spermatik kord içinde önemli lenfatik kanallar vardır. İntertübüler aralıklardan orjin alan bu lenfatik kanallar lenfatik kapillerleri oluştururlar ve seminifer tübüllere geçmezler. Spermatik kordda oluşan

lenfatik obstrüksiyon interstisyumda dilatasyona neden olur, ancak seminifer tübüller etkilenmez. Bu bulgu interstisyumun ekstraselüler bölümünün lenfatikler ile drene olduğunu, ancak seminifer tübüllerin olmadığını düşündürür (33).

2.1.5.İnervasyon

Testisin somatik inervasyonu yoktur, esas olarak intermezenterik sinirler ve renal pleksustan otonomik sinirleri alır (34). Bu sinirler testis içine testiküler arterlerin çevresinden girerler. Baumgarten ve arkadaşları testiküler adrenerjik inervasyonun primer olarak Leydig hücre gruplarını besleyen küçük kan damarları ile sınırlı olduklarını göstermişlerdir (35).

2.1.6.Fizyoloji

Yıllardan beri testis fonksiyonunun hormonal kontrolünün basitçe spermatogenez için Sertoli hücrelerinin Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) ile uyarımı ve testosteron sekresyonu için de Leydig hücrelerinin LH ile uyarımından ibaret olduğu düşünülmüştür. Nitekim Leydig hücreleri için bu basitleştirilmiş model halen kabul edilebilir iken, FSH aktivasyonunda azalma ile sonuçlanan mutasyonlardaki genetik bilgiler, spermatogenez için FSH'nin mutlak gerekli olmadığı hipotezini ortaya çıkarmıştır. Defektli FSH reseptörü olan bazı erkeklerde olduğu gibi, ejakülattaki sperm sayısı azalmış olmasına rağmen, FSH ve FSH reseptör genlerinde knockout mutasyon olan erkek farelerde yapılan çalışmalar, bunların beklenenden daha fertil olduklarını ortaya koymuştur (36).

Testis fonksiyonunu düzenleyen temel hipofiz hormonları LH ve FSH'dır. Her iki hormon, her biri farklı bir gen tarafından kodlanan α ve β adı verilen 2 polipeptid zincir alt biriminden meydana gelen glikoproteinlerdir. Her hormonun α alt birimi özdeş olup tüm diğer hipofiz hormonlarına benzerlik gösterir. Biyolojik ve immunolojik aktiviteyi özgün β alt birimi sağlar. Hormonal aktivite için her iki alt birim de gereklidir. Lüteinize edici hormon 24 saat içinde 8 ile 16 kez salgılanırken, amplitüdü ise 1 ile 3 kat arasında değişir. Bu ritmik salınımlar genellikle Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) salgılanmasını yansıtır. Hem androjenler, hem de östrojenler LH salgılanmasını negatif geri bildirimle düzenlerler. Folikül stimüle edici hormon yaklaşık her 1.5 saatte bir salınır ve amplitüdü %

25 oranında değişir. Gonadotropin salgılatan hormona karşı oluşan FSH yanıtını ölçmek, LH yanıtını ölçmekten daha zordur. Folikül stimüle edici hormon yanıtının amplitüdü daha küçük ve serum yarı ömrü daha uzundur (24). Yakın zamanda keşfedilen gonadal proteinler olan inhibin ve aktivin FSH salgılanması üzerine önemli etkiler gösterebilirler. Bu proteinlerin FSH'nin nispeten GnRH'den bağımsız salgılanmasından sorumlu oldukları düşünölmektedir (24). Folikül stimüle edici hormon ve LH, bilinen tek etkilerini gonadlar üzerinde gösterirler. Hücre içi siklik adenozin monofosfatı arttıran adenilat siklazı aktive ederler. Testiste LH, Leydig hücrelerinde kolesterolün mitokondride pregnenolon ve testosterona dönüşümünü indükleyerek steroidogenezi uyarır. Folikül stimüle edici hormon ise Sertoli hücrelerine ve testis içindeki spermatogonyumların membranlarına bağlanır (24). Gelişim sırasında seminifer tüböl büyümesinin major uyararı FSH'dır. Pubertede spermatogenezin başlaması için FSH şarttır. Erişkinde kantitatif olarak normal düzeylerdeki FSH esas olarak spermatogenezisi uyarır (24).

2.1.7.Fonksiyonu

Normal erkek virilitesi ve fertilitesi, testisin ekzokrin ve endokrin fonksiyonlarının uyum içerisinde çalışması ile düzenlenir. Her iki birim de hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin direkt kontrolü altındadır. Esas olarak Leydig hücrelerinin oluşturduğu interstisiyel kompartman steroidogenezden sorumludur. Seminifer tübölle ekzokrin fonksiyon olarak spermatozoa üretir (37).

Endokrin Testis:

Testisler, prostat ve yardımcı seks doku büyümesini destekleyen major serum androjenini üretirler. Erkeklerde dolaşımdaki major serum androjeni, hemen hemen tamamen testiküler orjinli olan testosterondur (% 95). Normal fizyolojik koşullar altında testislerdeki Leydig hücreleri, testiküler androjenin major kaynağıdır (38). Leydig hücreleri, asetat ve kolesterolden testosteron sentez etmek için esasen LH olmak üzere gonodotropinler tarafından stimüle edilirler. Erkeklerde normal testosteron üretimi yaklaşık günlük 5 gramdır ve salgılanması düzensiz ve belli aralıklarla ritmik olarak gerçekteşir. Normal erkeklerde testosteronun % 0.5-3'ü serbest, diğer bir deyimle bağlanmamış haldedir. Kalanın yaklaşık % 30'u kanda seks hormonu bağlayıcı globuline, % 67'si ise albumin ve diğer serum proteinlerine bağlı haldedir (39). Testosteron

hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini üzerinden negatif geri bildirimle kendi üretiminin başlıca düzenleyicisidir. Testosteronun spermatik ven konsantrasyonu 40-50 µgr/dl'dir ve bu testosteron için yaklaşık 600 ng/dl olan periferik venöz serumda tespit edilen seviyeden 75 kez daha konsantredir (40). Androstenodiol, androstenodion (3 µgr/dl), dehidroepiandrosteron (7 µgr/dl) ve dihidrotestosteron (DHT)'u (0.4 µgr/dl) içeren diğer androjenler de spermatik ven aracılığı ile testisleri terk ederler. Bundan dolayı spermatik vende bu androjenlerin konsantrasyonu testosterondan çok daha azdır. Spermatik vendeki tüm androjenlerin oranı total testosteronun % 15'inden daha azdır (41).

Ekzokrin Testis:

Testisin bir diğer hayati fonksiyonu da spermatogonial gelişimdir. Testisin prenatal gelişimi, primordial germ hücrelerinin gonadal kabartıya göçü ve bu öncülerin primitif testiküler kordu oluşturmak için Sertoli hücreleri ile birlikteliğini kapsamaktadır (42). Farklılaşmamış gonadın primitif germ hücreleri, seminifer kordların da şekillenmesiyle gonositler olarak adlandırılırlar. Bu esnada, gonositler seminifer kord içinde santral pozisyonda lokalizedir. Gonositler, tübüllerin periferine göç ettikten sonra spermatogonyum olarak adlandırılırlar (43). Gebeliğin 8 ile 22. haftalarında tübül başına düşen germ hücre sayısında artış meydana gelir. Doğumdan sonraki 4. aya kadar Sertoli hücresi için germ hücre sayısında hafif bir düşme olur. İmmatür Sertoli hücrelerinin proliferatif aktivitesi germ hücrelerindeki bu rölatif azalmaya neden olur (44). Primitif germ hücreleri, yani gonositler iki farklı hücre popülasyonundan meydana gelmişlerdir. Bir kısmı az miktarda mitokondri ama bol miktarda mikroflament içerir. Yuvarlak çekirdekleri ve büyük çekirdekçikleri vardır. Bu hücreler tüm gestasyon boyunca görülebilirler. İkinci grup gonositler ise sitoplazmalarında bol glikojen ve bol mitokondri bulundurlar. Bunlar ise gestasyonun 10. haftasında kaybolurlar. Gonositler mitoz ile çoğalarak spermatogonyumları meydana getiriler. Spermatogonyumların doğumdan sonra 3. ayda meydana geldikleri gösterilmiştir. Bunun yanı sıra gonositlerin de 4 yaşına kadar testis içinde bulunabilir oldukları bilinmektedir (45).

Gonositlerden önce koyu sitoplazmalı spermatogonyum Ad'ler oluşur. Bunlar mitozla çoğalarak bir yandan yeni stem hücrelerini yaparken, diğer yandan da daha açık sitoplazmalı spermatogonyum Ap'leri oluşturur. Spermatogonyum Ap'ler pubertede FSH ve LH'nin etkileriyle spermatogonyum B'ye dönüşürler. Puberte öncesinde seminifer tübüllerin lümenleri henüz oluşmamıştır. İmmatür Sertoli hücreleri ile bunların arasında

yerleşmiş spermatogonyumlar bulunur. Sertoli hücreleri arasında henüz özel bağlantı kompleksleri gelişmemiştir. Puberte ile birlikte gonadotropik hormonların uyarıları başlayınca germ hücreleri bazale doğru yer değiştirirler ve olgun spermatogonyumları yapmaya başlarlar. Sertoli hücrelerinde ise nükleus bazale kayar ve hücreler arası bağlantı kompleksleri gelişir (45).

Spermatogonyum B'ler mitoz ile çoğalarak preleptoten spermatositleri verirler. Bu hücreler seminifer tübüllerin bazal kompartmanında ve bazal membrana yakın yerleşmiş olup eş zamanda Deoksiribonükleik Asit (DNA) duplikasyonu yaparlar. Sertoli hücreleri arasından lümene doğru ilerlerler. Bu ilerleyişler kan testis bariyerine uygun şekilde olur. Spermatositler bu sırada leptoten ve arkasından zigoten dönemine girerler. Aynı zamanda eşleşmiş genetik materyalde genetik sinapslar meydana gelir. Pakiten döneminde genetik materyal değişimi devam eder ve arkasından hücre uzun bir diploten safhasına girer. Eşleşmiş kromozomlar ayrılır ve kromozomlar arasında köprüler oluşur. Kromozomların metafaz plağında toplanmalarının ardından I. metafaz ve sırayla anofaz ve telofaz safhaları gelişir. Neticede sekonder spermatositler meydana gelir. Artık bu hücreler haploid (23n) sayıda kromozom içermektedirler. Yeni bir DNA sentezi olmadan II. mayoz bölünmeye girerler ve genç spermatidler oluşur. Spermatidler olgun spermatozoa oluşana kadar birtakım morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirirler. Spermatidlerin olgun sperm hücresi olan spermatozoaya başkalaşmalarına ve bu sırada geçirdikleri morfolojik değişikliklere *spermiyogenez* denir (45).

2.2.İnfertilite

2.2.1.Genel Bakış

İnfertilite olgularının yaklaşık % 20'sinde infertilite nedeni tamamen erkek faktöründen kaynaklanırken, % 30-40'ında ise hem erkek hem kadın faktörleri birlikte görülmektedir (46). Normal bir çift için bir ay içerisinde gebelik gelişme ihtimali % 20-25, 6 ay içerisinde % 75 ve bir yıl içerisinde ise % 90'dır (47). Gebeliklerin çoğu, ovulasyon günü ya da ovulasyondan önceki 6 gün içerisinde bulunan cinsel ilişkiler neticesi görülmektedir. Sadece ovulasyonu takip eden günlerde bulunan cinsel ilişkilerin çok azı gebelikle sonuçlanmaktadır. Hem erkek hem de kadın için 24 yaşında fertilizasyon oranları

en yüksektir. Fertilizasyon oranları bu yaştan sonra her iki cinsiyette de düşmeye başlar (48).

Çocuk sahibi olmak isteyen ama fertilité durumları bilinmeyen çiftlerde yapılan çalışmaların büyük bir kısmında gebeliklerin ilk bir yıl içerisinde gerçekleştiği, ancak çiftlerin % 15'inde gebeliğin gerçekleşmediği görülmektedir (49). Tedavi edilmemiş infertil çiftlerin % 25-35'i yalnız cinsel ilişkide bulunmakla ileride çocuk sahibi olabileceklerdir (50). İnfertil bir çifti takip ederken ve tedavi sonuçlarını değerlendirirken, aylık % 1-3 gebelik şansını (nonazoospermik çiftlerde) akılda tutmak gerekir. Geçmişte, çiftler gebe kalmayı istedikleri andan itibaren 12 aylık süreç tamamlanıncaya kadar tetkik ediliyor iseler de, günümüzde çiftin yaşı ilerledikçe temel incelemenin ertelenmemesi yönünde bir eğilim söz konusudur. Yüksek maliyetli olan üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) teknolojisindeki ilerlemeler ve elde edilen başarılı sonuçlar sayesinde infertilite açısından erkeğin değerlendirilmesi sıklıkla göz ardı edilir duruma gelmiştir. Bu yaklaşım varikosel, vazal obstrüksiyon ve enfeksiyon gibi erkek infertilitesine yol açan nedenlerin kolaylıkla ve etkin olarak tedavi edilebileceği gerçeğini de göz ardı etmektedir. Ayrıca, tam bir inceleme yapılmazsa testis kanseri, hipofiz tümörleri ve nörolojik bozukluklar gibi bazı önemli hastalıklar da gözden kaçırılabilir (51). Erkek infertilitesinin genetik nedenleri daha iyi anlaşıldıkça, ÜYT'ye başlanılmadan önce erkeğin yeterli değerlendirilmesi ve danışmanlık verilmesinin de büyük öneme sahip olduğu ortaya çıkmaktadır.

İnfertil erkeğin değerlendirilmesindeki hedefler; (1) düzeltilebilir durumların; (2) başka yöntemlerle düzeltilemeyen, ancak erkeğin spermini kullanarak yapılan ÜYT ile tedavi edilebilecek nedenlerin; (3) bu tekniklerle de tedavi edilemeyen ve donör inseminasyonu ya da evlat edinmeyi gerektirecek nedenlerin; (4) altta yatan önemli tıbbi patolojilerin ve (5) hastayı ya da çocuğunu etkileyebilecek genetik ve/veya kromozomal bozuklukların belirlenmesine yöneliktir. İnfertil erkeği değerlendirirken özellikle fertilitéyi etkileyebilecek konulara dikkat edilerek detaylı bir hikaye alınmalıdır. Daha sonra fizik muayene yapılır. Başlangıç laboratuvar testlerinin yapılmasıyla da temel değerlendirme tamamlanmış olur. Hikaye, fizik muayene ve başlangıç laboratuvar testlerinin sonuçlarına bakılarak, daha spesifik testlere yönlendirecek bir ayırıcı tanıya gidilmelidir. Erkek infertilitesinin farklı yönlerini değerlendiren çok sayıda test bulunmakla birlikte, bütün hastalarda hepsini kullanmak gerekmez.

2.2.2. Erkek İnfertilitesinde Öykü

İnfertilite yakınması olan çiftlerde erkeğin değerlendirilmesi, fertilité ile ilgili olabilecek bütün yönleri araştıran detaylı bir medikal ve reproduktif hikayeyi içermelidir. İnfertilite süresi, geçmişte kullanılan doğum kontrol yöntemleri, çiftin cinsel ilişki sıklığı, koit zamanlamaları, erkeğin gelişme öyküsü (kriptorşidizim, puberteye girilen yaş, jinekomasti, üriner sistem ya da merkezi sinir sistemi konjenital anomalileri), geçirilmiş ameliyatlar (orkidopeksi, pelvik-skrotal-inguinal-retroperitoneal ameliyatlar, fitik onarımı, vazektomi, skrotal travma, testis torsiyonu), sistemik hastalıklar (üriner enfeksiyonlar, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, viral orşitler, epididimit, tüberküloz), kullanılan ilaçlar, aile öyküsü ve alışkanlıklar (sıcak banyolar, sauna, sigara, alkol, uyuşturucu ilaçlar, anabolik steroidler) gibi durumlar sorgulanmalıdır. Ovulasyonun menstrasyon siklusunun ortasına rastlayan günler içerisinde meydana geldiğini eşlerin bildiğinden emin olmak gerekir. Bununla birlikte kadında fertilizasyonun da sadece bu zaman süresi içerisinde mümkün olabileceğini hatırlatmakta yarar vardır. Menstrüel siklusun diğer günlerinde bulunulacak cinsel ilişkiler gebelikle sonuçlanmayacaktır. Bununla birlikte, sperm servikal mukus ve kripleri içerisinde 48 saat ya da daha uzun süre canlı kalabilmektedir. Yapılan çalışmalarda ovulasyondan önce 5 güne kadar bulunan cinsel ilişkilerde gebeliğin görülebileceği, fakat oositin ömrü kısa olduğu için ovulasyondan sonraki günlerde cinsel ilişkilerin gebelikle sonuçlanmayacağı gösterilmiştir (52).

2.2.3. Fizik Muayene

Fizik muayene, infertilite ile beraber bulunabilecek patolojileri ayırt etmeye yönelik yapılmalıdır. İlk olarak kilo ve boy ölçülerek vücut kitle indeksi hesaplanmalıdır. Obezite ve metabolik sendrom, cinsel işlev bozukluğu ve endokrin sorunlar yaratarak infertiliteye neden olabilir. Hastanın yapısı ve virilizasyon tipi kaydedilmelidir. Sekonder seks karakterlerindeki anormallikler Klinefelter Sendromu'ndaki önükoid görünümde olduğu gibi, bir konjenital endokrin bozukluğun varlığını da ortaya koyabilir. Temporal saç dökülmesinin olmaması, vücut kıllarında azalma, jinekomasti varlığı, yüzde ince kırışıklıkların bulunmaması androjen eksikliğine işaret edebilir. Jinekomasti gerek östrojen/androjen dengesizliği, gerekse prolaktin yükselmesi için bir göstergedir. Situs inversus bulunması immotil silia sendromunu, dolayısıyla immotil spermin eşlik ettiği Kartagener Sendromu olasılığını akla getirmelidir. Genital muayene dikkatli bir şekilde

yapılmalıdır. Penis bölgesi hipospadiyas ve ciddi penis eğriliği bakımından muayene edilmelidir. Kimi zaman proksimal hipospadiyas ile birlikte muayene edilebilen kriptorşidizm ve ambiguus genitalya bulunması karyotip anomalisinin işaretçisi olabilmektedir (53). Skrotal organların muayenesi ise kremasterik kasın gevşemesi için sıcak bir odada ve hasta hem ayaktayken hemde yatarken yapılmalıdır. Kıvamını ve intratestiküler bir kitlenin varlığını ortaya koymak için testisler dikkatle palpe edilmelidir. Çünkü yapılan çalışmalarda infertilitenin testiküler karsinom için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (54).

Fizik muayenede testis boyutları ölçülmelidir. Erişkin testis boyutu minimum 4x3 cm veya hacmi yaklaşık 20 ml olmalıdır. Testis hacmi Prader orşidometreleri veya ultrasonografi ile ölçülebilir. Testis hacminin % 85'ini seminifer tübüller ve germinal elemanlar oluşturduğu için, bu hücrelerin sayısındaki azalma tipik olarak testis hacminde azalma ya da testis atrofisi şeklinde kendini gösterecektir (55). Epididim dikkatle muayene edilerek baş, gövde ve kuyruğunun varlığı saptanmalıdır. Epididimde sertleşme ya da kistik dilatasyonların bulunması epididimal obstrüksiyon olasılığını akla getirmelidir. Spermatosel ve epididimal kistlere sık rastlanmakla birlikte bu lezyonlar obstrüksiyonun varlığına işaret etmezler. Vaz deferensler palpe edilerek varlıkları kontrol edilmelidir. Zira vaz deferenslerin kısmi veya tam yokluğunun obstrüktif tip azospermiye yol açması aşîkardır. İlâveten spermatik kordon muayene edilerek varikösel varlığı da araştırılmalıdır.

2.2.4.Temel Laboratuar Analizleri

İdrar Analizi

Üriner sistem enfeksiyonlarının en kolay tanı aracı idrar analizidir. Ayrıca retrograd ejakülasyon ve bazı böbrek hastalıklarının varlığı da idrar analizi ile anlaşılabilir (56).

Hormon Analizi

İnfertil bir erkek hastanın hormonal değerlendirmesinde erkekteki üremeyi olumsuz yönde etkileyebilecek endokrinolojik bozuklukların ortaya çıkarılması ve prognoz hakkında bilgi sahibi olabilmek amaçlanmalıdır. Her ne kadar erkekte reproduktif fonksiyonlar hassas bir şekilde endokrinolojik kontrol altındaysa da, infertil erkeklerin ancak % 3'ünden azında primer bir hormonal bozukluk bulunur (57). İnfertil erkeğin rutin

araştırılmasında en sık rastlanılan hormonal patoloji serum FSH yüksekliğidir. Normal spermatogenez varlığında FSH sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından üretilen İnhibin hormonunun negatif feed-back etkisi ile kontrol edilir. Spermatogenezin bozulduğu hastalarda her zaman olmasa da çoğunlukla FSH hormonu yüksek bulunmuştur (58).

İnfertil erkekte başlangıçta yapılacak endokrinolojik değerlendirmenin içeriği konusunda fikir birliği yoktur. Hikaye ya da fizik muayene sonrası endikasyon görülen ya da sperm konsantrasyonu 10 milyon/ml'nin altında olan bütün erkeklerde serum FSH ve testosteron düzeylerinin ölçülmesi önerilmektedir. Çünkü sperm yoğunluğu 10 milyon/ml'nin üzerinde olanlarda endokrinolojik bozukluk nadiren görülür (57). Eğer bu başlangıç testleri bozuk çıkarsa, testosteronun tekrarı ile prolaktin ve LH ölçümleri gerekir. Eğer sadece testosteron seviyesi düşük ya da sınırdaki ise ve LH yüksek değilse, sabah testosteronu ve serbest testosteron ölçümleri önerilmektedir. Çünkü testosteronun sabah seviyesi daha yüksektir ve çelişkili olgularda ise serbest testosteron düzeyi yönlendirici olur. Eğer testosteron düşük seyrediyorsa serum prolaktin düzeyine bakılmalı ve gerekirse hipofiz görüntülemesi yapılmalıdır (59). Konjenital adrenal hiperplaziye bağlı erkek infertilitesi çok nadirdir. Bu hastalarda infertilitenin nedeni adrenalenden aşırı androjen üretimine bağlı olarak gonadatropin sekresyonunun negatif feed-back ile inhibisyonu ve neticede testis fonksiyonlarının baskılanmasıdır. Serum hormon analizlerine göre olası sorunlar testiküler yetmezlik (hipergonadotropik hipogonadizm), hipogonadotropik hipogonadizm, hiperprolaktinemi ya da androjen rezistansı varlığı olarak gruplandırılabilir (60).

Semen Analizi

Erkek infertilitesinin laboratuvar incelemelerinin en önemlisi, rutin olarak yapılan semen analizidir. Semen incelemelerinin standardizasyonuna duyulan ihtiyaç nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü ilk kez 1980'den başlayarak 1987, 1992 ve 2002'de insan semeni incelenmesi için laboratuvar el kitabını yayımlamıştır. Ancak androloji biliminin hızlı gelişimi ve semen analizlerinde standardizasyona verilen önem arttıkça güncel bir değerlendirme yapılarak 2010 yılı itibarıyla beşinci baskı çıkartılmıştır (61). Öncelikle semen analizinin sonuçlarını etkileyebilecek bazı faktörlere göz atmak yararlı olacaktır:

- Ejakülataın toplanması: Ejakülataın tamamının örnekleme kabına alınması önemlidir.

- Aksesuar bezlerin aktivitesi: Aksesuar bezlerin salgıları semeni dilue ettiklerinden dolayı sperm konsantrasyonu etkilenebilmektedir.
- Cinsel perhiz süresi: Sperm hücreleri epididimde birikirler, üretra içine taşınırlar ve atılırlar. Epididimal fonksiyonlar bozulmadığı sürece sperm canlılığı ve kromatin ağı cinsel perhiz süresinden etkilenmez (62).
- Önceki ejakülasyonda epididimler tam olarak boşalmadıysa semen analizi sonuçları etkilenebilir ancak bu etkileşimin yaratacağı anormallikleri tespit etmek zordur.
- Testis boyutları spermatogenetik aktiviteyi yansıtabilir ve morfolojiyi de etkileyebilir.

Aslında büyük çoğunluğu değiştirilemez olan faktörlerin varlığı semen kompozisyonundaki birey içi farklılıkların da açıklamasıdır. Bu nedenle sadece bir semen analizi kişinin semen kalitesini değerlendirmek için yeterli değildir. Temel verileri elde edebilmek için iki veya üç örneğin incelenmesi yararlı olacaktır. Semen analizi kişilerin klinik durumları ile ilgili temel bilgileri edinmemizi sağlar.

Semen analizi şu aşamalardan oluşur:

Örneğin Toplanması

Semenin sıcaklık farklılığına maruz kalmaması için örnek laboratuvar yakınında özel bir odada alınmalıdır. Örnek en az 2 günlük cinsel perhiz sonrasında alınmalıdır ancak cinsel perhiz süresi 7 günü geçmemelidir. Ek analizler gerektiğinde sonuçların değişkenliğini azaltmak için cinsel perhiz süreleri olabildiğince birbirine yakın olmalıdır.

İlk Makroskopik İnceleme

Likefaksiyondan hemen sonra ya da ejakülasyondan sonraki 30 dakika ile 1 saat içinde semenin gözlenmesi ile analize başlanmalıdır. Likefaksiyon genellikle ilk 15 dakika içinde görülmesine karşın normal semenin likefaksiyonu oda sıcaklığında 60 dakikada tamamlanır. Tam likefaksiyon 60 dakikada oluşmazsa bildirilmelidir. Likefaksiyondan sonra geniş ağızlı (yaklaşık 1.5 mm) plastik pipete örneği dikkatlice çekerek ve yerçekiminin etkisiyle damlamasını bekleyip damla ile pipet arasında oluşan ince ipliğin uzunluğu gözlenerek viskozitesi ölçülebilir. Normal bir örnek, pipeti küçük ayrı damlalar şeklinde terk eder. Anormal viskozitelerde damlama olmaz, ejakülat uzar ve bu uzunluk 2

cm'den daha fazladır. Viskozitenin yüksek olması sperm motilitesini, sperm konsantrasyonunu, spermin antikorla kaplanmasını ve biyokimyasal ölçümleri etkileyebilir.

Ejakülatın hacminin oluşumuna ağırlıklı olarak seminal vezikül, prostat salgıları, az bir oranda bulboüretal bezler ve epididim katkıda bulunur. Total sperm hücresi ve sperm olmayan hücrelerin sayısının hesaplanmasında kullanılacağı için hacmin hassas bir şekilde ölçülmesi gerekir. Semen hacmi için en düşük referans değeri 1.5 ml'dir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Semen analizi için en düşük referans değerler (5. persentil ve % 95 güvenlik aralıkları)

PR = Progresif, NP = Non-Progresif, MAR = Mix Antiglobulin Reaksiyon.

Parametreler	En düşük referans değer
Semen Volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total Sperm Sayısı (10^6)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 / ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (10^6 /ml)	<1.0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (μ mol/ejakülat)	≥ 2.4
Seminal fruktoz (μ mol/ejakülat)	≥ 13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	≥ 20

Yüksek semen hacimleri aksesuar bezlerin aktif inflamasyonunda gözlenen eksudasyonun bir yansıması olabilirken, düşük semen hacimleri ejakülatuvar kanal obstrüksiyonu, örnek toplama problemi, parsiyel retrograd ejakülasyonu ve androjen eksikliğini akla getirmelidir.

Semen pH'sı esas olarak alkali özellikteki seminal vezikül sekresyonu ile asidik prostatik sekresyon olmak üzere aksesuar bezlerin sekresyonları arasındaki dengeyi yansıtır. Semen pH'sı likefaksiyondan sonra laboratuvar için belirlenmiş standart bir zamanda, tercihen 30 dk içinde ölçülmelidir. Semen pH'sı için alt referans değeri 7.2 olarak kabul edilmiştir. Düşük hacimli ve sperm sayısı az olan bir örnekte eğer pH 7.0'dan küçükse ejakülatuvar kanal obstrüksiyonu veya seminal vezikül gelişiminin yetersiz olduğu konjenital bilateral vaz deferens agenezisi akla gelmelidir (63).

İlk Mikroskopik İnceleme

Taze semen değerlendirmesi için faz-kontrast mikroskopisi önerilmektedir. İlk mikroskopik değerlendirme sırasında konsantrasyon, motilite, mukus iplikleri formasyonu, sperm agregasyon ve aglütinasyonu ve farklı hücresel elemanların değerlendirmesi yapılabilir.

Sperm Motilitesi

Ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde, tercihen likefaksiyondan sonraki 30 dakikada motilite değerlendirilmelidir. Motilite değerlendirmesi faz kontrast mikroskopta 200-400 büyütmede yapılır. Farklı motilite kategorilerindeki spermelerin oranlarını hesaplayabilmek için en az beş mikroskopik alanda en az 200 sperm hücresinin değerlendirilmesi gerekir. Motilitenin değerlendirmesi için spermleri progresif hareketli, non-progresif hareketli ve hareketsiz şeklinde sınıflandıran basit bir yöntem tavsiye edilir.

Progressif hareket: Sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket eder.

Non-progresif hareket: İlerleyici olmayan hareketlerin tamamını içerir. Örneğin çok küçük daireler şeklinde, kuyruğun hareketiyle baş kısmının çok zor olarak yer değiştirmesi, sadece kuyruğun hareket etmesi gibi.

Hareketsiz: Hiç hareketin olmamasıdır.

Total hareketlilik için en düşük referans değer % 40 iken bu değer progresif hareketlilik için % 32'dir.

Sperm Canlılığı

Sperm canlılığı hücre membran bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranının % 40'dan az olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Normalde canlı hücrelerin sayısı motil hücrelerden fazladır. Hareketsiz spermilerin canlı olup olmadıkları klinik açıdan önemlidir. Canlı ama hareketsiz hücrelerin büyük oranda bulunması kuyruktaki yapısal defektlerin göstergesi olabilir (64). Bu gibi olgularda elektron mikroskopik değerlendirme yapılmasında büyük yarar olacaktır. Hem hareketsiz hem de ölü hücrelerin (nekrozoospermi) yüksek oranda bulunması ise epididimal bir patolojinin göstergesi olabilir (65). Sperm canlılığı için en düşük referans değer % 58'dir.

Sperm Sayımı

“Total sperm sayısı” ve “sperm konsantrasyonu” terimleri aynı değildir. Sperm konsantrasyonu mililitredeki sperm sayısını ifade ederken total sperm sayısı tüm ejakülattaki sperm sayısını ifade eder. Total sperm sayısı semen analizi sırasında hesaplanan sperm konsantrasyonundan elde edilir. Ejakülattaki total sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu dölleme yeteneği, gebelik oluşumuna kadar geçen süre ve gebelik oranları ile ilişkilidir (66). Normal bir erkekte obstrüksiyon yoksa ve cinsel perhiz süresi çok uzun değilse total sperm sayısı testis hacmi ile koreledir ve bu da testislerin sperm üretme yeteneğini ve yolun sağlamlığını gösterir (67). Seminal vezikül ve prostat salgılarının miktarından etkilenebilen sperm konsantrasyonu ise fertilizasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir ancak testis fonksiyonunu değerlendirmek için özgül değildir (68). Sperm konsantrasyonu için en düşük referans değer $15 \times 10^6/\text{ml}$ 'dir. Total sperm sayısı ise sperm konsantrasyonunun tüm ejakülat hacmiyle çarpılması sonucu hesaplanır ve en düşük referans değeri 39×10^6 'dır.

Sperm Morfolojisi

Normal formda görünen sperm hücrelerinin oranı ile fertilite sonuçları (gebelik oranları veya gebeliğe kadar geçen süre) arasında bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır (66). Normal formlu sperm hücreleri için en düşük referans değer % 4'tür.

Diğer Tanı Yöntemleri

Lökosit Boyaması

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), semende mililitrede 1×10^6 lökosit görülmesini piyospermi olarak kabul etmektedir. İnfertil erkeklerin % 20'sinde piyospermi vardır. Semende lökosit bulunması reaktif oksijen türlerini arttırarak spermatozoa işlevini bozar. Ayrıca enfeksiyon, sperm ileti yollarında anatomik tıkanıklık oluşturabilir.

Islak yayma mikroskobisinde immatür germ hücreleri ve lökositler benzer görülürler ve hep birlikte yuvarlak hücreler olarak adlandırılırlar. Bir milyon/ml'nin üzerinde lökosit bulunması anormal kabul edilir ve genital sistem enfeksiyonu ya da inflamasyon olasılığını akla getirir. Halen fertil ve infertil popülasyondaki lökosit konsantrasyonları önemli ölçüde birbiriyle çakışmaktadır. Hem enfeksiyon hem de infertilite piyospermi ile birlikte bulunabilir. Her ne kadar infertil çiftlerde fertil popülasyona göre daha büyük konsantrasyonda lökosit görülme eğilimi varsa da, semenlerinde lökosit sayısı artmış hastalarla yapılan çalışmaların hepsi fertilité oranlarında azalma bildirmezler (69). Yuvarlak hücrelerin morfolojik ayırıcı tanısı Peroksidaz boyaması gibi klasik boyama teknikleri kullanılarak yapılabildiği gibi lökosit yüzey antijenlerine karşı oluşmuş monoklonal antikorların immünohistokimyasal tekniklerle görüntülenmesiyle de yapılabilmektedir. Yuvarlak hücre sayısının her büyük büyütme alanında 10-15'in üzerinde ya da 1 milyon/ml'den fazla bulunduğu hastalarda, bir yöntemle semende lökosit boyaması yapılması önerilmektedir. Eğer hücrelerin büyük kısmı lökosit ise konsantrasyonları da 1 milyon/ml'nin üzerinde ise hasta genital sistem enfeksiyonu açısından incelenmelidir.

Semen Kültürleri

Genital sistem enfeksiyonları erkek infertilitesinin nadir nedenlerindendir. Mikoplazma'nın yanı sıra, aerobik ve anaerobik çoğu organizmanın semen kültürlerine bakılmıştır. Sistit, üretrit ya da prostatit gibi kültür-pozitif genitoüriner enfeksiyon varlığında uygun tedaviye başlanmalıdır. Ancak, klinik semptomların ya da dökümanite edilmiş piyosperminin bulunmadığı durumlarda genital sistemin rutin olarak bakteriyel kültür çalışmalarının yapılması gerekmez. Genel olarak inflamasyon ya da enfeksiyona ait klinik kanıt bulunan hastaların Mikoplazma ve Klamidya için test edilmeleri önerilmektedir. Bakteriler için semen kültürü yapılabiliyse de, bu kültürlerde distal üretral

kontaminasyona bağlı olarak sıklıkla düşük konsantrasyonda multipl organizmalar ortaya çıkar. Derinin anti-bakteriyel temizliği ve ejakölasyondan önce miksiyon yapılması yanlış-pozitif kùltür sıklığını azaltır ama tamamen ortadan kaldırmaz (70).

2.2.5.Radyolojik Değerlendirme

İnfertil erkekte genital sistemin radyolojik olarak araştırılmasındaki asıl amaç, komplet ya da parsiyel duktal obstrüksiyon bulgularını saptamaktır. Duktal boşaltım sisteminde komplet obstrüksiyonu bulunan bir hastada tipik olarak azoospermi vardır, oysa parsiyel obstrüksiyonlu hastalarda seminal bulgular oligospermi, astenospermi ve/veya ejakölasyondan sonra spermin erken ölmesi gibi değişiklikler gösterebilir. Parsiyel obstrüksiyonu, idiyopatik infertilite de dahil erkek infertilitesinin diğer nedenlerinden ayırt etmek oldukça güçtür. Hatta günümüzde kullanılan radyolojik görüntüleme çalışmaları parsiyel obstrüksiyon için kesin tanı koyduramaz. Bu nedenle, parsiyel duktal obstrüksiyon bulunduğu düşünölen hastaların tanı ve tedavileri araştırma amaçlı kabul edilir.

Transrektal Ultrasonografi

Transrektal Ultrasonografi prostat, seminal veziküller ve vaz deferensin ampulla kısmının anatomik olarak görüntölenmesini sağlar. Ejakölator kanal obstrüksiyonundan şüphelenilen azoospermik hastalarda transrektal ultrasonografi gerekir. Komplet ejakölator kanal obstrüksiyonlu hastaların tipik seminal bulguları, düşük ejakölut miktarı (<1 ml), asit pH, fruktoz yokluğu ve seminal veziköl sekresyonlarının olmaması nedeni ile koagülasyonun gelişmemesini içerir. Bu çeşitli seminal bulguların ayırıcı tanısında ejakölator kanal obstrüksiyonu ve seminal veziköl agenezisi ya da hipoplazisi ile birlikte olan vazal agenezi düşünölür. Seminal vezikölde dilatasyon bulunması ejakölator kanallarda obstrüksiyona işaret eder. Mesanenin arkasından, transvers planda seminal veziköllelerin normal çapı 1.5 cm'dir. Seminal veziköllelerin hipoplazisi ya da yokluğu kolayca tanınabilir, ama komplet ejakölator kanal obstrüksiyonu bulunan hastaların bazılarında seminal veziköllelerde dilatasyon yoktur. Çelişkili ultrasonografik bulguları olan hastalarda ejakölator kanal obstrüksiyonu tanısı koymak için ya vazografi ya da seminal veziköl aspirasyonu gerekli olabilir. Prostat içerisindeki hipoekoik lezyonların ve intraprostatik kistlerin ejakölator kanal obstrüksiyonu ile birlikteliği bulunabilir. Oysa

prostatın hipoeoik lezyonları fertil gönüllülerde de sıklıkla görülmektedir ve intraprostatik kistler tesadüfi bir bulgu da olabilir (71, 72).

Skrotal Ultrasonografi

Erkek infertilitesinde skrotal ultrasonografinin esas kullanım alanı varikosel tanısı için olmuştur. Varikosel tanısı normalde fizik muayene ile konulur, ama bazı hastaların muayenesi zor olabilir ya da muayenede çelişkili sonuçlar bulunabilir. Varikoselde objektif bir tanı koymak için, internal spermatik ven venografisine alternatif olarak renkli dupleks skrotal ultrasonografi kullanılmaktadır. Varikoselde diğer noninvazif testler Doppler stetoskopi, termografi ve radyonüklid çalışmalarıdır. Varikosel tanısı koymak için ilk geliştirilmiş kriterler çok sayıda genişlemiş (>3 mm) venlerin varlığı ve valsalva manevrası sırasında venöz reflü bulunmasıdır. Ancak daha sonraki çalışmalar varikosel tanısı koymada renkli dupleks ultrasonografinin doğruluk oranının gerek fizik muayene gerekse venografi ile karşılaştırıldığında sadece % 60 olduğunu göstermiştir (73). Hatta subklinik varikosellerin onarımının erkekte fertilité üzerine pozitif etkisinin bulunduğu dair çok az kanıt mevcuttur. Bu nedenle subfertil erkeklerde varikoselin teşhisinde skrotal ultrasonografinin sınırlı değeri vardır.

Fizik muayenenin normal ve yeterli olduğu erkeklerde varikosel araştırmasında görüntüleme yöntemleri kullanılmamalıdır. Renkli dupleks skrotal ultrasonografi fizik muayenenin obezite ya da skrotal hassasiyet nedeniyle yetersiz kaldığı hastalar için saklanmalıdır. Böyle olgularda klinik varikosel tanısı koymada venöz çapın 3.5 mm ya da üzerinde bulunması kriter olarak kullanılmalıdır (74). Subfertil erkeklerde skrotal ultrasonografinin bir diğer uygulanım alanı da testis tümörlerinin varlığını ekarte etmek içindir. Subfertilité bazen testiküler germ hücreli tümörü belirten bir semptom olabilir ve bu problemde en iyi radyolojik görüntüleme yöntemi ise skrotal ultrasonografidir. Testis tümörünü saptamak amacıyla skrotal ultrasonografi kullanımı hikayesi, fizik muayenesi ve hormon değerleri şüphelendiren hastalarla sınırlandırılmalıdır.

Abdominal Ultrasonografi

Vaz deferensi bulunmayan hastalarda böbrekleri değerlendirmek için abdominal ultrasonografi kullanılır. Vaz deferens ve üreterler embriyolojik olarak mezonefrik kanaldan gelişirler. Bu nedenle, konjenital vaz deferens agenezi olan hastalar böbrek

agenezi bakımından da risk altındadırlar. Tek taraflı vaz deferensi gelişmemiş erkeklerin % 80 kadarında, aynı tarafta en sık agenezi olmak üzere böbrek anomalileri de bulunur (75).

Vazografi

Vazal ve ejakülatör kanal açıklığının değerlendirilmesinde klasik ve en yaygın kullanılan radyolojik görüntüleme çalışması vazografidir. Vazografi, testis biyopsisinde aktif spermatogenezin varlığı gösterilmiş azoospermik hastalarda obstrüksiyonun yerini saptamak için gerekir. Testis biyopsisinden farklı zamanlarda yapılan vazografi, daha sonraki düzeltici operasyonları zorlaştırabilecek kalıcı vazal hasar yapma riski taşımaktadır. Bu nedenle vazografinin rekonstrüktif cerrahi ile aynı zamanda yapılması önerilmektedir (72). Vazografi en sık skrotal vaz deferens hizasından iğne ile girilerek ya da transvers vazotomi ile yapılır. Vaz deferens, seminal veziküller, ejakülatör kanal ve mesane boynunda kontrast madde görüntülediği zaman normal bir vazogram elde edilmiş olunur. İntravazal sıvıda mikroskobik olarak sperm görülmesi ile proksimalde epididimlerin açıklığı anlaşılır.

2.2.6. Testis Biyopsisi

Testis biyopsileri tanı ve tedavi amaçlı olarak yapılmaktadır. Tanısal testis biyopsisi sadece azoospermik hastalara yapılır. Çoğu hekim bilateral testis biyopsisi yaparken, bazı hekimler ise testis hacimleri farklı olan olgularda sadece daha büyük hacimli testisten biyopsi alma eğilimindedirler. Tanısal testis biyopsisi alınmasının amacı obstrüktif ve nonobstrüktif azoospermi ayrımının yapılabilmesi içindir. Gerek konjenital vaz deferens yokluğu gibi obstrüksiyon, gerekse testiküler yetmezlik için patognomonik klinik bulguları olan hastalarda azoosperminin nedenini araştırmaya yönelik testis biyopsisi gerekmez. Testiküler yetmezliğin patognomonik klinik bulguları bilateral küçük testisler ve serum FSH seviyesinde belirgin yükselmedir. Böylece tanısal testis biyopsisi sadece kısmen normal serum FSH değeri ile testis hacmine dayanılarak, duktal obstrüksiyondan şüphelenilen hastalarda gereklidir (76). Testis biyopsisi ayrıca sperm elde edilmesi ve *in vitro* fertilizasyon (IVF) adayı olarak kabul edilen nonobstrüktif azoospermisi bulunan hastaların tedavisinde önemli bir role sahiptir. Bu anlamda testis biyopsisi hem prognostik bilgi edinmek hem de spermin dondurularak saklanması (kriyoprezervasyon) için sperm toplamak amacıyla yapılır. Nonobstrüktif azoospermili çoğu hastada testislerden elde

edilebilecek ve *in vitro* olarak oositin fertilizasyonunda kullanılabilecek sınırlı sayıda spermatozoa bulunur. Bu nedenle, tanısal testis biyopsisi yapılan hastalarda daha sonra IVF için kullanılmak üzere kriyoprezervasyon olasılığı düşünülebilir. Sonuçları tedaviyi değiştirmeyeceği için oligospermili hastalarda testis biyopsisi gerekmez. Şiddetli oligospermisi olan, testis boyutları ve serum FSH değerleri normal hastalarda parsiyel duktal obstrüksiyonu ekarte etmek için nadiren biyopsi yapılır. Böyle olgularda biyopsi örneğinde normal spermatogenezin gösterilmesi parsiyel duktal obstrüksiyona işaret eder (77).

Testis biyopsilerinin yorumlanması subjektif olup klasifikasyon sistemlerinin farklılığından dolayı sıkıntı yaşanabilmektedir. Kantitatif olarak spermatogenez değerlendirilen objektif metodlar tekrarlanabilir ama klinik takipte nadiren faydalandığı için esasen araştırma çalışmalarında kullanılırlar. Testis biyopsilerinde en yaygın olarak normal spermatogenez, hipospermatogenez, matürasyon duraklaması, Sertoli cell only sendromu (SCOS), testiküler atrofi ve fibrozisi derecelendiren Johnsen Klasifikasyon sistemi kullanılmaktadır. Bu incelemede seminifer tübüllerin sayı ve boyutları, seminifer tübüllerin bazal membran kalınlığı, germ hücrelerinin tipi ve orantılı sayıları, interstisyumda fibrozis ve Leydig hücrelerinin varlığı ile durumları değerlendirilmelidir. Bu sınıflandırmaya göre her bir seminifer tübüldeki germinal epitelyum düzeni, görülebilen spermatozoa, spermatit ya da spermatogonyum hücreleri ya da Sertoli hücresi görülmesi kriterlerine göre tübüllere 1-10 arası skor verilmekte ve normal testis tanısı için tüm testiste tübüllerin en az % 60'ında 10 skorunun bulunması gerekmektedir (78). Çok sık olarak tek bir biyopsi örneğinde birden fazla histopatolojik tip saptanmakta olup bu da klasifikasyon sistemlerindeki tutarsızlığa yol açmaktadır. Bununla birlikte en sık olarak karşımıza çıkan histopatolojik tipler normal spermatogenez, hipospermatogenez, matürasyon arresti ve SCOS'dır.

Testis Biyopsi Sınıflaması

Normal Testis: Normalde testis hacmi, içerisinde Leydig hücrelerinin de bulunduğu ince bir tabaka, gevşek interstisyum ile birbirlerinden ayrılmış seminifer tübüller, kan damarları, lenfatikler ve konnektif doku tarafından oluşturulur. Spermatogenezin tüm evrelerindeki germ hücrelerinin seminifer tübüller içerisinde görülmesi gerekir. Oysa tübüllerin hepsi de spermatogenezin bütün evrelerini içermez. Tübül boyunca bir dalga tarzında spermatogenez evrelerini gösteren diğer çoğu memeli testislerinden farklı olarak,

insanda parçalı örnek söz konusudur. Normal testis biyopsisi örneklerine duktal obstrüksiyon bulunan azoospermik hastalarda rastlanılır. Oysa distaldeki obstrüksiyonun gerisinde tübüllerin lümeni aşırı yığılma gösterir ve organizasyonları sıklıkla bozulmuştur (79). Ayrıca uzun süreli obstrüksiyonlarda seminifer tübüller dilate olurlar ve duvarları kalınlaşır.

Hipospermatogenez: Hipospermatogenez olgularında seminifer tübüller içerisindeki bütün germ hücre serilerinde hücre sayıları azalmıştır. Buna karşın spermatogenezin her evresi histolojik inceleme sırasında izlenebilmektedir. Hipospermatogenezli hastalarda sıklıkla oligospermi vardır ama şiddetli olgularda azoospermi de görülebilir. Çünkü ejakülatta spermin çıkabilmesi için, sperm üretiminin belli bir seviyede olması gerekir (80).

Matürasyon Duraklaması: Matürasyon duraklaması olarak raporlanan spesmenlerin histopatolojik muayenelerinde belirli bir evreye kadar normal spermatogenezin sürdüğü ama bundan sonra germ hücrelerinin daha ileri matürasyon göstermedikleri izlenir. Duraklama primer spermatosit, sekonder spermatosit ya da spermatid evresinde görülebilir. Bir hastada blok hep aynı evrede olur. Testiküler sürüntü preparatı (touch preparation) değerlendirilmezse geç matürasyon duraklaması olgularının normal spermatogenezden ayırt edilmesi sıklıkla güçtür (81). Bu işlem ile spermatogenez normal olan hastalarda matür spermatozoa görülürken, komplet geç matürasyon duraklamalarında görülmez. Hangi evrede olursa olsun komplet matürasyon duraklamalı hastalarda azoospermi bulunurken, parsiyel matürasyon duraklamalı hastalarda değişik derecelerde oligospermi vardır. Aynı testiste matürasyon duraklaması ve hipospermatogenezin birlikte görülmesi sık rastlanılan bir durumdur.

Germinal Aplazi: Germinal aplazi aynı zamanda SCOS olarak da bilinir. Testis histolojilerinde Seminifer tübüllerin sadece Sertoli hücreleri içerdiği, tüm germ hücrelerinin ise komplet bulunmadığı görülür. Seminifer tübül çapı azalmıştır ve interstisyum genellikle minimal derecede değişmiştir. Sertoli cell only sendromlu hastalarda FSH seviyesinin normal ya da yükselmiş olması ile birlikte, testis boyutları da küçükten normale kadar değişir (58). Bu durumun etkili bir tedavisi yoktur. Yine de, tanısal biyopsilerinde SCOS saptanan hastaların birçoğunda testislerin başka kısımlarında düşük seviyede spermatogenez bulunabilmektedir. Ayrıca, germinal aplazinin testislerin sklerotik olduğu ve bazı tübüllerde sadece Sertoli hücrelerinin bulunduğu testiküler atrofi ve fibrozisten ayırt edilmeleri de gerekir.

Testiküler Atrofi ve Fibrozis: İncelmiş bazal membran, tübüler ve peritübüler skleroz ve hem germ hücrelerin hem de Sertoli hücrelerinin yokluğu testiküler atrofi ve fibrozisin karakteristik özelliğidir. Klinik olarak bu testisler bilateral düşük hacimli (2-3 ml) ve yumuşak kıvamlıdır. Klinefelter Sendromu için karakteristik olmasına rağmen, bazı hastalarda testis biyopsi ile tanımlanmış küçük odaklar halinde spermatogenez görülebilmektedir (82).

İnfertil erkeklerde en yaygın bozukluk hipospermatogenez ve matürasyon duraklamasıdır. Ayrıca bir biyopsi örneğinde birden fazla histopatolojik tip de bulunabilir. Dolayısıyla olguların çoğunda testis biyopsisi hastanın infertilitesinden sorumlu spesifik bir etiyolojik faktörü tanımlayıcı sonuç vermez.

2.2.7. Erkek İnfertilitesinde Tanı ve Tedavi Kategorileri

Hastaların fizik muayenesinin yapılarak laboratuvar sonuçlarının değerlendirilmesinin ardından, seminal parametreler üzerine gruplandırıldığında Tablo 2.2’de gösterildiği gibi en sık karşılaşılan sonuç % 55 ile normal olan gruptur (83). Öte yandan infertil hastaların etiyolojik sınıflaması yapıldığında en sık karşılaşılan grup ise Tablo 2.3’de değinildiği gibi varikozel hastalarıdır (84).

Tablo 2.2. İnfertilite ile başvuran hastaların semen analizi bulgularına göre dağılımları

TİP	İNSİDANS (%)
Anormal Semen Parametresi	37
Hareket Bozukluğu	26
Astenospermi	24
Oligospermi	8
Aglütinasyon	2
Hacim	2
Morfoloji	1
Azoospermi	8
Tüm Parametreler normal	55

Tablo 2.3. Erkek infertilitesinin etiyolojik faktörlere göre dağılımı

	ORAN (%)
Varikosel	42.2
İdiopatik	22.7
Obstrüksiyon	14.3
Normal / kadın faktörü	7.9
Kriptorşidizm	3.4
İmmunolojik	2.6
Ejakülasyon Bozukluğu	1.3
Testiküler Yetmezlik	1.3
İlaç / Radyasyon	1.1
Endokrinopati	1.1
Diğer	2.1

Oligospermi ve Semen Kalite Bozuklukları

Semen Kalite Bozuklukları

Astenospermi sperm hareket bozukluğunu ifade ederken, teratospermi ise sperm morfoloji bozukluğunu ifade eder. Sperm yoğunluk, hareket ve morfolojisinin kombine bozukluğu ise oligoastenoteratospermi olarak adlandırılır. Astenospermi çoğunlukla laboratuvara ulaşma zamanında gecikmeden kaynaklandığı gibi uzun cinsel perhiz süresinden de kaynaklanıyor olabilir. Persistan astenospermi ise çoğunlukla idiyopatik olabildiği gibi varikosel, geçirilmiş genital enfeksiyonlar, immotil silia sendromu gibi ultrastrüktürel silia anomalisi ve antisperm antikor varlığı ile ilişkili olabilmektedir. Teratospermi sıklıkla hem oligospermi hem de astenospermi ile birlikte bulunur.

Varikosel

Spermatik kord içindeki testiküler venlerin anormal biçimde dilatasyonu ve kıvrımlar oluşturması durumudur. Patofizyoloji ile ilgili olarak 3 teori ileri sürülmüştür. Bunlardan ilki sağ ve sol testiküler venler arasındaki anatomik farklılık olup sol testiküler venin renal vene daha dik açıyla açılması ve daha uzun olmasından yola çıkar. Diğer teori venöz kan reflüsü ile sonuçlanan venöz valvlerin olmayışı teorisi. Üçüncü ve son teori

ise sol renal venin aorta ve superior mezenterik arter arasında baskı altında olmasına bağlı testiküler venin parsiyel obstrüksiyonudur (85). Dilate venler fizik muayene sırasında palpe ediliyorsa klinik varikosel vardır, dilate venler sadece yardımcı tekniklerle saptanabiliyorsa subklinik varikoselden söz edilebilir. Varikoselin genel popülasyonda görülme sıklığı % 15-20'lerde iken, primer infertilitede % 30-40, sekonder infertilitede % 70-80'dir (86). Varikosel erkek infertilitesinin en sık rastlanılan, düzeltilebilir nedenlerinden biridir. Yaklaşık % 90'ı sol tarafta bulunur. Çoğu çalışmada bilateral varikosel sıklığı yaklaşık % 10 olarak bildirilmekle birlikte, bazı yakın tarihli yayınlarda bilateral görülme sıklığı daha da yüksek bulunmuştur (87).

Varikoseli bulunmayan erkeklerde yatar durumdayken ayağa kalkıldığında intraskrotal sıcaklık düşerken, varikoselli erkeklerde aynı şartlarda sıcaklığın arttığı gösterilmiştir (88). Varikoselin testis fonksiyonlarını hangi mekanizma ile etkilediği henüz açıklığa kavuşmuş değildir. En çok kabul gören teori testiküler hücre düzeyinde sıcaklığa bağlı değişikliktir. Venöz geri dönüşle birlikte intraskrotal sıcaklık artışı beraberinde testosteron üretiminde azalmaya, protein metabolizmasında değişime ve Sertoli hücre fonksiyonunda azalmaya yol açtığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (89). Bu intraskrotal sıcaklık artışı ile varikosel arasındaki ilişki bütün çalışmalarda da ortaya konulabilmiş değildir. Renal ve adrenal metabolitlerin renal venden reflüsü, kan akımında azalma ve hipoksi varikoselin erkek infertilitesine yol açma nedenleri arasında sayılabilmektedir ^{90, 91}. Gerek adolesanlarda gerekse erişkinlerde varikosel aynı taraf testiste küçülme ile birlikte olabilir. Varikoseli ve testis hacim kaybı bulunan adolesanlarda varikoselin düzeltilmesini takiben testiküler hacimde düzelme olabileceği bildirilmiştir (92). Ayrıca adolesan varikoseli tedavisinin testis hacmi kadar semen parametrelerinde de düzelmeye yol açtığı gösterilmiştir. Unilateral veya bilateral varikoseli olan ve aynı tarafta testis büyümesinin geri kaldığı adolesanlarda varikosel tedavi edilmelidir.

Öte yandan varikoselli erkeklerin büyük kısmı fertildir çünkü ya varikoselin etkisi hafiftir ya da bu erkeklerin spermatojenik potansiyelleri daha başlangıçta çok yüksektir ve varikoselin zararlı etkisine rağmen fertil sınırlar içerisinde kalabilmişlerdir. Başında da belirtildiği üzere bu hastaların hormon analizlerinde gonadotropin ve testosteron düzeyleri genellikle normal bulunur ama bazı hastalarda FSH düzeyi yüksek olabilir. Varikosektomi başarısının değerlendirilmesi için yapılan 136 çalışmadan 17'sinin alındığı bir meta-analizde operasyon sonrasında sperm yoğunluğunun ortalama $9.7 \times 10^6/\text{ml}$, motilitenin % 9.9 ve WHO kriterlerine göre normal morfolojiye sahip hücre sayısında %

3'lük artış sağlandığı belirtilmiştir (93). Bir diğer çalışmada ise varikosektomi sonrası semen kalitesinde % 51 ile % 78'lik artış bildirilmiştir (94). Gebelik oranlarında ise % 60'lara varan oranlar bildirilmiştir. Varikoselli erkeklerin büyük kısmı fertil olduğundan dolayı fertil bireylerde tek başına varikozel bulunması varikozel tedavisi için bir endikasyon oluşturmamaktadır. İnfertil bir çiftte kadın partner tetkik edildikten sonra erkekte anormal semen analizi bulguları ile birlikte klinik olarak saptanabilen varikoselin bulunması tedavi için uygun olan endikasyondur. Azoospermik erkeklerde ise varikozel tedavisini takiben genellikle semen parametreleri normale dönmeyecektir. Fakat varikosektomi sonrasında bu hastaların bir bölümünün semen örneklerinde düşük dansitede sperm çıkabilir ve neticede hastalar varikoselin düzeltilmesini takiben intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) ile IVF yapılabilir duruma gelebilirler (95).

Kriptorşidizm

Kriptorşidizmin yeni doğanlarda görülme sıklığı % 2.7 iken bu oran 1 yaşında % 0.8'e gerilemektedir (96). Altı aya kadar kendiliğinden inmeyen testislerin bundan sonra kendiliğinden inmesi beklenmez. Olguların üçte ikisi tek taraflı iken üçte biri çift taraflıdır. Hayatın ilk 6 ayı içerisinde kriptorşid testislerde germ hücre sayısı normal sınırlardadır, ancak erken infantil dönemde görülmesi beklenen germ hücre sayısındaki artış bu hastalarda görülmez. Subfertilite ile ilgili iyi bilinen bir etyolojik faktör olmasının yanı sıra azalmış testis hacmi ve sperm konsantrasyonu ile ilişkili olduğu da bilinmektedir. Bunun yanında bu hastalarda serum inhibin düzeylerinde düşüş, FSH düzeylerinde ise bir miktar yükselme olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (97). Retraktif testisle kriptorşid testisi birbirinden ayırt etmek önemlidir. Zira retraktif testiste spermatogenezde hafif bir baskılanma gözlemlenirken, kriptorşid testiste daha belirgin semen kalitesi bozuklukları görülmüştür (98). Tek taraflı kriptorşid testis olmasının fertilite üzerine önemli bir etkisinin olmadığı da Murphy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (99). Genel olarak, testis pozisyonu ile fertilite potansiyeli arasında direkt ilişki vardır. Kriptorşid testis yükseldikçe testislerde fonksiyon bozukluğu da şiddetlenir. İnguinal bölgede bulunan testislerin % 20-40'ında germ hücreleri yokluğu bulunur iken, bu oran intraabdominal testisi olanlarda % 90 oranındadır (100).

Genetik Sendromlar

Azoospermik hastalarda, ağır oligospermisi olan hastalarda ve idiyopatik infertilite hastalarında genetik değerlendirme yapılmasında yarar vardır. Genetik değerlendirme

sonucunda karşımıza (1) Kromozom anomalileri (2) Y kromozom anomalileri ve (3) Sperm DNA hasarı çıkmaktadır. Kromozom anomalileri ise kendi arasında sex kromozom anomalileri (Klinefelter Sendromu, Kallmann Sendromu, XYY Erkek, XX Erkek ve Mikst gonadal disgenezi) ve otozomal kromozom anomalileri (Resiprokal translokasyonu ve Robertsonian translokasyonu) olarak ikiye ayrılır.

Klinefelter Sendromu: Klinefelter sendromunun genetik özelliği fazladan bir X kromozomunun bulunmasıdır. Bu sendrom, genel popülasyonda % 0.1-0.2 sıklığında görülürken, azoospermisi olanlarda % 10-15, oligospermisi olanlarda ise % 0.7 oranında görülmektedir (101). Anne ya da babaya ait gametlerde mayoz sırasında kromozomların birbirlerinden ayrılmamaları pür Klinefelter sendromuna yol açar (47, XXY) ve % 90 olasılıkla görülür. Bu ayrılmanın olmayışı embriyonun gelişimi sırasında mitozla çoğalan hücrelerde meydana gelirse mozaik tablo (46, XY / 47, XXY) ortaya çıkar ki bu tablo da % 10 olasılıkla görülmektedir. Erkek fenotipiyle birlikte küçük sert testisler, jinekomasti ve gonadotropinlerde yükseklik klasik Klinefelter sendromunun karakteristik özelliğidir. Her ne kadar sekonder seks karakterleri zamanında gelişmeye başlamsa da, pubertenin tamamlanması gecikir ve bu sırada önükoid yapı, jinekomasti ya da seksüel ya da erektil disfonksiyon farkedilir. Bazı hastalarda virilizasyon tam olabilir ve hasta erişkin dönemde infertilite ile birlikte jinekomasti ve küçük sert testis yakınmasıyla başvurana kadar tanı konulması gecikebilir. Böyle hastaların bir kısmında mental gerilik ve değişik psikiyatrik bozukluklar tanımlanmıştır. Mozaik tipinde daha az anomaliler bulunur ve hastalar bazen fertil olabilirler.

Klinefelter sendromlu hastaların spermiyogramlarında tipik olarak azoospermi vardır. Testis biyopsilerinde sıklıkla seminifer tübüllerde skleroz gözlenir. Ancak, nadiren Sertoli hücreleri ve spermatozoa da bulunabilmektedir. Seminifer tübüllerdeki şiddetli hasar nedeniyle plazma FSH seviyesi genellikle yükselmiştir, LH seviyesi ise normal ya da yükselmiş olabilir. Hastaların % 50-60'ında total plazma testosteron seviyesi düşmüştür. Fizyolojik olarak aktif serbest testosteron konsantrasyonu ise genellikle düşüktür. Ayrıca plazma östradiolü sıklıkla yüksektir. Bu yükseklik testosteron bağlayan globülin artışını uyarak testosteron-östrojen oranında bir azalmaya neden olur ki bunun da jinekomasti gelişiminde sorumlu olduğu düşünülmektedir (102). Klinefelter sendromunda spermatogenezi düzeltecek bir tedavi yoktur. Mozaik Klinefelter sendromlu olup şiddetli oligospermisi bulunan hastalarda IVF ile ICSI uygulanabilir. Son zamanlarda, azoospermisi bulunan nonmozaik Klinefelter sendromlu olgularda da TESE yapılmaktadır.

Kallman Sendromu: X kromozomuna bağılı en sık görülen bozukluktur. Genel popülasyonda 1/10000 – 1/60000 sıklıkta görülmektedir. En sık görülen klinik belirtileri anosmi, hipogonadotropik hipogonadizm ve buna bağılı olarak infertilitedir. Bunların yanında daha seyrek olmakla birlikte mikropenis, kriptorşidizm, atrofik testis (<5 ml), fasiyal ve aksiller kıllanma yokluğu, ince ses, libido yokluğu, erektil disfonksiyon, fasiyal asimetri, yarık damak, renk körlüğü, sağırılık, kas kitlesinde düşüklük, kemik dansitesinde düşüklük, renal anomali, kardiyak anomali ve mental retardasyon da görülebilir (103). Genellikle hastalık X kromozom bağımlı resesif görölürken, bazı ailelerde otozomal dominant ve otozomal resesif geğış görölümüştür. Diğfer fenotipik anomaliler olmadan sadece izole gonadotropin eksikliği görülen bu hastalar genellikle infertilite ile başvurulur ve hormon replasman tedavisi ile başarılı bir şekilde tedavi edilirler (104).

XXX Erkek: Genel popülasyonda görölme sıklığı % 0.1-0.4 arasındadır. Bu hastaların genellikle fenotipleri ve hormon profilleri normaldir. Ancak değışik derecelerde mental retardasyon görölülebilir. İnfertilite ile başvuranlarda çoğunlukla ağır oligospermi bulunur. Yapılan testis biyopsilerinde matürasyon arresti veya SCOS sıklıkla karşımıza çıkar (100).

XX Erkek: Genel popülasyonda görölme sıklığı 1/14000'dir. Azoospermik hastaların ise % 0.9'unda görölümektedir. SRY geninin olduğı Y kromozom kısa kolu ile X kromozomu arasında translokasyondan kaynaklandığı bilinmektedir. Küçük testiküler hacim, jinekomasti ve azospermi gibi Klinefelter Sendromu'na benzer klinik özellikleri bulunmaktadır. Spermatogenezin bulunmaması en önemli özellikleridir (100).

Mikst Gonadal Disjenezi: Yenidoğanlarda 1/5000 sıklıkta görölür. Sıklıkla 45 XO / 46 XY mozaizizm görölür. Bu hastalarda infertiliteye germ hücre aplazisinin yol açtığı bilinmektedir (100).

Y Kromozom Mikrodelesyonları: İnfertil popülasyonda % 8.2, fertil popülasyonda % 0.4, oligospermik hastalarda % 5, azospermik hastalarda ise % 10 sıklıkla görölür¹⁰⁵. AZFa, AZFb ve AZFc olmak üzere üç farklı bölgesi vardır. Schlegel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre en sık AZFc (% 53.8) bölgesinde delesyon izlenmektedir. Daha sonra sırası ile AZFb+c % 20.5, AZFb % 14.2, AZFa+b+c % 7.7 ve AZFa % 3.8 oranlarında görölümektedir (106). AZFa bölgesinde ağırlıklı olarak delesyon görülen hastalarda SCOS, AZFb bölgesinde ağırlıklı olarak delesyon görülen hastalarda spermatogenetik arrest, AZFc bölgesinde ağırlıklı olarak delesyon görülen hastalarda ise şiddetli hipospermatogenez görölümektedir (107). Dolayısıyla AZFc delesyonlarında ejakülatta

spermatozoa bulunabilirken AZFb ve AZFa delesyonlarının prognozu daha kötüdür ve ejakülatta sperm görülmemektedir. AZFc delesyonu olan erkeklerde çalışmalar göstermiş ki zamana bağlı olarak sperm üretiminde azalma, testis hacminde azalma ve FSH ve LH’de yükselme olmaktadır. Bundan dolayı AZFc delesyonu saptanan hastalar zamanla oligospermik iken azospermik hale gelebilir ve bu hastalara en kısa zamanda kriyoprezervasyon yapılmalıdır (108).

İmmünolojik İnfertilite

Puberteye giren erkekte spermatogenezin başlamasıyla birlikte, seminifer tübüller içerisinde Sertoli hücreleri arasında kan-testis bariyerinin esasını oluşturan sıkı bağlantılar gelişir. Bu bariyer, immün sistemin post mayotik germ hücrelerinde bulunan sperm yüzey antijenleri ile temas etmelerinden korur. Antisperm antikor gelişmesi için risk faktörleri kan-testis bariyerini bozabilen durumları içerir. Erkeklerin yaklaşık % 60’ında vazektomiden sonra antisperm antikor gelişir, oysa konjenital vaz deferens yokluğu olan hastaların yaklaşık üçte birinden alınan spermlerin üzerinde antisperm antikor taşıdığı bulunmuştur (109, 110). Antisperm antikor gelişiminin görüldüğü diğer nedenler arasında akut epididimit, inmemiş testis ve genital travma bulunmaktadır. Antisperm antikorların gelişimi ile homoseksüel rektal ilişki, seksüel geçiş gösteren hastalıklar (özellikle geçirilmiş Klamidya enfeksiyonları), testis kanseri ve testis biyopsisi öyküsü arasında da ilişki bulunduğu saptanmıştır. Sperm motilitesinde bozulma ya da sperm aglütinasyonu bulunan olgular yanında, izah edilemeyen infertilite tanısı almış çiftlerin daha yüksek sıklıkta antisperm antikor geliştirdikleri de bildirilmiştir (111).

Antisperm antikorların varlığını araştıran çok sayıda test vardır. Direkt testler spermin üzerindeki antisperm antikorlarının varlığını saptamaya yöneliktir. İndirekt testler ise hastanın serumundaki antisperm antikorlarını ölçer ve genellikle antisperm antikor negatif donör spermi gerektirir. Kadın genital sistemine giren serum değil sperm olduğu için sadece sperme bağlanmış immunglobinleri tespit ediyor olması direkt testlerin bir avantajıdır. Antisperm antikorların saptanmasında en sık olarak *immunobead testi* ile *mixed agglutination reaction testi* kullanılmaktadır. Bu testler sperm yüzeyine bağlanmış bulunan, antikorlara tutunabilen küçük kürecikleri ya da eritrositleri kullanır. Skrolama, kürecik ya da eritrosit bağlanmış motil sperm yüzdesine göre yapılır. Çoğu laboratuvar, bir örnekte % 20-50’den fazla spermin bağlanma göstermesini antisperm antikor varlığı için pozitif olarak kabul eder (112).

Antisperm antikorları sperm fonksiyonlarını birkaç farklı seviyede etkileyebilirler. Antikor ile kaplanmış spermde servikal mukus penetrasyonu bozulabilir. Antikorların etkisi; spermin kapasitasyonunda inhibisyon, erken akrozom reaksiyonu ya da zona bağlanmasında ya da oositin fertilizasyonunda bozulmayı içerir (112). Fertil erkeklerdeki % 2 ya da daha düşük oranına karşın, infertilite ile gelen erkeklerin yaklaşık % 10'unda antisperm antikorları saptandığı bildirilmiştir (113). Antisperm antikor miktarı arttıkça fertilite üzerine etkisi de artar. Benzer şekilde, düşük konsantrasyondaki antikorların fertilite üzerine çok az etkisi olduğu görülmektedir. Her ne kadar immunobead testi gibi testler yüzeyine antikor bağlanmış sperm yüzdesini belirlese de, sperme bağlı antikor miktarı hakkında bir değer vermezler. İndirekt testler bu bilgiyi sağlarlar ve bu nedenle bazı otörler direkt testlerin bir tarama testi olarak kullanılmasını (yüksek özgüllükleri nedeni ile), serum titrelerini saptamak amacıyla da bunu takiben indirekt testlerin yapılmasını önermişlerdir (114). Daha önce belirtilen risk faktörlerini taşıyan hastaların, sperm motilitesinde bozulma, sperm aglutinasyonu ve izah edilemeyen infertilitesi bulunan çiftlerin antisperm antikor varlığı bakımından test edilmeleri gerekmektedir.

İdiopatik İnfertilite

Tanı metodlarındaki ilerlemelere rağmen, hastaların % 30'luk bir kısmında herhangi bir etiyoloji tanımlanamaz ve anormal semen analizi bulguları gösterirler. Bu durum idiyopatik erkek infertilitesi olarak belirtilir ve birden fazla neden ile birlikte olabileceği beklenir. Etiyolojik faktörün bulunamadığı bu grupta öncelikle ampirik medikal tedaviler denenir ve sonrasında hasta ÜYT'ye yönlendirilir. Küçük hasta serilerinin olduğu bazı çalışmalarda ampirik tedavilerin başarılı olduğu söylene de bu alanda büyük plasebo kontrollü çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.8.İnfertilite Medikal Tedavisi

Erkek infertilitesinde nedene yönelik (spesifik) ve ampirik olarak medikal tedavi verilebilmektedir.

Spesifik Medikal Tedavi

Hipogonadotropik hipogonadizm gibi endokrinopatiler, kültürle dökümanite edilmiş veya edilememiş pyospermi, antisperm antikorlu immünolojik infertilite ve ejakülasyon bozuklukları spesifik olarak tedavi edilebilir infertilite nedenleridir.

Hipogonadotropik Hipogonadizm: Bu erkeklerde tedavi hastanın yaşına ve beklentisine göre değişmektedir. Erişkin hastada virilizasyon ve normal seksüel işlevin sağlanması amaçlanıyor ise Testosteron enanthate veya cypionate 200 mg im. 2 haftada bir, transdermal testosteron 5-10 mg/g, testosteron jel veya bukkal tablet olarak verilebilir. Spermatogenezi başlatmak ve sürdürmek için biyolojik açıdan LH benzeri olan human chorionic gonadotropin (hCG) haftada 2-3 kez sc. olarak 1500-2000 IU, 4-6 ay boyunca verilebilir. Testiküler hacim ve serum testosteron düzeyleri stabil hale geldiğinde tedavi rejimine FSH stimülasyonu eklenmelidir. Kombine olarak veya hCG tedavisinden sonra human menopozal gonadotropin (hMG) veya rekombinant FSH kullanılabilir. Human menopozal gonadotropin im. olarak haftada 2-3 kez 75 IU, rekombinant FSH ise haftada 3 kez 37.5-75 IU dozlarda verilebilir. Bu tedavi, sperm konsantrasyonunda $5 \times 10^6/\text{ml}$ artış veya gebelik sağlanıncaya dek verilebilir. Ayrıca GnRH'nin infüzyon pompası ile subkutan pulsatil verilmesi de diğer bir alternatif tedavi yöntemidir (115).

Hiperprolaktinemi: İnfertil erkeklerin % 4'ünde bulunur. İnfertiliteye düşük serum testosteron düzeyi, libido kaybı ve erektil disfonksiyon eşlik etmediği sürece serum prolaktin düzeyine bakılmasına gerek yoktur. Genellikle idiyopatik olmasına rağmen ilaç kullanımına, fizyolojik strese ve hipofiz tümörlerine ikincil görülebilmektedir. Ardışık iki ölçümle serum seviyesindeki yükselme teyit edilmelidir. Hiperprolaktinemi tespit edilirse ($>18 \text{ ng/dL}$) magnetik rezonans görüntüleme ile sella turcica görüntülenmelidir. Tespit edilen makroadenomlar için tedavi cerrahi iken, mikroadenomlar genellikle bromokriptin veya kabergolin ile yapılan dopamin agonist tedavisine iyi yanıt verirler. Kabergolinin uzun yarılanma ömrü ve yan etki profili dolayısıyla bromokriptine göre daha avantajlı olduğu söylenebilir (116). Ne var ki literatürde infertil hiperprolaktinemili hastalarla yapılmış çok sınırlı çalışma bulunmaktadır. Mancini ve arkadaşları yaptığı 9 olguluk bir çalışmada 7.5 mg/gün bromokriptin 90 gün süre ile verilmiş ve tedavi sonunda tüm hastalarda prolaktin düzeylerine bakılmış. Prolaktin düzeyleri düşen 5 hastada sperm parametrelerinde iyileşme olduğu, 4 hastada ise testosteron düzeyinde yükselme olduğu gözlemlenmiştir (117).

İmmünolojik infertilite: İmmünolojik infertilitenin fizyopatolojisi ve tedavisi konusundaki tartışmalar günümüzde de devam etmektedir. Klinik önemi olan immünolojik infertilite tanısı için antikörlerin spermatozoa üzerinde gösterilmesi gerekmektedir. Steroid tedavisi, sperm yıkama ve intrauterin inseminasyon (IUI) veya doğrudan ICSI tedavisi seçilecek tedavi yöntemleridir. Kontrollü çalışmalarda tedavi grubu ile plasebo arasında gebelik

oluşturma açısından çelişkili sonuçlar alınmıştır. Diyabet, femur başı aseptik nekrozu ve gastrointestinal yan etkiler steroid tedavisinin kullanımını kısıtlamaktadır (118).

Enfeksiyon ve Piyospermi: Ejakülatta bulunan enflamatuvar hücreler epididim, seminal kese, prostat ve üretra kaynaklı olabilir. Wolff ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 100 piyospermik ejakülatın 54'ünde bakteriyolojik incelemenin negatif olduğunu göstermişlerdir (119). Piyospermik olgularda klinik olarak sessiz prostatit veya epididimit bulunabilir. Tüm bu nedenlerle piyospermik olgularda kültür spesifik veya spesifik olmayan antibiyotik ve antifungal ilaçlar kullanılabilir. Genital sistem enfeksiyonu bulunmayan piyosperminin tedavisi antiinflamatuvar ilaçlar, sık ejakülasyon ve prostat masajını içerir ki bu yöntemlerin etkinlikleri kanıtlanmış değildir (120).

Ejakülasyon bozuklukları:

Retrograd ejakülasyon: Pseudoephedrine 60 mg 4x1 veya 120 mg 2x1, Phenylpropanolamine 75 mg 2x1, Ephedrine 25-50 mg 4x1, Imipramine 25 mg 3x1 kombinasyonu 2-12 hafta süreyle verilebilir.

Anejakülasyon: Retrograd ejakülasyonu ekarte ettikten sonra semptomimetik tedavi başlanır. Başarılı olunamaz ise vibrasyon veya elektroejakülasyon uygulanır.

Prematür ejakülasyon: Psikoseksüel tedaviler, pause-squeeze tekniği, klomipiramin ve fluoxetine gibi Serotonin geri alım inhibitörleri ve alfa-1 blokerler (alfuzosin) kullanılabilir. Ancak prematür ejakülasyonun gerçek tedavisi yoktur.

Ampirik Medikal Tedavi

Erkek infertilitesinin ampirik tedavisinde hormonal veya hormonal olmayan tedaviler son zamana dek sıklıkla kullanılmaktaydı.

Hormonal ilaçlar

GnRH: Gonadotropin salgılayıcı hormon, hipofizer FSH ve LH üretimini artırmak için kısmen fizyolojik bir ajan olarak gözükmetedir. İntranazal sprey şeklinde 0.1-0.5 mg/gün ve pompa ile subkutan enjeksiyon şeklinde 1-10 µg/h'da 2 gün, 6 ay süre ile kullanılmıştır. Bir çalışmada gebelik oranları tedavi ve kontrol grubunda sırasıyla % 36 ve % 21 olarak bulunmuştur (121).

Gonadotropinler: Ülkemizde geçtiğimiz yıllarda en sık kullanılan hormonal tedavilerden birisidir. Ancak uzun süreli protein hormon kullanılması ilaca karşı antikor geliştirmekte ve bazı hormon ilaçların yavaş üreyen virüslerle oluşan ensefalit yaptığı konusunda yayınlar bulunmaktadır. Günümüzde rekombinant teknolojisindeki gelişmeler daha etkin ve saf gonadotropin üretimine olanak sağlamış, çift etkili (hem FSH hem de LH) tek bir gonadotropin üretimi de ayrıca başarılmıştır. Human chorionic gonadotropin, oligospermi tedavisinde kullanılmış olup kullanım amacı intrinsik LH'ye benzer etkiden dolayı bu hastalarda eksik olduğu düşünülen intratestiküler testosteron düzeyinin arttırılmasıdır. Doz ve tedavi aralıkları konusunda fikir birliği sağlanamamakla birlikte genel olarak im. veya sc. olarak 1500-2500 IU haftada 3 kez, 3-6 ay şeklinde kullanımı önerilmiştir. İlaveten yüksek dozda kullanıldığında oluşan yüksek östradiol seviyesine bağlı olarak semen kalitesini bozabilmektedir. Human menopozal gonadotropin, eşit LH ve FSH aktivitesine sahip olup 50-150 IU haftada 2-3 kez, 3-6 ay süreyle hCG ile kombine şekilde verilebilmekteydi. Kombine tedavinin hCG tedavisine üstün olmadığı da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Sonuç olarak gonadotropinler ile yapılan kontrollü çalışmalar yeterli olmadığı gibi, sperm parametreleri ve gebelikteki düzelme tartışmalıdır. Uzun süreli kullanımında direnç gelişebilir. Libido değişimi ve akne gibi yan etkileri vardır, pahalıdır ve pür FSH yardımcı üreme tekniklerine gidecek hastalara önerilmelidir (122).

Antiöstrojen tedavi: Testiste üretilen testosteronun değişmeden testosteron şeklinde, 5 alfa redüktaz enzimi ile DHT'ye dönüşerek veya aromataz enzimi ile östradiole dönüşerek etki ettiği bilinmektedir. Östradiol daha çok hipofiz üzerinden etki ederek LH salınımını kontrol etmektedir. Antiöstrojenlerin kullanılmasındaki amaç, hipofizden LH salınımı üzerindeki östrojene bağlı negatif feedback etkiyi ortadan kaldırmak ve testiste üretilen testosteron oranını artırmaktır. Bu sayede daha kaliteli sperm üretimi sağlanabilecektir. Erkek kısırlığının medikal tedavisinde en sık kullanılan antiöstrojen ilaçlar klomifen ve tamoksifendir. Klomifen sitrat sentetik, non-steroidal bir moleküldür. Hipotalamus ve hipofizdeki östrojen reseptörlerine bağlanır. Çalışmaların çok azı plasebo kontrollü olduğu için ilacın etkinliği tam olarak değerlendirilememektedir. Klomifen sitrat ile çeşitli dozlarda çalışmalar yapılmıştır. 100 mg/gün veya daha fazla dozda 1-12 aylık tedaviler sperm konsantrasyonunda sürekli değişikliklere neden olmamış ve testiküler hiperstimülasyonla sperm dansitesi azalmıştır (123). Gebelik oranı % 17'dir. Bir kısım araştırmacılar 50 mg/gün doz kullanımı ile oligospermik hastaların % 25-60'ında sperm konsantrasyonunda düzelme görürken, diğer bir kısım araştırmacılar ise fark bulamamıştır.

Gebelik oranı % 10 olarak bildirilmiştir (124). Kullanılmış olan bu yüksek dozların 25 mg/gün'lük doza üstünlüğü kanıtlanamamıştır. Yirmibeş gün boyunca 25 mg/gün klomifen sitrat verilmesinden sonra 5 gün ara verilerek yapılan tedavi önemli oranda başarı sağlamıştır. Bu tedavi rejimini 6 aylık aralarla kullanılması sonrasında % 75 oranında sperm kalitesinde iyileşme, % 35-40 gebelik oranı saptanmıştır (125). Tedavi verilen hastalar ayda bir serum testosteron, LH ve FSH; 3 ayda bir de semen analizi ile takip edilmelidir. Tedavi verilmiş hastalarda % 10 civarında ateş basmaları dışında, yan etkisi az görülmektedir. İlaveten bulantı, kusma, hafif deri reaksiyonları, meme hassasiyeti, baş dönmesi ve geriye dönüşlü saç dökülmesi olabilir, fakat bunlar % 2'nin altında görülmektedir. Midraizise bağlı geriye dönebilen bulanık görme yine az sayıda hastada görülebilmektedir (126). Tamoksifenin erkek infertilitesi ampirik medikal tedavisinde kullanımı 1970'lerin sonlarına doğru başlamıştır. Günlük dozu 20-30 mg olacak şekilde, ikiye bölerek 3-6 ay süreyle kullanılabilir. Olgular aylık serum testosteron, LH ve FSH; üç ayda bir semen analizi ile izlenmelidir. Başarı oranı klomifene neredeyse eşittir. Yan etki profili klomifene göre daha kısıtlıdır. İdiyopatik oligospermide 20 mg/gün tamoksifen ile sperm dansitesinde % 11-100 artış bulunurken, motilitede önemli bir artış saptanmamıştır (127). Kontrollü çalışmalarda gebelik oranında düzelme görülmemiştir. Tamoksifenin bir diğer avantajı klomifen ile görülen zayıf östrojen reseptör stimülasyonunun olmamasıdır.

Aromataz inhibitörleri: Prolaktin düzeyi normal, LH düzeyi normal veya düşük, testosteron düzeyi düşük obez infertil erkeklerde testosteron/östradiol oranına bakılarak testosteronu östradiole çeviren aromataz enzim aktivitesi değerlendirilebilir. Aromataz enzimi yağ hücrelerinde, testiste, hipotalamusta ve hipofizde bulunmaktadır. Teorik olarak aromataz enzim inhibitörleri verilerek özellikle intratestiküler testosteron miktarı arttırılabilirken, östradiolün spermatogenez üzerindeki negatif etkisi de azaltılabilir. İnfertilite tedavisinde kullanılan testolakton ve anastrozole isminde iki aromataz enzim inhibitörü vardır. Testolakton 100-200 mg/gün, anastrozole 1 mg/gün olarak en az 3 ay kullanılır. Olgular serum testosteron ve östradiol ölçümleri, karaciğer fonksiyon testleri ve semen analizi ile izlenmelidir. En önemli yan etkileri libido azalmasıdır (128). İdiyopatik oligospermisi olan 10 hastada 100 mg/gün 6-12 ay testolakton ile tedavi edilmiş, % 80 hastada sperm dansitesinde artış ve % 33 hastada gebelik oranı saptanmıştır (129).

Büyüme hormonu: Testis büyümesini sağlamak ve puberteyi başlatmak için büyüme hormonu gereklidir. Büyüme hormonu testiste insulin like growth faktör-1'i uyarak testis büyümesini sağlar. Henüz Food and Drug Administration (FDA) onayı

yoktur. Enjeksiyon yerinde ağrı ve kızarıklık, geçici ateş, artralji, ödem, insülin rezistansı gibi yan etkileri vardır (130).

Non-hormonal İlaçlar

Klonidin: Alfa-adrenejik agonist olan klonidin büyüme hormonunu artırarak spermatogenezi etkiler. Büyüme hormonu eksikliği klonidin yükleme testi ile anlaşılır. Günlük 1.75 mg dozda verilen klonidin ile 11 olgunun 5'inde sperm sayısı artmış, gebelik oranı ise % 50 olmuştur (131).

Karnitin: Epididimal sıvıda serumdan 2000 kat daha fazla L-karnitin bulunmaktadır. Asetil karnitin sperm membran stabilizasyonunu sağlamaktadır. Karnitin spermin hücre içi enerji metabolizmasında ve yağ asitlerinin sentez ve oksidasyonunda görev almaktadır (132). Yapılan çift kör plasebo kontrollü çalışmada yaşları 20-40 arasında değişen 100 infertil hastaya 2 gr/g L-karnitin verilmiş. Çalışma sonucunda total sperm sayısında, sperm konsantrasyonunda ve ileri yönlü hareketli sperm sayısında plaseboya göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandığı belirtilmiştir (132).

Kallikrein: Kallikrein, erkek ve dişi genital sisteminde kininojenlerden bradikinin ve kallidin gibi kininlerin sentezini sağlamaktadır. Kininlerin düz kas relaksasyonuna sekonder vazodilatatör etkilerine ek olarak en önemli etkileri sperm motilitesi üzerinedir. Sperm motilitesinde % 67 artış ve % 38 gebelik oranları saptanmıştır (133). Avrupa'da en sık kullanılan ilaçtır. Pür motilite bozukluğu olan olgularda tercih edilebilir. Ancak yüksek ve uzun süreli kullanımında sessiz epididimiti ve prostatiti alevlendirebilir.

Nonsteroid antienflamatuvar ilaçlar (Indomethazin): Prostaglandinlerin testis üzerine negatif etkide bulunduğu gösterilmiştir. Prostaglandin sentez inhibitörü nonsteroid antienflamatuvar ilaçların kullanılması teorik olarak sperm kalitesini düzeltebilir. Bu nedenle indomethazin 100 olguluk bir seride 150 mg/gün 3 ay boyunca kullanılmış ve sperm parametrelerinde düzelme ve gebelik oranında % 35'lik artış saptanmıştır (134).

Pentoksifilin: Fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin siklik Adenozin Monofosfat'ı (cAMP) artırarak sperm motilitesini arttırabilir. Pentoksifilin 3x400 mg/gün dozlarda 3-6 ay süreyle kullanılabilir. İdiyopatik oligospermi tedavisinde amprik olarak kullanılmış ve % 17 gebelik oranı bildirilmiştir. Sperm penetrasyon testinde kullanıldığı zaman *in vitro* sperm motilitesini arttırdığı gözlenmiştir (135).

Antioksidanlar: Semende reaktif oksijen türevlerinin kaynakları immatür spermatozoalar, lökositler ve sperm yıkama teknikleridir. Semendeki reaktif oksijen türevleri spermatozoal hareketliliği bozar ve hücrel DNA'yı olumsuz etkilerler. Anti oksidanlar reaktif oksijen türevlerini nötralize ederek sperm yapısını koruyabilir. Bunun için ampirik olarak alfa-tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), selenyum ve glutatyon kullanılabilir (136).

Mast Hücre Blokerleri (Tranilast): Testisin interstisiyel dokusunda mast hücreleri yer almaktadır ve yaşlanma ile sayıları artmaktadır. Tranilast bir anti-inflamatuvar ve Trombosit Growth Factor- β 1 inhibitörüdür. Oligospermik olgularda sperm sayısını ve motilitesini artırmış, gebeliğe etkisi % 32 oranında bulunmuştur (137).

Sonuç olarak erkek infertilitesinin ampirik tedavisi kanıta dayalı değildir, açıklanamayan hastalık durumlarında kullanılır ve teoriktir. Ampirik tedaviye eşlerin her ikisi ile konuşularak karar verilmelidir ve eşin yaşı tedavinin başlanması ve süresini belirlemede yol gösterici olmalıdır. Ampirik tedavide kullanılan ilaçlarla yapılan prospektif, plasebo kontrollü, çift kör çalışmalar yeterli sayıda ve büyüklükte değildir. Ayrıca herhangi bir infertilite tedavisinin etkinliği, spontan gebelik olasılığının üzerine koyduğu katkı ile ölçülmelidir. Kaldı ki Avrupa Üroloji Derneği'nin 2012'de güncellenen Erkek İnfertilitesi Tedavi Kılavuzu'nda da belirtildiği gibi yapılan çalışmalarda androjenlerin, hCG/hMG'nin, bromokriptinin, alfa blokerlerin ve sistemik steroidlerin idiyopatik erkek infertilitesi üzerine olan etkileri tartışmalıdır. Sadece FSH ve testosteron ile kombine anti-östrojen preparatların seçilmiş vakalarda yararlı olabileceği, ancak bunun da çok merkezli çalışmalarla desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır (138, 139). Erkek infertilitesinde ampirik medikal tedavi sadece hipogonadotropik hipogonadizmli olgularda net bir şekilde önerilmektedir (Öneri derecesi A).

2.2.9.Azoospermi

Azoospermi, ejakülatta hiç sperm bulunmaması anlamına gelir ve erkeklerin % 1'inde, infertilite yakınması olanların ise % 15'inde bulunur (140). Nonobstrüktif azoospermi, testislerde tam olarak gelişmiş spermin minimal olması ya da üretilmemesi nedeniyle ejakülatta spermatozoa yokluğu olarak tanımlanır.

Azoospermi, yetersiz hormonal stimölasyon (hipogonadotropik hipogonadizm), spermatogenez anormallikleri ya da obstrüksiyon nedeni ile meydana gelebilir. Azoospermik hastanın değeriendirilmesi, en az iki semen analizinde azoospermi göröldükten sonra azoosperminin spermatogenez eksikliğinden mi yoksa duktal obstrüksiyondan mı kaynaklandığını saptamaya yönelik olmalıdır. Öncelikle semen örneği santrifüj edilmeli ve pellet değeriendirilmesi yapılarak oligospermi ekarte edilmelidir. Hikaye ve fizik muayene bulgusu azoosperminin sebebi hakkında fikir verse de esas etiyolojiye yönlendiren unsurlar testis boyutları, serum FSH düzeyi ve vaz deferenslerin bulunup bulunmamasıdır. İlk basamak vaz deferenslerin bulunup bulunmadığının kontrol edilmesidir. Çünkü konjenital bilateral vaz deferens yokluğu obstrüktif azoosperminin yaygın bir nedenidir. Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu fizik muayeneye dayanan bir klinik tanı olup, kistik fibrozis transmembran kondüktans regölator proteini genindeki bozukluktan kaynaklanır (141). 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.

Testis hacimleri küçük hastalarda, primer ya da sekonder testiküler yetmezlik vardır. Bu tanıyı koymak kadar, hem fonksiyonel hem de nonfonksiyonel hipofiz tümörlerini belirleyebilmek amacıyla da testosteron, LH, FSH ve prolaktini içeren serum hormon testleri yapılır. Küçük testis ve normalin 2 katından fazla serum FSH konsantrasyonu primer testiküler yetmezlik göstergesi olabilir. Bu grup hastalarda obstrüktif etiyolojiyi ekarte etmek için testiküler biyopsi günümüzde önerilmemektedir. Azoospermi 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 hastalara matürasyon arresti gibi spermatogenez bozuklukları ile duktal obstrüksiyon ayrımı yapabilmek için testis biyopsisi yapılabilir (76). Vazografi, testislerden biyopsi alınırken değil, rekonstrüktif cerrahi sırasında skrotal eksplorasyon sırasında yapılmalıdır. Tek taraflı duktal obstrüksiyon bulunan hastalar tipik olarak normal sperm sayısına ve fertilité potansiyeline sahiptirler. Nadiren, tek taraflı obstrüksiyon taşıyan hastalar obstrükte olmamış karşı testisin anormal yapıda bulunması nedeni ile oligospermi ya da azoospermi ile gelebilirler (142).

Başlangıç değerlendirmesi ve bunun sonucunda ayırıcı tanıya dayanılarak önceden tanımlanan algoritmelerde belirtildiği gibi, daha spesifik ilave testler gerekebilir. Bu ilave testlerin yapılmasındaki amaç erkek infertilitesi için spesifik nedenleri ortaya çıkarmak ya da ekarte etmektir. Böyle testlerin her birisi için spesifik endikasyonların bulunduğunu ve rutin olarak yapılmasına ihtiyaç bulunmadığını akılda tutmak gerekir. Hikaye, fizik muayene ve laboratuvar testlerinin sonuçları, hastanın bir tanısal kategori içerisine yerleştirilmesine olanak sağlar. Obstrüktif azoospermiye yol açan nedenler arasında lokalizasyona göre intratestiküler, epididimal, vaz deferens veya ejakülatuar kanalda oluşan obstrüksiyonlar sayılabilir. Obstrüktif azoospermide 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 cerrahi girişimlerle obstrüksiyon giderilir. Ancak başarılı olunamayan durumlarda yardımcı üreme yöntemlerine başvurmak gerekebilir. Obstrüktif azoospermide 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 (143).

Nonobstrüktif azoospermi nedenleri; anorşi, testis travması, testis torsiyonu, inmemiş testis, Klinefelter sendromu, germ hücre aplazisi, fokal hipospermatogenez, matürasyon arresti, orşit, radyasyon, sıcaklık artışı, gonodotoksik ajana maruziyet, karaciğer sirozu ve böbrek yetmezliği gibi sistemik hastalıklar, testis tümörleri, varikosel, testis vaskülarizasyonunu bozabilecek cerrahi girişimler ve idiyopatik nedenlerdir. Nonobstrüktif azoosperminin 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 tübüler skleroz, germ hücre aplazisi, matürasyon arresti ve hipospermatogenez saptanabilir (144). Bazı çalışmalar biyopsi ile bu durumdaki testislerin yarısından fazlasında sperm bulunduğunu belirtmektedir. Bu nedenle biyopsiyle beraber sperm elde etme yöntemleri kullanılması önerilmektedir (145). İnfertil hastalarda üremeye yardımcı yöntemler için sperm elde etmeye geçmeden önce varsa azoospermiye 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.

Azospermik Hastaların Hormon Düzeylerine Göre Sınıflaması

I. Normal testosteron, normal LH, yüksek FSH: Hasta azospermik ya da oligospermik olabilir. Bu hastalarda Leydig hücre fonksiyonları normal olduğu için serum testosteron ve LH düzeyleri normal sınırlarda kalmaktadır. Serum FSH yüksekliğinin nedeni açık değildir, ancak Sertoli hücrelerinin disfonksiyonu sonucu inhibin-B düzeyinin azalmasına bağlı olduğu sanılmaktadır. Bu durum, infertil hastalarda en sık karşılaşılan hormonal paterndir. Çok nadiren FSH salgılayan hipofiz tümörleri de bu duruma yol açabilir. Bu hastaların çoğunda etiyoloji idiyopatik olarak kabul edilmektedir. Öte yandan bu hastaların bir kısmının fertil olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (146).

II. Testosteron düşük, LH düşük, FSH düşük: Bu hormonal patern hipogonadotropik hipogonadizmin karşılığıdır. Konjenital veya kazanılmış olabilir. Bu hastalarda panhipopituitarizmi dışlamak için tiroid stimüle edici hormon, kortikotropin, prolaktin, büyüme hormonu, kortizol gibi hormonların da serum düzeylerine bakılmalıdır. Bu hormonal anormalliğin en sık nedeni idiyopatik GnRH yetersizliği olup Kallman Sendromu ve idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm olarak karşımıza çıkar. Testosteron ile androjen replasmanı, Kallman sendromlu genç erkeklerin virilizasyonu için yeterli tedaviyi sağlar. Ancak, tedavide dışarıdan androjen verilmesi intratestiküler testosteron üretimini baskılar. Spermatogenezin başlatılması için gonadotropin tedavisi gerekir. Haftada üç kez, ciltaltı yolla 2000 IU hCG verildiğinde kazanılmış hipogonadotropik hipogonadizmli çoğu olguda spermatogenez başlatır. Ancak, konjenital hipogonadotropik hipogonadizm bulunan hastalarda spermatogenezin tamamlanabilmesi için genellikle FSH'nin de eklenmesi gerekir. Başlanan hCG tedavisinden 3-6 ay sonra haftada 3 kez im 37.5 IU ya da 75 IU FSH, genellikle spermatogenezin tamamlanması ile sonuçlanır (122). İzlemde 1-3 ayda bir serum hormon düzeyleri (LH, FSH, testosteron, östradiol) ve 3 ayda bir semen analizi istenir ve testis hacimleri takip edilir. Yetersiz yanıtlarda ilaç dozları yükseltilebilir. Hastaların % 80'inde 18 ayın sonunda sonuç alınır. Tedavinin başarısızlığı durumunda verilen ilaçların dozu veya süresi yetersiz kalmış olabilir, hipogonadizmle birlikte reproduktif kanal obstrüksiyonu veya testislerde yapısal anormallik olabilir ve/veya verilen hormonlara karşı antikor gelişmiş olabilir. Bu durumda hastalar testis biyopsisi, vezikülografi ve serum antikor düzeylerinin ölçümü ile yeniden değerlendirilmeli ve ek tedaviler uygulanmalıdır (147).

Edinsel hipogonadotropik hipogonadizmin ilaç kullanımı dışında en sık sebebi prolaktinomadır. Prolaktin düzeyi yüksek ise başta görme alanı olmak üzere tam bir nörolojik muayene yapılmalıdır. Daha sonra hemokromatozis açısından serum ferritin düzeyi ölçülmeli ve hipofiz görüntülemesi yapılmalıdır. Hipofiz kitleleri fonksiyonel olup prolaktin salgılayarak hipogonadizme yol açabileceği gibi, nonfonksiyonel olup gonadotropik hücrelerde hasara yol açarak da hipogonadizme yol açabilir. Erkeklerdeki prolaktinomaların çoğu makroadenomdur (>1 cm). Makroadenomlar her iki cinsiyette eşit oranda görülürken, mikroadenomlar kadınlarda erkeklere kıyasla 20 kat daha sık görülmektedir. Makroadenomu olan hastaların serum prolaktin düzeyleri genellikle 50 ng/ml'nin üzerindedir. Prolaktin düzeyinin <50 ng/ml olmasının klinik önemi tartışmalıdır ve genellikle renal yetmezlik, stres, ilaç kullanımı (klorpromazin, haloperidol, metoklopramid, sulprid, metildopa, rezerpin, verapamil, östrojen, opiat vb.), tiroid disfonksiyonu ve göğüs duvarı radyasyonu gibi adenom dışı nedenlere bağlıdır. Bu grup hastalarda altta yatan nedenin tedavisi genellikle yeterli olmaktadır. Olguların bir kısmı ise idiyopattır. Makroadenomlar ise medikal tedavi, radyoterapi veya cerrahi yöntemlerle tedavi edilir. Bugün için en iyi sonuçlar bromokriptin, lisürid, pergolid ve kabergolin gibi dopamin agonistleri ile elde edilmektedir. Makroadenomlarda cerrahi tedavi yalnızca bası belirtilerinin olması, tümör içine kanama, ilaç tedavisine yanıtızsızlık veya intolerans gelişmesi durumunda düşünülmelidir (59).

III. Testosteron ve LH düzeyi normal, FSH düzeyi düşük: Bu hormon profili izole FSH yetmezliğini tanımlar. Bu nadir hastalıkta testis hacimleri, virilizasyon gelişimi normaldir. Ama FSH eksikliğinden dolayı oligospermi ya da azospermi görülmektedir. Böyle olgularda hMG verilmesinin spermatogenezi etkin biçimde uyardığı gösterilmiştir (148). Günümüzde tercih edilen tedavi rekombinant insan FSH tedavisidir.

IV. Testosteron ve LH düzeyi düşük, FSH düzeyi normal: İzole LH yetmezliğini (Fertil Önükoid Sendrom) tanımlar. Etkilenen erkeklerde önükoid vücut yapısı gözlenir, vücut kılları preadölesan dönemdeki gibi seyrek ve zayıftır, iskelet kasları zayıf gelişmiştir, uzun kemiklerdeki epifizler kapanmadığı için ekstremiteler oldukça uzundur (alt vücut segmenti daha uzundur), testis hacimleri normal veya daha büyüktür, bazı olgularda jinekomasti görülebilir. Klomifen testine yanıt alınamaması ve GnRH testine pozitif yanıt olması nedeniyle patolojinin hipotalamik orjinli olduğu sanılmaktadır. Aslında izole LH yetmezliğini idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizmin bir varyantı olarak kabul eden görüşler de vardır. Testis biyopsisinde kalitatif olarak normal ancak kantitatif olarak düşük

spermatogenezisle birlikte Leydig hücre atrofiksi gözlenir. Hastalığın insidansı kesin olarak bilinmemekle birlikte, literatürde çok sayıda olgu bildirilmiş ve değişik yorumlar yapılmıştır. Patolojinin hipotalamus, hipofiz veya Leydig hücre düzeyinde olabileceğine dair değişik görüşler vardır. Tedavide LH etkili hCG kullanılır. Tedavide hCG kullanımından sonra serum testosteron düzeyinde yükselme olması, böyle hastalarda Leydig fonksiyonunun normal olduğunu gösterir (149).

V. Yüksek/hafif yüksek Testosteron ve LH, düşük/hafif düşük FSH: Bu hormon profili parsiyel androjen rezistansında görülür. Bu hastalarda Leydig hücreleri sürekli LH ile uyarıldığından testosteron düzeyi yükselebilir. Testosteron, aromatisasyon yoluyla östradiole dönüştüğünden serum östradiol düzeyi yükselirken, FSH düzeyi azalabilir. Östradiolün testosterona oranı yüksek ise jinekomastr görülebilir. Psödohermafrodizm bulguları vardır. Bu hormon profili ile parsiyel androjen rezistansından şüphelenilse bile, kesin tanı için genital dokularda androjen reseptör tayini yapılmalıdır (150). Bu durumun bugün için bilinen bir tedavisi yoktur.

VI. Konjenital Adrenal Hiperplazi (KAH): Bu hastalıkta infertilite nedeni, adrenal androjenlerin feed-back yoluyla gonadotropinlerin sekresyonlarını inhibe etmeleridir. İnfertil erkekte rutin KAH araştırılması önerilmemektedir. İlginç bir şekilde KAH'lı erkeklerin çoğu fertildir. Ancak erken puberte öyküsü, ailede KAH öyküsü, kısa boy, testiküler büyüme (adrenal kalıntı tümörlerine bağlıdır) ile birlikte infertilite varsa KAH araştırılması yapılmalıdır (151).

VII. Testosteron, LH ve FSH hormon düzeyleri normal: Bu hasta grubu en sık karşımıza çıkan grup olup, araştırılması için bakir bir alan olarak önümüzde durmaktadır. Moleküler biyoloji ve genetik bilimindeki gelişmeler sayesinde bu hastalarda patolojinin ne kadarının endokrin kökenli olduğu önümüzdeki yıllarda açığa çıkabilir. Bu hastaların bir kısmının ampirik testosteron, gonadotropin ve antiöstrojen tedavilere yanıt vermesi, bugün için açıklayamadığımız endokrin nedenlerin olabileceğine işaret etmektedir. Özellikle aromataz inhibitörleri bu alanda kullanabilecek ilaçlar olarak görünmektedir. Önemli bir çalışmada, öncelikle 40 fertil hastada serum testosteron ve östradiol düzeylerine bakılıp bu grup kontrol grubu olarak seçilmiştir. Altmış üç infertil hasta (43 nonobstrüktif azospermik ve 20 oligospermik) çalışmaya alınarak serum testosteron ve östradiol düzeylerine bakılmış ve kontrol grubuna göre testosteron/östradiol oranı 20 persentilden düşük olanlara (45 hasta) ortalama 5 ay (1-24 ay) süreyle 100-200 mg/gün dozunda oral testolakton verilmiştir.

Kırkbeş hastanın 44'ünde testosteron/östradiol oranı % 254 artmış, spermiogram incelemesinde azospermik hastalarda değişiklik saptanmamış, oligospermik olgularda ise 12 hastada sperm konsantrasyonu % 16'dan % 28.9'a, motilite ise % 27.1'den % 45.3'e yükselmiştir. İndirekt bulgu olarak testis biyopsilerinde testosteron/östradiol oranı düşük olanlarda Leydig hücre hiperplazisi saptanmış ve bu durum, infertil hastalarda periferik aromatzasyondan çok intratestiküler aromatzasyonun daha önemli olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (152).

2.2.10. Testiküler Sperm Ekstraksiyonu

Günümüzde erkeklerde infertilite olgularının tedavisinde en önemli ilerleme, NOA olgularda testislerde spermatogenezin devam ettiği küçük odakların gösterilerek bu odaklardaki matür sperm hücrelerinin elde edilmesi olmuştur. Elde edilen hücreler ICSI'da kullanılarak gebelik sağlanabilmektedir. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu, 1992 yılında ilk kez Palermo tarafından uygulanarak ilk gebelik elde edilmiştir (153). 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 (TESE) gibi uygulamalar ile yapılan çalışmalarda % 30-80 oranında spermatozoa elde edilebileceği belirtilmiştir (145, 154, 155). 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 (156). Biyopsi sayısının artırılması her ne kadar spermatozoa bulma şansını arttırsa bile doku travmasına ve küçük testislerde serum testosteronunda düşmeye yol açmaktadır. Testiküler sperm ekstraksiyonu, öncelerde konvansiyonel çoklu biyopsilerle yapılmaktayken günümüzde birçok merkezde mikrodiseksiyon yöntemi ile (mikro TESE) uygulanmaktadır. Mikro TESE, ilk defa Schlegel tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır (145). Yapılan çalışmalarda konvansiyonel TESE ile spermatozoa bulma oranları % 0-45 arasında izlenirken mikro-TESE ile bu oran % 43-63 arasında belirtilmektedir (157). 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 (158). Nonobstrüktif azospermi tanılı hastalarda TESE sonrası spermatozoa bulma oranı ortalama % 50 olup ICSI sonrası % 35 ile % 52 arasında gebelik gerçekleşebilmektedir (159, 160). 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. Schlegel, 6 aydan önce ve sonra ikinci kez TESE yapmış ve spermatozoa bulma oranları sırasıyla % 25 ve % 80 olarak bildirmiştir (161). Önerilen maksimum TESE uygulama sayısı 4'dür. Daha fazla girişim hücre bulma şansını arttırmamaktadır (162).

Testiküler Sperm Ekstraksiyonu Öncesi Sperm Bulma Başarısını Etkileyen Faktörler

Nonobstrüktif azospermi hastalarında TESE öncesi testislerde spermatozoa olup olmadığını gösterecek herhangi bir klinik test yoktur. Fakat spermatozoa bulma oranını etkilediği düşünülen birtakım parametreler bulunmuş ve bu parametreler ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Bu konu ile ilgili en çok yapılan çalışmalar testis hacmi, serum inhibin-B ve FSH düzeyi, daha önce yapılan testis biyopsisi sonucu ve kromozomal anormallikler üzerinedir.

Testis hacmi: Obstrüktif azospermili olgularda testislerin normalden daha büyük ve dolgun olması, testiküler yetmezlik olan olgularda ise testislerin ufak ve fibrotik olarak ele gelmesi spermatogenez ile testis hacmi arasında ters yönlü bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Ancak normal hacimli testis ile düşük hacimli testis arasında spermatozoa bulma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmaması, testis hacmi düşük olan hastalarda spermatozoa bulma oranının daha düşük olabileceği teorisinin doğru olmadığını göstermiştir. Amer tarafından yapılan bir çalışmada normal hacimli testislerin % 44'ünde, küçük hacimli testislerin de % 25'inde spermatozoa bulunmuş ve testis hacimleri 5 ml'den az olan olgularda bile spermatozoa bulunabileceği gösterilmiştir (163). Günümüzde testis hacmi çok düşük olan hastalarda bile TESE uygulanması gerektiği görüşü kabul görmüştür (164).

Serum FSH düzeyi: Serum FSH düzeyi ölçümü infertil erkeklerin tanısallık değerlendirilmesinde ilk kullanılan test olmasına rağmen, testis dokusunda matür spermatozoa varlığını belirlemede her zaman yeterli olmamaktadır. Yapılan pek çok çalışmada serum FSH düzeyi ile TESE'de spermatozoa elde etme başarısı arasında direkt bir ilişki bulunamamıştır. Ramasamy tarafından yapılan bir çalışmada NOA'lı olgular

serum FSH düzeyi 15 mIU/ml'nin altı, 15-30 mIU/ml, 30-45 mIU/ml ve 45 mIU/ml'nin üzeri olmak üzere 4 gruba ayrılmış ve gruplar arasında TESE ile spermatozoa elde etme, klinik gebelik ve canlı doğum oranları arasında fark olmadığı saptanmıştır (165). Sonuç olarak, TESE ile serum FSH düzeyi yüksek dahi olsa spermatozoa elde edilebilmektedir ve tek başına FSH yüksekliği NOA olgularda TESE uygulamasında başarı açısından fikir vermemektedir.

Serum inhibin-B düzeyi: Hipofizden salgılanan FSH hormonu sertoli hücreleri tarafından yapılan inhibin-B hormonu ile kontrol edilir. İnhibin-B sabah en yüksek değerlerde olup pulsatil olarak salgılanır. Serum inhibin-B düzeyi ile sperm sayısı arasında pozitif bir korelasyon vardır (166). Dolayısıyla inhibin-B düzeyinin TESE esnasında spermatozoa bulma oranını serum FSH düzeyine göre daha kuvvetli yansıttığı düşünülmektedir. Nonobstrüktif azospermi hastalarında inhibin-B'nin belirli bir seviyenin altında olmasının TESE'de spermatozoa bulma şansını azalttığı gösterilmiştir (167). Bununla birlikte serum inhibin-B düzeyinin düşmesinin TESE'de predikte edici olmadığına dair yapılan çalışmalar da mevcuttur (168). Buna rağmen günümüzde serum FSH ve inhibin-B konsantrasyonları arasında ters korelasyon olduğu ve serum inhibin-B düzeyindeki düşmenin TESE ile spermatozoa bulma şansını düşürdüğü kabul edilmektedir.

Testis biyopsisi: Testis biyopsisi günümüzde azospermik infertilite olgularında bir tanı aracı olarak değil ICSI ile beraber tedavi aracı olarak kullanılmaktadır. Testis biyopsisi TESE öncesi spermatozoa bulma oranı hakkında bilgi verebilir. Fakat biyopside spermatozoa olup olmaması testisin diğer yerlerinde de sperm bulunacağı ya da bulunmayacağını kesin olarak göstermez (169). Günümüzde testis biyopsisi tanısal amaçlı kullanım alanından çıkmıştır.

Y kromozomu mikrolelesyonu: Y kromozomu uzun kolu üzerinde bulunan AZF bölgesinde yer alan a, b ve c lokusları spermatogenezin normal olarak düzenlenmesini kontrol eder ve bu bölgelerde ortaya çıkan defektler değişik derecede sperm yapımında bozukluğa neden olurlar. AZFc delesyonlarında ejakülatta spermatozoa bulunabilir. AZFb ve AZFa delesyonlarının prognozu ise daha kötüdür ve sıklıkla SCOS ile ilişkilidir ¹⁰⁸. Günümüzde azospermik hastalarda TESE öncesi karyotip analizi ve Y kromozomu mikrolelesyonu bakılması önerilmektedir.

2.3.Cajal'ın İnterstisiyel Hücreleri

2.3.1.Tarihçe

Binsekiz yüz altmış yılından günümüze değin Cajal'ın interstisiyel hücreleri ile ilgili olarak yaklaşık 500 makale yayımlanmıştır. Cajal'ın interstisiyel hücreleri, 19. yüzyılda barsaklarda primitif nöron hücreleri olarak tanımlanmıştır. Ünlü İspanyol bilim adamı Ramon Y. Cajal, 1893 yılında bugün de Cajal'ın interstisiyel hücreleri olarak bilinen otonomik innerve edilmiş organlarda (özellikle barsakta) primitif nöronlarda bulunan, alışılmışın dışında küçük hücre grupları tanımlamıştır (170). Daha sonra bu hücrelerin interstisiyel hücreler olmakla birlikte sinirler ve barsak düz kas hücreleri ile de ilişkili olduklarını bildirmiştir (171). En iyi GİS'de tariflenmiş olan bu hücreler içi boş organların motor fizyolojisinin ve patofizyolojisinin açıklanmasında ümit verici olmuştur. Özefagustan anüse kadar gastrointestinal sistemde yavaş dalga oluşması ve/veya yayılmasında görevli pacemaker hücreler oldukları düşünülmüştür. Sir Arthur Keith'in yapmış olduğu çalışmalarda Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin intestinal kas tabakalarında pacemaker sistemi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (172). Literatür taramalarında Cajal'ın interstisiyel hücreleri araştırmalarının yıllar içinde farklı türlerde ve farklı organlarda olduğu görülmektedir. Cajal'ın interstisiyel hücreleri hakkındaki tartışmalar ve çelişkili sonuçlar bu hücrelerin özelliklerini gösteren spesifik boyama metodlarının eksikliğinden kaynaklanmaktaydı. Modern fiksasyon metodlarının bulunup kullanılmaya başlandığı 1960'lı yıllarda sitoplazmik yapı yeterince korunmaya başlanmış ve böylece aralarında Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin de bulunduğu zor tespit edilen hücrelerin ultrayapısı belirlenmeye başlamıştır. Yamamoto, 1977 yılında gap-junctionların Cajal'ın interstisiyel hücrelerini düz kas hücrelerine bağladığını gösteren çalışmalar yapmıştır (173). Thuneberg, 1982 yılında variköz sinir uçları ile sıçanların ince barsak Cajal'ın interstisiyel hücreleri arasında çok yakın bağlantılar gözlemlemiştir (174). Ohkawa 1983 yılında kobay prostatında spontan elektriksel aktivite olduğunu saptamış ve daha sonra 2002 yılında Exintaris ve arkadaşları kobay prostatında düz kas stroması ile glandüler tabaka arasında c-kit pozitif immünoreaktif hücrelerin olduğunu, bu hücrelerin prostat düz kası ve akson demetleriyle yakın ilişkide olduğunu, yavaş dalgalı spontan elektriksel aktivitenin tetikleyici pacemaker hücreleri olabileceklerini ve glandüler sekresyonun asiner hücrelerden prostatın major ve minor kanallarına ve buradan da üretraya transportundan sorumlu olabileceklerini düşünmüşlerdir (5, 175). Benzer tetikleyici pacemaker hücreler tavşan üretrasında da gösterilmiştir (7). Cajal'ın interstisiyel hücreleri ilk önce standart

histokimyasal tekniklerle sinir hücrelerini tanımlamak için kullanılan yöntemlerle tanımlanmıştır. Son 10 yılda elektron mikroskopik incelemelerin devreye girmesiyle birlikte Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin ultrastrüktürel yapısı daha iyi anlaşılmıştır (176). Son yıllarda üriner sistemde Cajal benzeri hücrelerin gösterilmesi ve bu sistemdeki fonksiyonlarının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

2.3.2.Terminoloji

Cajal hücrelerine interstisiyel hücreler adı verilmesinin nedeni gastrointestinal sistemin her bir düzeyinde çeşitli lokalizasyonlarda bulunan farklı hücre grupları olmalarındandır (173). Gastrointestinal sistem dışındaki dokularda yeni tanımlandığından benimsenmesi gereken doğru terminoloji hakkında çok fazla tartışma bulunmaktadır. Literatürde bu interstisiyel hücreler Cajal hücreleri, Cajal benzeri hücreler veya miyofibroblast olarak adlandırılmaktadır. Ancak 2007 Temmuz'da İrlanda'da yapılan "Vth International Symposium on Interstitial Cells of Cajal"da alınan karar doğrultusunda bu hücrelerin Cajal'ın interstisiyel hücreleri olarak ifade edilmesi konusunda ortak görüş bildirilmiştir (177). Bu terminoloji mesane, üretra, üreter, renal pelvis ve diğer genitoüriner dokuları ve kan damarlarını içeren birçok farklı dokuda bulunan Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin fizyolojik, morfolojik ve ultrastrüktürel özelliklerine sahip hücre ailesini tanımlamaktadır.

2.3.3.Embriyolojik Orjinleri

Cajal'ın interstisiyel hücreleri uzun yıllar önce tanımlanmalarına rağmen embriyolojik orjinleri yıllarca belirsizliğini korumuştur. Çünkü Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin bazı özellikleri nöral krest'e (glial hücreler ve nöronlar) benzerken, bazı özellikleri ise mezenkimal orjinli hücrelere (fibroblast ve düz kas hücreleri) benzemektedir (178). Young tarafından fare embriyolarının intestinal segmentlerinde yapılan çalışmada tüm interstisiyel hücrelerin nöral krestten kaynaklanmayıp aynı mezenkimal hücrelerden köken aldığı gösterilmiştir (179).

2.3.4.Yapıları

Cajal'ın interstisiyel hücreleri, tavşan barsaklarında metilen mavisi ile boyanmış ve bu hücrelerin myenterik pleksusla ilişkili oldukları gösterilmiştir (171). Ramon Y. Cajal, bu hücreleri sempatik sinirlerin terminal bölümlerinden gelen iletiyi düz kas hücrelerine taşıyan primitif sinir hücreleri şeklinde tariflemiştir. Farklı araştırmacılar ilerleyen yıllarda Cajal'ın kendi adıyla anılacak olan bu hücrelerin nöron, Schwann hücresi, bağ doku hücresi veya düz kas hücresi olabileceğini iddia etmişlerdir. Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin araştırılmasında devrim yaratacak olay, Thuneberg'in 1982 yılında bu hücrelerin intestinal bölgede, kalpte bulunan pacemaker hücrelere benzer fonksiyonlara sahip olabilecekleri hipotezini ortaya atmasıyla olmuştur (174). Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin tirozin kinaz olan c-kit'i ekspresse ettiklerinin bulunması ve buna yönelik boyamanın başlaması Cajal'ın interstisiyel hücreleri açısından diğer bir önemli gelişmedir. Deneysel c-kit blokajı yapılması ve üretilmesinde meydana gelen genetik defektlere bağlı Cajal'ın interstisiyel hücrelerinde anormal gelişmenin gözlenmesi, ışık mikroskopisi düzeyinde belirleyici olarak kabul edilmiştir. Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin hücre duvarlarında c-kit reseptör bulundurması (CD117) gastrointestinal sistemde immünohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle interstisiyel hücre araştırmalarına hız katmıştır.

Fare, sıçan ve Gine domuz barsaklarının farklı noktalarından alınan doku örneklerinin elektron mikroskobu ile incelenip, bu bulguların farklı türler ve insanlarla karşılaştırıldığı literatürdeki en önemli kaynaklardan biri Komuro ve arkadaşlarının 1999 yılında yayımlanan çalışmasıdır. Bu çalışmada sıçan mide korpusu ve pilorunda sirküler kas tabakasında sıklıkla tespit edilen c-kit pozitif hücrelerin yoğun boyanan sitoplazmaları ve bol miktarda mitokondrileri olduğu görülmüştür (180). Ayrıca golgi aparatı, kaba ve düz endoplazmik retikulumları olduğu da izlenmiştir. Özellikle değişik yönlerde doğru uzanan sitoplazmik uzantılarında daha fazla olmak üzere, çok sayıda intermediate filamanları mevcuttur. Bazen silya, bazal cisimcikler ve lipid damlacıklarının da olabileceği tespit edilmiştir. Açıkça tanımlanabilen bazal laminaları yoktur. Bunun yanında hücre membranında çok sayıda kaveolalar görülmektedir. Bu hücrelerin birbirleri ve komşu düz kas hücreleri ile oldukça fazla sayıda gap junctionlar vasıtasıyla temas ettikleri görülmüştür. Sirküler kas tabakasında yer alan interstisiyel hücrelerin sinaptik vezikül içeren komşu sinir sonlanmaları ile yakın ilişkileri vardır. Benzer özellikler fare pilorunda ve Gine domuzu midesinde de gözlenmektedir. Myenterik pleksusta yer alan interstisiyel hücreler, daha silik boyanan sitoplazmaları olan fibroblast benzeri hücrelerden dilate

sisternalar içeren iyi gelişmiş kaba endoplazmik retikulumları sayesinde ayrılmaktadırlar. İntersitisiyel hücrelerin sitoplazmik uzantılarında mikrotübül, mikrofilaman ve intermediate filaman gibi sitoskeletal elemanlar fazla miktarlarda bulunmaktayken miyozin filamanlar bulunmamaktadır. Gine domuzu derin musküler tabakasında yer alan büyük gap junction yapan hücreler glikojenden zengin ve glikojenden fakir olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Her iki hücre tipinin de hücre membranında fazla sayıda kaveola, sitoplazmalarında bol miktarda mitokondri, golgi cisimciği, kaba endoplazmik retikulum ve yüzeyel sisterna bulunmaktadır. Bununla birlikte glikojenden zengin hücrelerin yuvarlak hücre gövdesi ve birbirleri ile geniş açılı bağlantıları varken, glikojenden fakir hücrelerin ince uzun hücre gövdeleri vardır. İntersitisiyel hücreler kolonda ise submukozal ve myenterik bölgede yer almaktadır. Submukozal bölgede yer alan interstisiyel hücrelerin bazal laminaları ve kaveolaları vardır (180).

2.3.5.Ayırıcı Tanı

Bu hücreler bir yüzyıl boyunca nöronlar, glial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve makrofajlar ile karıştırılmışlardır. Kendilerine özgü ultrayapısal özellikleri, Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin hem fibroblastlardan hem de düz kas benzeri myoid hücrelerden ayırdedilmesinde oldukça yardımcıdır (181). Farklı tiplerdeki interstisiyel hücrelerin bazal lamina, kaveola, yüzeyel sisternalar ve gap junctionlar gibi düz kas hücre karakteristik özelliklerini göstermelerinden dolayı bazı araştırmacılar tarafından özelleşmiş veya modifiye düz kas hücreleri oldukları kabul edilmektedir. Ancak interstisiyel hücrelerin kas hücrelerinde olduğu gibi iyi düzenlenmiş kontraktıl elemanları yoktur. Fibroblast benzeri hücrelerden büyük gap junctionları, fazla miktarda intermediate filamanları ve mitokondirileri, düzleşmiş sisternaları olan kaba endoplazmik retikulumları, iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulumları ve karakteristik yoğun boyanan sitoplazmaları olması ile ayrılırlar. İntersitisiyel hücreler ince uzun sitoplazmik uzantılar içermesi nedeniyle sinir hücrelerine benzemektedirler. Ancak bu uzantıların nörofilamanlar içermedikleri, yerine fazla miktarda vimentin filamanlar içerdiği bilinmektedir (180). Ayırıcı tanıda transmission-elektron mikroskopisi yol göstericidir. Bazal lamina, sitoplazmik boşluklar, membranla ilişkili yoğun bantlar, sitoplazmik yoğun cisimcikler, bol miktarda düz endoplazmik retikulum ve mitokondrilerinin bulunması Cajal hücrelerinin elektron mikroskobu tarafından ayırdedilebilen myoid sitolojik özellikleridir. Bununla

birlikte granüler endoplazmik retikulumun orta derecede dilate olmuş sisternaları ve iyi gelişmiş sekretuvar aparatının olması ise fibroblast benzeri özelliklerini oluşturur (181). Makrofajlar; elektron mikroskobu sayesinde yüzeyel kompleks invajinasyonlarının olması ve karakteristik vezikül özellikleri nedeniyle Cajal benzeri hücrelerden ve fibroblastlardan kolayca ayırt edilebilir (181). Cajal'ın interstisiyel hücreleri, sayılan tüm bu hücrelerden başka nöronlardan, glial hücrelerden, endotelyal hücrelerden, eozinofillerden ve bazen de lenfosit ve plazma hücrelerinden de ayırdedilmelidir.

Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin c-kit antikoru ile pozitif boyanma özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. C-kit antikoru (anti-c-kit), Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin sitoplazmik membranında bulunan c-kit reseptörlerine immünohistokimyasal metodlarla bağlanarak pozitif boyanma özelliği gösterirler. C-kit aynı zamanda tirozin kinaz sinyal iletilişi yolunu aktive eden bir protoonkogen'dir (11). C-kit + hücreler sadece Cajal hücreleri değildir, mast hücreleri de c-kit + boyanma özelliğine sahiptir, ancak mast hücreleri daha çok mukoza ve submukoza yerleşimlidir (182). Cajal'ın interstisiyel hücreleri histokimyasal olarak alcian mavisi (pH= 0.5) ve toluidin mavisi kullanılarak ya da immünohistokimyasal olarak triptaz boyaları ile mast hücrelerinden ayırt edilebilirler (183). Cajal hücreleri immünoreaktivite yöntemiyle belirlenen myozin ve aktin gibi düz kas hücreleri ile ortak özelliklere sahiptir ancak düz kas hücrelerinden farklı olarak Cajal hücrelerinde kontraktil filamanlar daha azdır ve saptanabilir düzeyde desmin salgıladıkları gösterilememiştir (184).

2.3.6.Saptama Yöntemleri

Cajal hücrelerinin saptanmasında kullanılan histolojik yöntemler

1. *Metilen mavisi*: Boyanmış hücrelere çok az zarar veren gerçek vital bir boyadır ve deney hayvanlarında Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin subgruplarının saptanmasında kullanılmıştır (174). Metodun Cajal'ın interstisiyel hücreleri için selektivitesi tamamen doku bütünlüğünün korunmasına bağlıdır. Ayrıca, metilen mavisinin oksijen tüketimini arttırması yüzünden doku bütünlüğünün korunması ve boyanın diffüzyon problemine yol açması bu metodun karşılaşılan diğer problemleridir (185).

2. *Osmik asit / Çinko İyodür*: Osmik asit / çinko iyodür karışımı temas ettiği tüm hücreleri hızla öldürerek boyar. Çinko iyodür metodunda ve çinko iyodür içeren bir grup vital / supravital metodlar Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin ve sinirlerin selektif boyanmasına neden olur. Fakat aldehit fiksasyonu bu metodun selektivitesini tamamen bozar. Bunun ötesinde, çinko iyodür metodu temelde oldukça kaba bir yöntemdir ve selektivitesi kontrolsüz durumlara bağlı değişebilir (186).
3. *Lipofilik Karbosiyanin Boyası*: Metilen mavisinden daha az fotosensitiviteye sahip bir vital boyadır. Düşük hücre toksisitesi vardır. Fare kolonunda bu boyanın hücrelere bağlanması sonucunda transmission-elektron mikroskopisi ile Cajal'ın interstisiyel hücreleri gösterilmiştir (187).
4. *Rhodamine 123*: Bu boya, çeşitli hücre tiplerinde mitokondrinin boyanmasında kullanılır. Ward ve arkadaşları Rhodamine 123 ile köpek kolonunda düz kas ile birlikte Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin subgrubunu göstermişlerdir (188).

Cajal hücrelerinin saptanmasında kullanılan histokimyasal yöntemler

1. *Diaforezis ve nitrik oksit sentaz*: Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin tanımlanmasında bu histokimyasal yöntem ile sitoplazmada elektron yoğun birikimler transmission-elektron mikroskopisi kullanılarak gösterilmiştir (189).
2. *Manganez süperoksit dismutaz*: Fang ve Christensen 1995 yılında, rat kolonunda Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin subgrubunda NADH-diaforez aktivitesi göstermişlerdir (190).
3. *Hem oksijenaz 2*: Geçmiş çalışmalarda fare ince barsağında Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin subgrupları bu yöntem ile saptanmıştır. Ayrıca vücudun diğer sistemlerinde de hem oksijenaz 2 enzimi ile pozitif reaksiyon veren nöral hücreler de saptanmıştır (191).

Cajal hücrelerinin saptanmasında kullanılan immünometodlar

1. *Vimentin*: Vimentin kemirgen ince barsağında ve köpek kolonunda Cajal'ın interstisiyel hücrelerini işaretlemeye kullanılmıştır (192). Fakat fibroblastların da vimentin ile + boyanabilecekleri unutulmamalıdır.

2. *C-kit (CD 117 reseptör proteini)*: Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin yüzeyinde tanımlanan ve büyüme faktörü reseptörü olan bir protoonkogendir. Transmembran proteini olan c-kit eksternal ligant bağlayıcı komponent ile sitoplazmik tirozin kinaz komponentlerinden oluşmuştur. Tirozin kinazın aktive olması ile hücre uyarılır (11). C-kit, Cajal'ın interstisiyel hücreleri ağının yapısı ve dağılımını belirleyen basit ve güvenilir bir immünometottur. Maeda ve arkadaşları tarafından 1992 yılında c-kit antikoru yardımı ile Cajal hücrelerinin gösterilmesinden sonra bu hücreler ile ilgili yapılan araştırmalar ivme kazanmıştır (11). C-kit pozitif hücreler önce gastrointestinal sistemin düz kas hücrelerinde tespit edilmiştir. Cajal'ın interstisiyel hücreleri ile sıkça karışan fibroblastlar ve düz kas hücreleri c-kit negatiftir (193). Torihasi ve arkadaşları kit immünoreaktif hücrelerin elektriksel aktivitelerini ilk defa fare barsağının dış tabakasında tespit etmişlerdir (192). Son yıllarda yapılan birçok çalışmada Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin saptanması için c-kit antikoru kullanılmıştır.
3. *Siklik GMP*: Elektriksel stimülasyon sonucunda nitrik oksidin uyarılması siklik GMP'de artışa yol açar ve bununla beraber Cajal'ın interstisiyel hücreleri görüntülenir. Yalnızca Cajal'ın interstisiyel hücreleri ile birlikte düz kas tabakalarının da görüntülediği unutulmamalıdır (194).
4. *CD 34*: Fibroblast benzeri hücreler, bazı stromal ve endotelial hücrelerde de bulunabilen bu hematopoietik hücre antijeni ile Cajal'ın interstisiyel hücreleri pozitif boyanma özelliğine sahiptir (195).

2.3.7. Cajal'ın İntersitisiyel Hücrelerinin Patolojik Bulgular ile İlişkileri

Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin patolojik durumlar ile ilişkisi, en çok gastrointestinal sistem motilite bozukluğu ile ilgili olan hastalıklarda ve stromal tümörlerde araştırılmıştır. Patolojik dokularda Cajal'ın interstisiyel hücreleri ilk defa 1977 yılında Cortesini tarafından elektron mikroskobu kullanılarak insan distal özefagusunda, Akalazyada gösterilmiştir (196). Akalazyada Cajal'ın interstisiyel hücreleri organellerinin azaldığı ve Cajal hücre şebekelerinin açıkça kesintiye uğradığı ve sinir sonlanmalarının azalmasının da motilite bozukluğuna katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Rumessen 1996 yılında ülseratif kolitli hastalarda elektron mikroskobu kullanarak yaptığı

bir çalışmada Cajal'ın interstisiyel hücrelerinde lipofusik cisimlerin artışı ve ultrayapısal değişikliklerin olduğunu göstermiştir (197). Langer tarafından yapılan bir çalışmada infantil hipertrofik pilor stenozunda immatür bir ultrastrüktürel yapının olduğu saptanmıştır (198). Hirschsprung hastalığında ve bazı neonatal psödoobstrüksiyonlu vakalarda da Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin anormal dağılımı gösterilmiştir (199, 200).

Patolojik durumlar ile Cajal hücreleri arasındaki ilişkilerin tespitinde son yıllarda c-kit kullanılmaktadır (11). Yapılan çalışmalarda c-kit + hücrelerin azaldığı ve/veya hücrelerin dağılımı ile ilgili patolojik durumun olabileceği ileri sürülmüştür. Motilite değişikliklerinde Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin ultrayapısının ve patolojik değişikliklerinin değerlendirilmesi önerilmektedir.

2.3.8. Üriner Sistemde Cajal Benzeri Hücreler

Cajal benzeri hücrelerin yapısı, fonksiyonu, patolojik durumlarla ilişkisi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu hücreler ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu her ne kadar gastrointestinal sistemde yapılmış olsa da son yıllarda artan bir hızla üriner sistem çalışmalarına da rastlamaktayız. Cajal benzeri hücrelerin renal pelvis, üreter, mesane ve üretradaki morfolojik ve fizyolojik özelliklerinin keşfi, bu dokuların hücresel etkileşimine dair yeni bilgiler sağlayacağı gibi üriner sistem hastalıklarının tedavilerinde de yeni gelişmelere imkan sağlayacaktır.

Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin barsakta pacemaker görev üstlendikleri kanıtlanmıştır. Bu durum doğal olarak spontan aktivite özelliğine sahip diğer düz kasların benzer hücreler içerebileceğine dair şüphelere neden olmuştur. Dolayısıyla bir başka dokuda saptanan benzer hücrelerin de benzer rol oynadıklarını düşünmek hayal ürünü olmayacaktır. Mesane dolum süresince, mesaneyi desteklediği düşünülen myojenik, düşük düzeyde, miksiyonu başlatmayan, arka planda spontan kontraksiyonlar gösterilmiştir (201). Lang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada renal pelvisin *in vitro* incelenmesinde, düz kaslarda pacemaker mekanizmanın varlığını gerektiren ritmik aktivite izlenmiştir (202). Ayrıca bir diğer çalışmada ise üretranın tonüs geliştirme yeteneği, üretral düz kasın kontraktilesinin düzenlendiği anlamını akla getirmiştir (203). Üriner sistemde ilk defa Klemm ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kobayların üst üriner sisteminde Cajal benzeri hücreler gösterilmiştir. Çalışmada hücrelerin morfolojik ve elektrofizyolojik

özelliklerinin ortaya konması ile bu hipotez desteklenmiştir. Bu hücrelerin pacemaker aktiviteleri pelvikaliksiyel bileşke ve proksimal renal pelviste membran potansiyeli şeklinde kaydedilmiştir. Ancak distal renal pelvis ve üreterde herhangi bir pacemaker aktivitesine rastlanmamıştır. Cajal benzeri olan bu hücrelerin yüzeyinde c-kit reseptörü saptanmamıştır (204). Bunun sebebinin çalışmanın teknik eksikliğinden dolayı olduğu düşünülmüştür (177).

Üst Üriner Sistemde Cajal Benzeri Hücreler

Üst üriner sistemin idrarı, böbrekten mesaneye iten spontan peristaltik hareket gösterdiği biliniyordu. Bu aktivite, domuzlarda istisnai olmak üzere memelilerin büyük bir çoğunluğunda, renal pelviste baskın olmakla birlikte distal üreter boyunca azalmaktadır (205). Geçtiğimiz birkaç dekat boyunca spontan elektriksel ve mekanik aktiviteyi sürdüren, atipik düz kas hücresi (ASMC) diye adlandırılan özelleşmiş hücrelerden oluşan pacemaker bölgenin varlığı bilinmekteydi (206). Klemm ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bu hücrelerin proksimal renal pelviste yoğun olarak bulundukları ve ultrayapısal olarak düz kas hücrelerinden ayrıldıkları gösterilmiştir (4). Bu çalışmada düz kas hücresinin % 60 kontraktıl filaman içerirken ASMC'nin % 40 oranında içerdiği, ASMC'nin bir hücresel ağı şekillendiren dallı proseslere sahip oldukları ve c-kit için immünpozitif olmadıkları gösterilmiştir. Atipik düz kas hücrelerinin yüksek frekanslı pacemaker özelliği yine bu çalışmada intraselüler mikroeletrot kayıtlarıyla gösterilmiştir (4). Aynı çalışmada, kobay renal pelvisinde olup da üreterde olmayan morfolojik olarak Cajal benzeri hücrelere benzeyen yeni bir hücre tanımlanmıştır (4). Bu hücrelerin fibroblastlardan birçok kaveolaları ve inkomplet bazal laminaları olmasıyla ayrıldıklarını ileri sürmüşlerdir. Atipik düz kas hücrelerine benzer şekilde, Cajal benzeri hücreler birçok prosese sahip olduğu ve düz kas hücreleri ile junctional bağlantı yapmakta olduğu ileri sürülmüştür. Fakat hem ASMC'den hem de düz kas hücresinden kontraktıl filamanların eksikliği ile kolayca ayrılmakta olduğu düşünülmüştür. Kobaylarda yapılan ilk çalışmalarda Cajal benzeri hücreler immünpozitif bulunmazken, daha sonra yapılan çalışmalarda mesane ve üretrada gösterildiği gibi üst üriner sistemde de c-kit + Cajal benzeri hücreler raporlanmaya başlamıştır. Bu gecikmenin c-kit antikor panelinin kullanımına veya belki de türler arası farklılıklara bağlı olduğu sanılmaktadır (177). C-kit + Cajal benzeri hücrelerin üreteropelvik bileşkede, düz kas demetleri arasında ve fare, insan ve diğer memeli türlerinin proksimal üreterinde lamina propriya ve kas tabakasında yerleşimleri

gösterilmiştir (8, 207-209). Tüm bu çalışmalarda tipik olarak Cajal benzeri hücre varlığının, proksimalden distale doğru gittikçe azaldığı rapor edilmiştir.

Alt Üriner Sistemde Cajal Benzeri Hücreler

Mesane: Mesane ürotelyum içeren mukoza, lamina propriya ve bunların altındaki musküler tabakayı içeren detrusör kasından oluşan bir organdır. Ayrıca lamina propriyanın duysal sinirlere ve bağ dokusuyla desteklenen zengin bir vasküler ağa sahip olduğu da bilinmektedir. Öte yandan detrusörün intramural ganglionlarla zengin inervasyonu da gösterilmiştir. Mesane dolum ve boşaltım fonksiyonunun sinirsel kontrol ve düz kas kontraksiyonlarıyla sağlandığı da yeterli bir şekilde tanımlanmıştır. Kobay ve insan mesanesinde nitrik oksit stimülasyonu sonrasında mesanenin morfolojik görüntülerinde barsaktaki Cajal hücrelerini anımsatan hücreler içerdikleri gösterilmiştir (210, 211). Smet ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada düz kaslarda bulunmayıp Cajal benzeri hücreler ve diğer mezenkimal kökenli hücrelerde tipik olarak bulunan vimentin ve ara filamanlar için immünpozitif boyanan hücre grupları gösterilmiştir ve bu çalışma diğer araştırmacılara mesanenin, Cajal benzeri hücreler içerdiğini düşünmeleri için yol gösterici olmuştur (211). Her ne kadar Cajal benzeri hücreler için selektif olmasa da vimentin antikoru, Cajal benzeri hücreler içeren hücre tiplerini göstermek için önemlidir. McCloskey ve arkadaşları daha sonra kobay mesanesinin gerçekten Cajal benzeri hücreler içerdiğini gösterebilmek için c-kit antikoru kullanmıştır ve bu çalışma daha sonraki birçok çalışmaya yol gösterici rol üstlenmiştir (10). Yapılan iki farklı çalışmada Cajal benzeri hücre grupları c-kit ve vimentin antikoru kullanılarak lamina propriya bölgesinde tanımlanmıştır (212, 213). Bu lamina propriyadaki Cajal benzeri hücreler kendi aralarında bir ağ yapmak için bağlantı oluşturmuşlardır. Lamina propriyadaki Cajal benzeri hücre ağı mukozal sinirler ile yakın ilişkilidir. Bu ilişki c-kit + hücrelerin konfokal görüntülemeye sinirlerle bağlantı yaptığının gösterilmesiyle ve elektron mikroskopik çalışmalarda sinir uçları ile lamina propriyadaki Cajal benzeri hücreler arasında yakın ilişkinin ortaya konmasıyla desteklenmiştir (212, 214). Ost ve arkadaşları Cajal benzeri hücrelerin vanilloid reseptör immünreaktivitesini rapor etmişlerdir (215).

İnsan, fare ve kobay mesanesindeki detrusör bölgesinde Cajal benzeri hücrelerin düzeni, mukozalardakine göre dikkat çekici şekilde farklıdır. Detrusörün 3-D konfokal görüntülemesinde c- kit + Cajal benzeri hücrelerin detrusörün düz kas demetleri sınırında yerleştiği gösterilmiştir (216). Bu hücrelere intramusküler Cajal benzeri hücreler

denmektedir. Yapılan çalışmalara göre ultrayapısal olarak, intramüsküler Cajal benzeri hücrelerin barsaktaki Cajal'ın interstisiyel hücrelerine oldukça benzer özelliklere sahip oldukları bulunmuştur (217, 218). Düz kas demetleri sınırındaki bu uzanmış dallı hücreler bazal laminaya, yaygın düz ve granüllü endoplazmik retikulumlara, golgi komplekslerine, kaveolalara, mitokondrilere, ince ve ara filamanlara ve merkezde yerleşmiş çekirdeklere sahiptirler. Kalın filamanlar ve yoğun cisimciklerinin olmayışıyla düz kas hücresinden, fibroblastların karakteristik özelliği olan dilate düz endoplazmik retikulumlarının olmayışı yanında ve bazal laminalarının olmasıyla da fibroblastlardan ayrılırlar. Detrüsörde aynı zamanda lamina propriyadaki Cajal benzeri hücrelere daha yakın benzerliği olan Cajal benzeri hücre subtipleri mevcuttur ki bu hücreler *interbundle* Cajal benzeri hücreler olarak adlandırılırlar. Bu subtipler c-kit ve vimentin pozitifler ve detrüsör düz kas demetleri arasındaki boşluklarda bulunan her bir subtiplerle bağlantı yaparlar (219). Morfolojik kanıtlar, lamina propriyadaki Cajal benzeri hücrelerin ürotelyumun altında, tahminen ürotelyal hücreler tarafından salınan kimyasal transmitterlere yanıt verebilen bir ağ oluşturdıklarını ve mukozal sinirlerle iletişim kurduklarını, dahası altta yatan detrüsör Cajal benzeri hücre ve/veya düz kasa direkt olarak bilgi naklettiklerini göstermektedir. Alternatif olarak lamina propriyadaki Cajal benzeri hücreler Sui ve arkadaşlarının düşündükleri gibi mesane doluluğunu duyabilen ve mukozal duysal afferentlere bilgi gönderebilen *stretch-sensor* görevi de görebilirler (220).

Üretra: Üretrada yapılan Cajal benzeri hücreler ile ilgili ilk çalışma Smet ve arkadaşları tarafından 1996 yılında yayımlanmış olup, fare ve insan üretrasında immünhistokimyasal yöntemlerle morfolojik olarak Cajal'ın interstisiyel hücrelerine benzeyen hücreler gösterilmiştir (211). Tavşan üretrası düz kasında, intraselüler mikroeletrot yöntemiyle bakılan elektriksel aktivitelerde, barsaktaki Cajal'ın interstisiyel hücreleri tarafından üretilen, yavaş dalgayı anımsatan spontan geçici depolarizasyon dalgalarının varlığı bildirilmiştir (220). Bununla beraber üretranın, Cajal benzeri hücreler içerdiğine dair yeterli kanıt Sergeant ve arkadaşları tarafından tavşan üretrasında yapılan çalışmayla gösterilmiştir. Bu çalışmada tavşan üretrası musküler tabakasında çoğunlukla iğsi, düz kas hücreleri yanında daha az sayıda morfolojik olarak barsaktaki Cajal'ın interstisiyel hücreleri benzeri hücreleri anımsatan dallı, yıldızsı şekilli ve lateral uzantılarla uzamış hücreler gösterilmiştir (7).

Lyons ve arkadaşları anti-c-kit ve anti-vimentin kullanarak Cajal benzeri hücrelerin sirküler ve düz kas tabakaları içine yerleştiklerini ve düz kas hücreleri ile paralel

seyrettiğini göstermişlerdir (222). Dahası üretral Cajal benzeri hücrelerin pacemaker rolleri olabileceği fikriyle tutarlı olarak bu hücrelerin düz kas hücrelerinin en yakınında olduklarına işaret etmişlerdir. Aynı çalışmada c- kit + hücrelerin morfolojik profillerine göre birkaç subtipten bahsedilmiştir. Ancak kesin bir dille üretral Cajal benzeri hücrelerin subtiplerin tanımlandığı çalışma Garcı'a-Pascual ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılmıştır. Bu çalışmaya göre üretra duvarındaki Cajal benzeri hücrelerin subtipleri lamina propria, musküler tabaka ve seroza ile ilişkili Cajal benzeri hücreler şeklindedir (223).

Anti-c-kit ve anti-nörofilaman kullanılarak intramural sinirler ile Cajal benzeri hücreler arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, kasların içine doğru giren sinirlerle, Cajal benzeri hücreler arasındaki yakın ilişki gösterilmiştir. Bu çalışmalarda Cajal benzeri hücrelerin aktivitesinin, bu hücrelerin yakın komşuluğundaki sinir hücreleri tarafından salınan nörotransmitterlerce kontrol edilebileceği düşünülmüştür (222, 223).

Üriner Sistemde Patolojik Durumlar ile Cajal Benzeri Hücreler Arasındaki İlişki

Mesanede bulunan Cajal benzeri hücrelerin farklı subtiplerinin morfolojik ve fizyolojik çalışmaları, bu hücrelerin normal mesane fonksiyonuna katkıda bulunmaya aday olan yeni hücreler olduklarını göstermektedir. Bununla beraber güncel araştırmalar Cajal benzeri hücrelerin mesane dolum ve boşaltımındaki gerçek rollerinin ne olduğunu yeterli düzeyde netleştirebilmiş değildir. Bu hücreler ilk keşfedildiklerinde bazı araştırmacılar Cajal benzeri hücrelerin bir pacemaker görev üstlendiğini, dolum sırasında mesane duvarında spontan aktiviteden ve bu spontan aktivitenin yayılmasından sorumlu olabileceklerini düşünmüşlerdir. Detrüsör ve lamina propriadaki Cajal benzeri hücrelerin her ikisinde de spontan elektriksel aktivite ve Ca^{+2} sinyali yaydıkları gösterilmişken, bu sinyallerin detrüsör düz kasının aktivitesini düzenlemekte rol oynadıklarına dair yeterli kanıt henüz yayımlanmamıştır.

Cajal benzeri hücrelerin c-kit'i eksprese ettikleri keşfi, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kit reseptörünü bloke etmek için Glivec® (imatinib mesylate) kullanımını gündeme getirmiştir. Glivec®, Kronik Myelositer Lösemi ve Gastrointestinal Stromal Tümör tedavisinde tirozin kinaz, PDGF reseptörü, bcr-abl ve c-kit'i hedef alarak kullanılmaktadır. Biers ve arkadaşları Glivec®'in, kobaylarda yapılan sistometrik çalışmalarda mesane kapasitesini, idrar sıklığını ve spontan aktiviteyi azalttığını

göstermişlerdir (224). Bir başka çalışmada ise Glivec®'in izole edilmiş kobay detrüsör dokusunda, spontan elektriksel ve mekanik aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir (225).

Cajal benzeri hücrelerin varlığı ve aktivitesi, patolojik durumlar ile karşılaştırıldığında sağlıklı mesanede daha az öneme sahip gibi görünmektedir. Normal dokuya oranla aşırı aktif mesane örneklerinde, c- kit + Cajal benzeri hücrelerin artmış sayıları ve ilginç olarak Glivec®'in detrüsör kontraksiyonlarına önemli inhibitör etkileri de gösterilmiştir (224). Öte yandan Kubota ve arkadaşları eksternal obstrüksiyon sonrasında kobay mesanesinde Cajal benzeri hücrelerin sayısındaki artışa değinmişlerdir (217). Normal erişkin farelerle kıyaslandığında, spinal kord hasarlanması sonrası, farelerin mesane lamina propriyasında artmış connexin 43 ekspresyonu spontan aktivitenin artmış kordinasyonu ile ilişkili bulunmuştur (226). Dahası Glivec®'in, spinal kord hasarı yapılan farelerin mesanesinde gelişmiş spontan kontraksiyonlarda inhibitör etkisi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha belirgin bulunmuştur (227). Roosen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada aşırı aktif mesanede immünohistokimyasal boyama ile lamina propriyada Cajal benzeri hücre sayıları kısmen artarken, connexin-43 ekspresyonunun daha çok arttığını göstermişlerdir. Bu artışı, gap junction sayılarının artmasına bağlamışlardır (228). Piaseczna Piotrowska ve arkadaşları normal mesane ile megasistis-mikrokolon intestinal hipoperistalsis sendromlu hastaların mesanelerinden alınan örneklerde Cajal benzeri hücrelerin varlığını kıyaslamışlar ve sendromik hastalarda Cajal benzeri hücrelerin olmadığını göstermişlerdir (229). Sendromik mesanelerin flask, non-obstrüktif ve disfonksiyone olması, obstrüktif aşırı aktif mesanede Cajal benzeri hücre sayılarının arttığı bulgusunu desteklemektedir.

Üretra ile ilgili yapılan bir çalışmada tavşan üretrasında hem Cajal benzeri hücrelerde hem de düz kas hücrelerinde frekansı ve süresi mesaneden farklı olan spontan Ca sinyali kayıt edilmiştir (230). Bu sinyal Cajal benzeri hücrelerde dakikada 3 kez tekrarlarlarken, düz kas hücresi için bu frekans değişiklik göstermektedir. Bu tablo her ne kadar Cajal benzeri hücrelerin pacemaker hücre olduğu hipotezini desteklemese de bazı yazarlar Cajal benzeri hücrelerin başıboş bir pacemaker gibi davrandığını, optimum düzeyde aktivitesini sürdürerek, uygun üretral tonüsü üretmek için düz kasa multipl random depolarizan girişler yaptığını öne sürmüşlerdir. Üretral Cajal benzeri hücrelerin fonksiyonunu anlamada en önemli ve kısıtlayıcı faktör, normal insan üretral dokusunun sınırlı kullanılabilirliği olmasına karşın van der Aa ve arkadaşları insan üretrasında, Cajal benzeri hücrelere benzeyen c-kit + hücrelerin varlığını göstermişlerdir (231). Üretral düz

kas tonüsünün üriner kontinansa verdiği destek bilinmektedir. Cajal benzeri hücrelerin aktivitesi gerçekten üretral düz kas tonüsünü regüle ediliyorsa, araştırmacılar alt üriner sistem semptomlarının varlığını, üretral Cajal benzeri hücrelerin fonksiyonuna ya da sayısına dayandırılabilceğı düşüncesindedirler.

Üst üriner sistem ile ilgili patolojik durumlara göz atacak olursak bu alanda ilk göze çarpan çalışma Solari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada üreteropelvik bölge darlığı olan ve olmayan vakaların kas tabakalarında c-kit pozitif hücrelerin ekspresyonu incelenmiştir. Çalışmada sirküler kas tabakasının iç katmanında yer alan Cajal benzeri hücrelerin kas fiberlerine paralel yerleşimde oldukları görülmüştür. Bu hücrelerin sadece kas tabakasında oldukları ve kontrol grubunda üreteropelvik bölgede oldukça fazla c-kit pozitif hücre görülmesine karşın üreteropelvik bölge darlığı olanlarda bu hücrelerin seyrek olduğu veya olmadığı bulunmuştur (8). Eken'in 2009 yılında yaptığı çalışmada, üreteropelvik bölge darlığı nedeniyle dismembered pyeloplasti yapılan olgular CD117 kullanılarak immünohistokimyasal yöntemle incelenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında darlığı olan vakalarda üreteropelvik bileşke bölgesinde sirküler kas tabakasına yakın ve kas liflerine paralel seyreden, iğsi yapıda ve dentritik uzantıları kas lifleri arasına doğru giren c-kit pozitif boyanan interstisiyel Cajal benzeri hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunmuştur (232). Kuzgunbay'ın çalışmasında ise distal üreter ligasyonu yapılan sıçanlarda üreteropelvik bölgede Cajal benzeri hücrelerinin sayı ve morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler değerlendirilmiş ve ligasyon yapılan grup ile kontrol ve sham grubu karşılaştırıldığında, Cajal benzeri hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmış ve geç dönemde hücre sayıları azalmıştır. Cajal benzeri hücrelerde başlangıçta meydana gelen artışın, ilerleyen dönemlerde azalmasının nedenini peristaltik aktivitedeki azalma olarak yorumlanmıştır (233). Bu çalışmanın devamı niteliğindeki bir diğer çalışmada hidronefrotik nonfonksiyone böbrek nedeni ile nefrektomi yapılan olgular kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve çalışma grubunda renal pelvis ve proksimal üreterlerde lamina propria ve muskularis propria katmanlarında CD117 ile pozitif boyanan Cajal benzeri hücrelerin sayısında anlamlı azalma saptanmıştır. Bu sonuca göre obstrüksiyon sonrası kronik süreçte peristaltizmin kaybı ile beraber Cajal benzeri hücrelerin sayılarının azaldığı düşünülmüştür (234). Sonuç olarak bu iki çalışmada birbirini destekler niteliktedir ve Cajal benzeri hücrelerin peristaltizim ile yakın ilişkili olabileceklerini göstermektedir.

Arena ve arkadaşlarının 2007’de primer obstrüktif megaüreteri olan 8 vaka ile yaptıkları bir çalışmada, obstrüksiyonun proksimalinde kalan dilate segmentlerde longitudinal ve sirküler kas tabakalarında c-kit pozitif boyanan interstisiyel hücre dağılımlarının normal olduğu ancak dar segmentlerde belirgin şekilde düz kas hipoplazisi ve az sayıda ya da hiç interstisiyel hücre olmadığı tespit edilmiştir. Longitudinal kas tabakasında Cajal benzeri hücrelerin yokluğu, c- kit pozitif embriyolojik kas hücre prekürsörlerinin yokluğu ile açıklanmıştır (235).

Testis ve Cajal Benzeri Hücreler

Testiküler histoloji genellikle tübüler, peritübüler ve intertübüler veya interstisiyel kompartmanlar olarak ele alınır. Her bir kompartmanın hücresel içeriği ve fonksiyonu farklıdır. Kabaca tübüler kompartmanda Sertoli hücresi ve germinal hücreler, peritübüler kompartmanda ise myoid hücreler bulunmaktadır. Peritübüler kompartmanda myoid hücreler androjen bağımlıdır, seminifer tübülleri kuşatırlar ve bazal lamina komponentlerini sekrete ederler (236). Bu kontraktil özellikli peritübüler myoid hücreler seminifer tübüllerin motilitesini regüle edebilmektedirler. İnterstisiyel alanda ise Leydig hücresi ve arterioller bulunmaktadır.

Ullrich ve arkadaşları testiste c-kit membran reseptörünün, hücrelerin proliferasyonu ve apoptozisini düzenlediğini, hücre migrasyonu ile ilgisi olduğunu düşünerek embriyofetal-immatür testiste, somatik hücreler (Sertoli ve Leydig) ve germinal hücreler (spermatogonyum tip A ve tip B) tarafından bu reseptörün eksprese edildiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, germ hücre oluşum evresinde bazı mayotik evrelerde tamamlanmamış c-kit protein tanımlanmıştır (12). Yapılmış bir diğer çalışmada ise prostat kanserli ve orşiektomi yapılmış 10 hastanın testislerinde yapılan incelemede interstisiyel alanda c-kit’e karşı sitoplazmalarında ve peri-nükleer alanlarında güçlü immün reaksiyon gösteren, belirgin nükleuslu ve çekirdekleri belirgin kırmızımsı halo ile çevrili Cajal benzeri hücreler tanımlanmıştır. Bu hücrelerin seminifer tübüllerin periferine yakın, peritübüler hücreler ile yakın temasta ve Leydig hücre gruplarından ayrı şekilde lokalize olduklarını gösterilmiştir. Tübüler ve peritübüler alanlar ise c-kit reaksiyonu açısından negatif olarak bulunmuştur (13). Yine aynı çalışmada, testisin enine kesitlerinde komşu seminifer tübüllerde farklı evrelerde germinal hücrelerin görüldüğünden ve kompleks bir hücresel ilişkiden bahsedilmektedir. Bu kompleks hücresel ilişkilerin intestinal sistemde bulunduğu gibi c-kit + hücrelerle iyi regüle edilebileceği düşünülmüştür. Bu sebepten

dolayı seminifer tübüllerin kontraktilitesi ve intertübüler sıvının yer değiştirmesinin c-kit pozitif hücrelerin aktivitesi vasıtasıyla düzenleniyor olabileceği düşüncesi gündeme gelmektedir. Rothschild ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise c-kit + hücrelerin tübüler motiliteyi regüle ettiği, seminifer epitelyumda proliferasyonu ve apoptozisi düzenlediği  ne sürülmektedir (14).

Normal testis gelişimi primordial germinal hücrelerin gelişimine ve Sertoli hücre prek rs rlere bağlıdır. Tüm bu olayların protein kinaz III tarafından kodlanan protoonkogen c-kit'in ekspresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (237). Genel olarak testiste Cajal benzeri hücreler ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; motilite, sekresyon ve hücre çoğalmasının c-kit regülasyonunun kontrolü altında olabileceği düşünülmüştür. Bu regülasyonun da erişkin erkek fertilitelerini düzenleyebileceği  ne sürülmüştür (238, 239).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Ocak 2004 - Aralık 2011 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Üroloji Bölümünde NOA nedeniyle TESE yapılan 644 olgu içerisinde 99 olgu çalışma grubu olarak, normal spermatogeneze sahip olduğu düşünülen ve obstrüktif azoospermi nedeniyle TESE yapılan 104 olgu içerisinde 20 olgu da kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Çalışma grubundaki olgular testis biyopsilerinde hipospermatogenez, matürasyon arresti, sertoli cell only sendromu, atrofi ve fibrozis saptanan 99 hastadan oluşmaktaydı (hipospermatogenez grubunda 19, matürasyon arresti grubunda 40, SCOS grubunda 20 ve testiküler atrofi ve fibrozis grubunda 20 hasta). Olguların testis biyopsilerinden elde edilen örneklerin peritübüler ve perivasküler alanlarındaki Cajal benzeri hücre sayılarının saptanması için immünohistokimyasal yöntemle CD117 boyaması gerçekleştirildi.

Histopatolojik inceleme: Her olguya ait parafin bloklardan 5 mikronluk kesitler hazırlandı ve kesitler polilizinli lamlara alındı. İmmünohistokimyasal çalışma protokolü şu sırayla uygulandı.

- 1) Polilizinli lama alınan örnekler 75°C sıcaklıkta etüvde 20 dakika bekletildikten sonra 5'er dakika iki farklı ksilen ve 5'er dakika iki farklı alkol içerisinde olmak üzere toplamda 20 dakika oda sıcaklığında bekletilerek deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu.
- 2) Bol distile su ile yıkandı.
- 3) PT Link Dako cihazında 95°C sıcaklıkta 20 dakika antijen retrieval ve endojen peroksit uzaklaştırma işlemleri yapıldı.
- 4) Yıkama buffer solüsyonunda 20 dakika tamponlandı (soğuma ve tamponlama için).
- 5) Autostainer Link 48 cihazında çalışmaya alındı (Cihaz peroksidaz blok, inkübasyon, HRP kit, Kromojen DAB ve hematıksilen boyanama aşamalarını gerçekleştirmektedir). Bu aşamalar sırasıyla:
 - i. Yıkama buffer solüsyonu
 - ii. Yıkama buffer solüsyonu
 - iii. Endojen Enzime Blok- Envision Plex Peroksidase Blocking, 5 dakika

- iv. Yıkama buffer solüsyonu
- v. Primer antikor uygulaması (CD117, C-kit, Code A4502, 1/1500 dilüsyon, DAKO, DENMARK), 25 dakika
- vi. Yıkama buffer solüsyonu
- vii. Labelled polymer, En Vision Flex/ HRP (Code K8000, DAKO, DENMARK), 20 dakika
- viii. Yıkama buffer solüsyonu
- ix. Yıkama buffer solüsyonu
- x. Substrate DAB Chromogen, Substrate Working Solution (Mix) (Code SM803, DAKO, DENMARK), 10 dakika
- xi. Yıkama buffer solüsyonu
- xii. Contrstain-Envision Flex Hematoxylin (Code SM806 DAKO, DENMARK), 5 dakika
- xiii. Deiyonize su
- xiv. Yıkama buffer solüsyonu
- xv. Deiyonize su

6) Dokuların üzeri Aqueous- Mont (Scy Tek, Ref: AML090) damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Örnekler ışık mikroskopunda incelendi. Kullanılan kromojen nedeniyle kahverengi boyanma pozitif kabul edildi. Işık mikroskopik incelemede Olympus BX51 mikroskop kullanıldı. Bir büyük büyütme alanı $0,88 \text{ mm}^2$ olarak hesaplandı ve toplam 4 büyük büyütme alanında (toplam $3,5 \text{ mm}^2$ 'lik bir alanda) peritübüler ve perivasküler CD117 pozitif Cajal benzeri hücreler sayıldı. Ardından elde edilen Cajal benzeri hücre sayıları 3.5 ile bölünerek 1 mm^2 'ye düşen ortalama Cajal benzeri hücre sayıları hesaplandı.

İstatistiksel Analiz: Veriler SPSS 17 paket programında değerlendirilmiştir. Öncelikle sürekli değerlerin tanımlayıcı istatistikleri yaş için ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde; hücre sayıları ise ortanca (minumum – maksimum) biçiminde ifade edildi. Veri analizi yapılırken öncelikle parametrik testlerin önşartları (normallik ve varyansların homojenliği) kontrol edilmiştir. Önşartların sağlanmadığı belirlenmiştir. Bu sebeple bağımsız 3 grup değişkenler (toplam, perivasküler ve peritübüler hücre sayıları) için Kruskal Wallis testleri kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Dunn testi kullanılmıştır. Birinci tip hata 0.05’de sabit tutulmuştur ($\alpha= 0.05$).



4.BULGULAR

Normal spermatogenez olan kontrol grubundaki olguların yaş ortalaması 34.35 yıl (26–44 yıl) iken, çalışma grubundaki NOA’lı hastaların yaş ortalaması 34.22 yıl (19-65 yıl) idi. Mikroskopik incelemede Cajal benzeri hücreler immünhistokimyasal boyamada kullanılan kromojen nedeniyle kahverengi renkte göründüler. Anti c-kit ile boyanan bu hücreler radyal olarak dallanma içeren uzantılar içermekte idi. İnteristisiyumda yerleşen Cajal benzeri hücrelerin c-kit ekspresyonu yaptığını bildiğimiz mast hücrelerinden ayırt edilmesi için aynı kesitlerin toluidin boyası ile karşılaştırılmalı incelemeleri yapıldı. Mast hücrelerinin morfolojik olarak yuvarlak oval şekli ve metakromatik granüler sitoplazmaları ile mavi-mor renkte boyanarak farklı bir görünüme sahip oldukları görüldü. Bu granüllerin proteoglikanlar içerdikleri ve bunların da histamin ve heparine bağlandıkları bilinmektedir. Cajal benzeri hücre sayılarının gruplara göre dağılımı Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

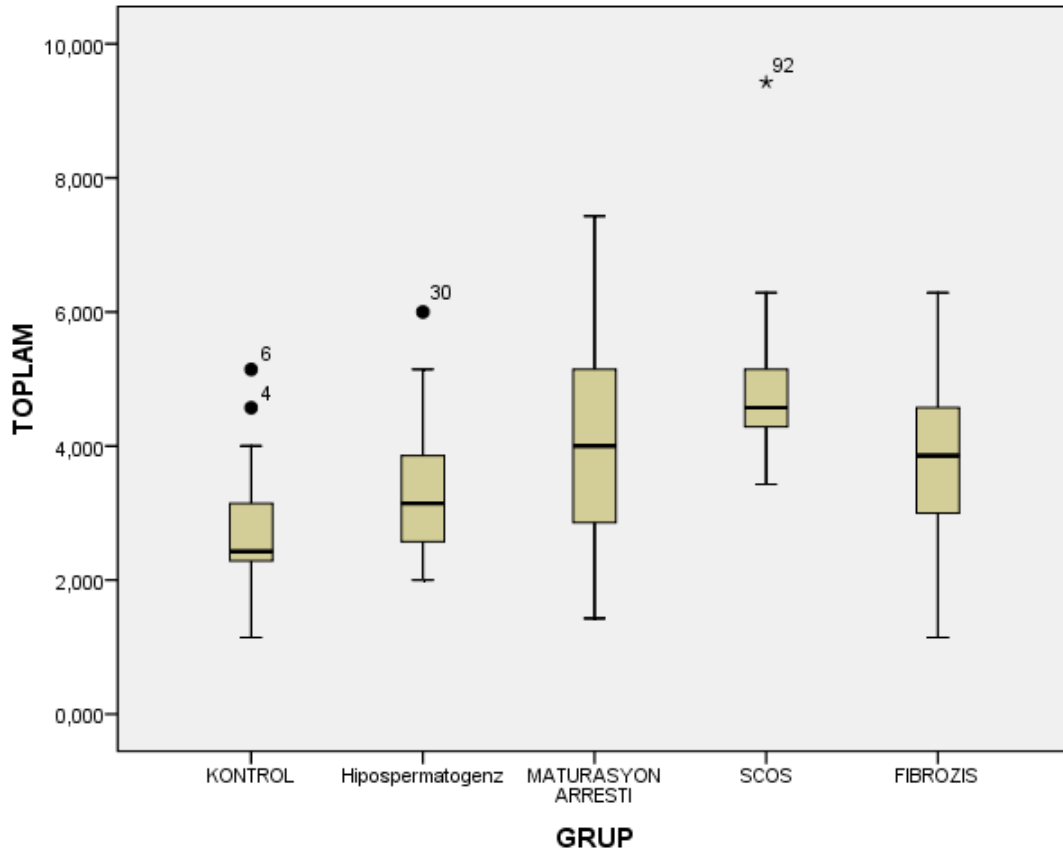
CD117 ile yapılan immünhistokimyasal incelemelerde kontrol grubu olarak alınan obstrüktif azospermi grubuna göre tüm gruplarda Cajal benzeri hücre sayıları artmıştı. Bu artış hipospermatogenez, matürasyon arresti ve SCOS’da giderek artan bir ivme göstermekte idi. Testiküler atrofi ve fibrozis grubunda ise Cajal benzeri hücre sayıları azalma eğiliminde idi. Matürasyon arresti ve SCOS grubunda saptanan toplam Cajal benzeri hücre sayıları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla sayıda idi (Tablo 4.2). Subgrupları kendi arasında toplam hücre sayıları açısından kıyasladığımızda ise SCOS grubundaki hücre sayı fazlalığının hipospermatogenez grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu görüldü ($p= 0.005$). Cajal benzeri hücrelerin testiste daha çok seminifer tübül etrafında bulundukları, daha az sayıda hücrenin ise perivasküler mesafede olduğu görüldü. Çalışma ve kontrol gruplarının testisteki Cajal benzeri hücrelerin dağılımlarının ışık mikroskopik olarak birbirine oldukça benzer özellik sergiledikleri, aynı zamanda tüm gruplardaki Cajal benzeri hücrelerin c-kit ile boyanma yoğunluğu açısından da farklılık olmadığı görüldü.

Kontrol grubu (Şekil 4.2), hipospermatogenez (Şekil 4.3), matürasyon arresti (Şekil 4.4), SCOS (Şekil 4.5) ve testiküler atrofi ve fibrozis (Şekil 4.6) subgruplarında peritübüler ve perivasküler alanlardaki Cajal benzeri hücreler gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Gruplara göre Cajal benzeri hücre sayılarının dağılımları

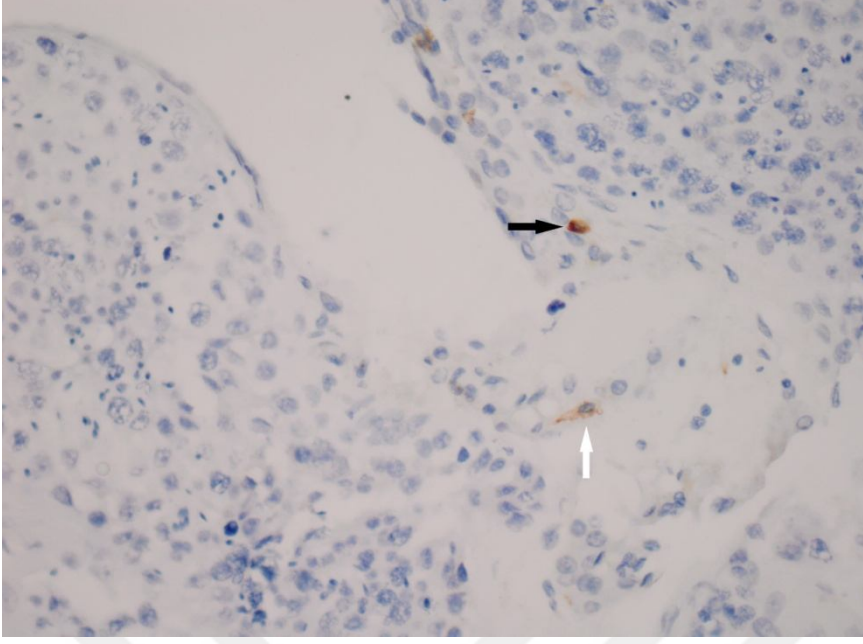
Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak gösterildi, n= olgu sayıları.

	Cajal Benzeri Hücre Sayısı	Dağılım (%)		P
	Hücre/ mm ²	Peritübüler	Perivasküler	
Kontrol grubu (n= 20)	2.43 (1.14 – 5.14)	88.2	11.8	
Hipospematogenez (n= 19)	3.14 (2 – 6)	90.9	9.1	1
Matürasyon Arresti (n= 40)	4 (1.43 – 7.43)	85.7	14.3	.006
SCOS (n= 20)	4.57 (3.43 – 9.43)	87.5	12.5	.000
Atrofi ve Fibrozis (n= 20)	3.86 (1.14 – 6.29)	85.2	14.8	.156



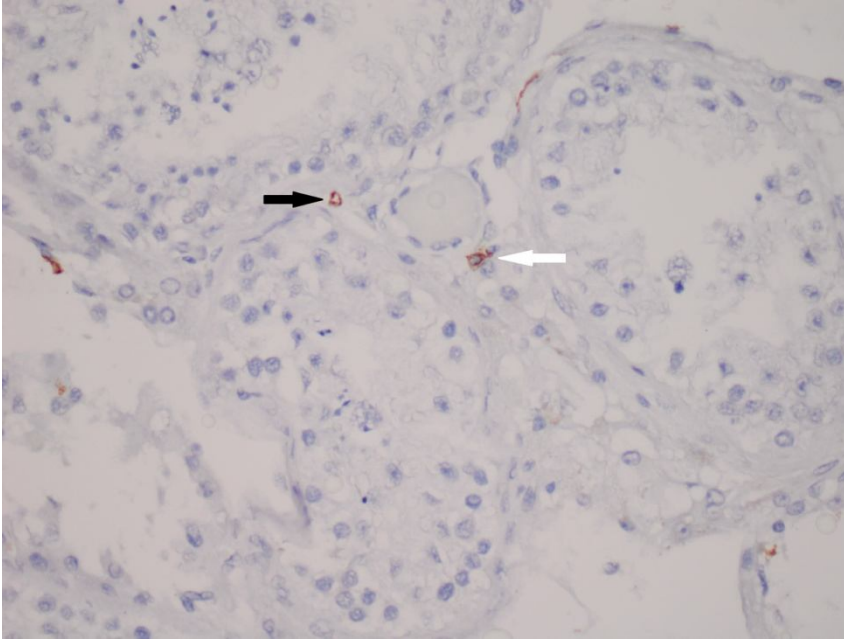
Şekil 4.1. Gruplara göre toplam Cajal benzeri hücre sayıları

Her bir kutunun ortasındaki yatay çizgi ortanca değeri (50. yüzdilik) gösterirken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla 25. ve 75. yüzdilik değerleri ifade etmektedir. Kutuların alt ve üst kısmında uzayarak giden çubuklarla sırasıyla minimum ve maksimum değerler gösterilmiştir. Daire sembolü uzak değerlere sahip olguları, yıldız sembolü ise aşırı değerlere sahip olguları göstermektedir.



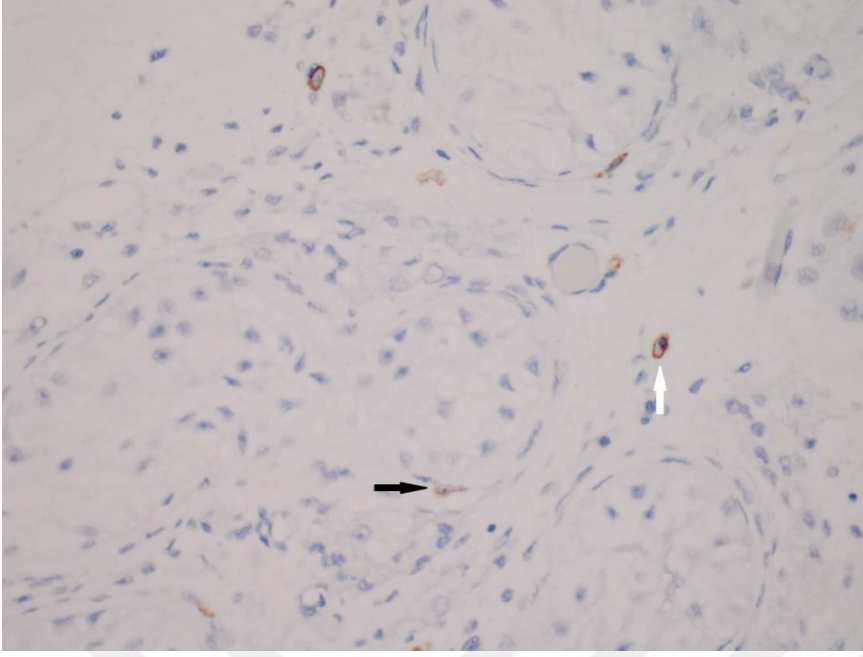
Şekil 4.2. Kontrol grubu olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)

Siyah ok ile peritübüler, beyaz ok ile perivasküler Cajal benzeri hücreler gösterilmiştir.



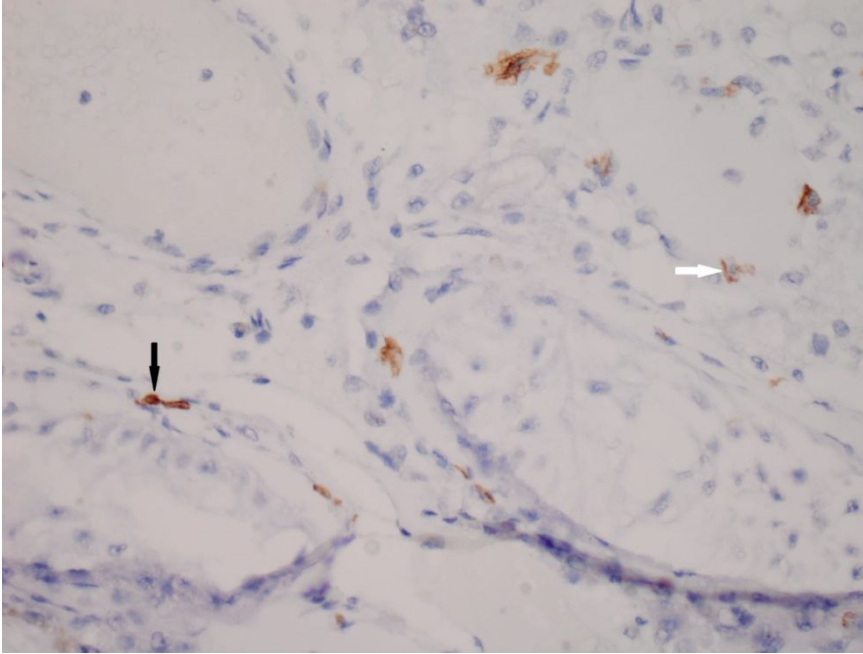
Şekil 4.3. Hipospermatogenez grubundaki olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)

Siyah ok ile peritübüler, beyaz ok ile perivasküler Cajal benzeri hücreler gösterilmiştir.



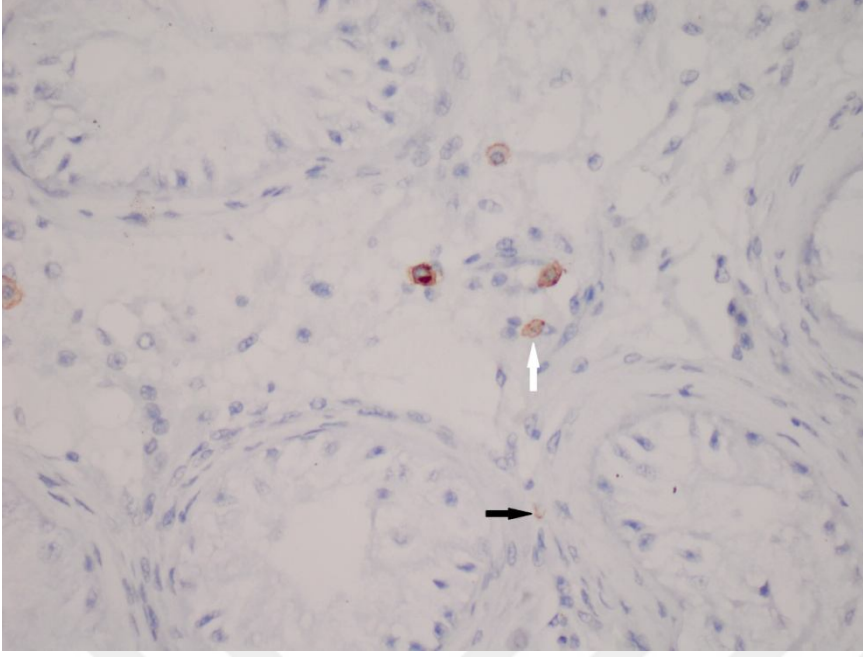
Şekil 4.4. Matürasyon arresti grubundaki olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)

Siyah ok ile peritübüler, beyaz ok ile perivasküler Cajal benzeri hücreler gösterilmiştir.



Şekil 4.5. SCOS grubundaki olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)

Siyah ok ile peritübüler, beyaz ok ile perivasküler Cajal benzeri hücreler gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Testiküler atrofi ve fibrozis grubundaki olgularının testis dokusunda Cajal benzeri hücreler (CD117; X400)

Siyah ok ile peritübüler, beyaz ok ile perivasküler Cajal benzeri hücreler gösterilmiştir.

5.TARTIŞMA

Yaklaşık 150 yıldır Cajal'ın interstisiyel hücreleriyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. İlk olarak gastrointestinal sistemde sinir ve barsak düz kas hücreleri ile ilişkili primitif pacemaker hücre olarak tanımlanan bu hücrelerin benzerleri, ilerleyen yıllarda üriner sistemde de tanımlanmış ve birçok çalışmanın merkezinde yer almışlardır. Cajal'ın interstisiyel hücreleri intestinal sistemde sinir ucu ile düz kas hücreleri arasında yer alan ve peristaltik hareket için gereken yavaş elektriksel dalga iletiminden sorumlu hücreler olarak gösterilmişlerdir. Peristaltik hareketlerin bozukluğu ile seyreden Hirschsprung's hastalığı, infantil hipertrofik pilor stenozu, yavaş geçişli konstipasyon gibi intestinal sistem hastalıklarında c-kit immünreaktivitesinde azalma, Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin sayılarında azalma ve dağılımlarında bozulma olduğu görülmüştür (198, 200, 240). Bu nedenle motilite değişikliklerinde Cajal'ın interstisiyel hücrelerinin ultrayapısının ve patolojik değişikliklerinin değerlendirilmesi hastalığın değerlendirilmesinde önemli rol oynamaktadır.

Cajal benzeri hücreler tıpkı gastrointestinal sistem motilitesinde olduğu gibi üreteral peristaltizmin yayılması, kordinasyonu ve düzenlenmesinde önemli role sahip olabilirler. Üreteropelvik bileşke obstrüksiyonunda ekspresyonu azalan Cajal benzeri hücreler nedeniyle peristaltik dalgaların iletiminde aksaklık görülebilir. Bunun sonucunda da renal pelvisten üretere idrar iletiminde problemler olabilir (8, 241). Üreter peristaltizmi ve Cajal benzeri hücreler arasındaki ilişki ile ilgili birkaç çalışma yapılmıştır. Solari ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada obstrükte insan üreteropelvik bileşke spesmenlerinde c-kit + Cajal benzeri hücrelerin yoğunluğunun azaldığı gösterilmiş ve üreteropelvik bileşke darlık etiyolojisinde Cajal benzeri hücrelerin azlığının rol oynayabileceği öne sürülmüştür (8). Yine üreteropelvik bileşke darlığı ve Cajal benzeri hücreler arasındaki ilişki ile ilgili yapılan bir başka çalışmada üreteropelvik bileşke darlığı nedeniyle dismembered pyeloplasti yapılan olguların doku örnekleri CD117 kullanılarak immünohistokimyasal yöntemle incelenmiş ve çalışma grubunda kontrol grubuna göre c-kit pozitif boyanan Cajal benzeri hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma izlendiği belirtilmiştir (232). Kuzgunbay tarafından yapılan bir çalışmada distal üreter ligasyonu yapılan sıçanlarda üreteropelvik bileşkede Cajal benzeri hücrelerin sayı ve morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler araştırılmış olup deneysel darlık geliştirilen grupta obstrüksiyonun erken döneminde hücre sayıları artmış bulunurken, ligasyondan sonraki 3. ay olan geç dönemde hücre sayılarının azaldığı saptanmıştır. Cajal benzeri

hücrelerde başlangıçta meydana gelen artışın ilerleyen dönemlerde azalmasının nedeninin peristaltik aktivitedeki zamanla ortaya çıkan azalmaya bağlı olduğu öne sürülmüştür (233). Bu çalışmaya benzer bir çalışmada ise hidronefrotik nonfonksiyone böbrek nedeni ile nefrektomi yapılan olgular kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve çalışma grubunda kontrol grubuna göre renal pelvis ve proksimal üreterlerinin lamina propria ve muskularis propria katmanlarında CD117 ile pozitif boyanan Cajal benzeri hücrelerin sayısında anlamlı azalma saptandığı belirtilmiştir. Üriner peristaltizminin kaybolduğu bu vakalarda bu hücrelerin azalması, motilitenin olmadığı dokularda Cajal benzeri hücrelerin azaldığı ve dolayısıyla bu hücrelerin motilite regülasyonunda rol aldıkları şeklinde yorumlanmıştır. Yazarlar, elde edilen çalışmanın sonucuna göre Kuzgunbay'ın çalışmasının üreter motilitesinin bozulduğu akut ve subakut dönemi, kendi çalışmalarının ise kronik dönemi yansıttığını düşünmüşlerdir. Dolayısı ile bunu obstrüksiyon sonrası erken dönemlerde obstrüksiyona yanıt olarak artan peristaltik aktivite ile birlikte Cajal benzeri hücrelerin sayısında artış, kronik süreçte ise peristaltizmin kaybı ile beraber Cajal benzeri hücrelerin sayısında azalma olduğu şeklinde yorumlamışlardır (234). Cajal benzeri hücrelerin üriner sistemde pacemaker aktivitelerini göstermeye yönelik yapılan morfolojik çalışmaların yanı sıra elektrofizyolojik çalışmalar da yapılmıştır. Renal papillalardan distale doğru gidildikçe renal pelviste ASMC ile birlikte Cajal benzeri hücrelerin de kontraktıl elektriksel akımı başlattığı ve yaydığı görülmüştür (4, 242).

Arrighi ve arkadaşları immünfloresan mikroskopi ile c-kit + Cajal benzeri hücrelerin mesane duvarında interstisiyel alanda, düz kas demetlerinin ve intramural sinirlerin yakınında yerleşim gösterdiklerini göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonucuna göre araştırmacılar, mesane duvarını inerve eden intramural sinirler ile yakın komşuluklarından dolayı Cajal benzeri hücrelerin detrüsörün fazik kontraksiyonlarından sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Dahası, idrarın depolanması ve miksiyon sırasında üretra ve mesane düz kas aktivitesinin regülasyonunda pacemaker rolleri olabileceğini düşünmüşlerdir (243). Üriner sistemde Cajal benzeri hücreler ile ilgili yapılan bir derlemede bu hücrelerin normal mesanede olası fonksiyonları için sadece izleyici rol olarak mı görev aldıkları, mesanenin ihtiyaçlarına yanıt olarak düz kas hücrelerinin aktivitesini mi düzenledikleri veya mesane duvarındaki heterojen hücre gruplarının (düz kas hücresi, sinir hücreleri, mikrodamarlar ve üretelyal hücreler) karmaşık sistemleri arasında haberleşmeyi ve bilgi naklini sağlayıcı primer rolleri mi olduklarının tam olarak aydınlatılamadığı görülmektedir. Eldeki mevcut kanıtlara dayanarak yerleşimleri, komşu

hücreler ile yapısal bağları, membran reseptörleri ve iyon kanallarının ekspresyonu ile olan ilişkilerine göre Cajal benzeri hücrelerin mesanede birçok rolü olduğu ve mesanenin fizyolojik veya patofizyolojik durumuna göre farklı görevler alabilecekleri vurgulanmıştır (177).

Tavşan üretrasında yapılan bir çalışmada üretral düz kas demetleri arasında c-kit + hücrelerin varlığı floresan mikroskopisi ile gösterilmiştir. Üretranın nitrik oksit sentaz içeren nöronlarla yaygın şekilde inervasyonu, nitrik oksidin miksiyon sırasında üretral sfinkterde aktif relaksasyon sağlayıcı rolü ve c-kit + interstisiyel hücrelerin nörojenik nitrik oksit sentaz içeren nöronlarla yakın ilişkilerinin gösterilmesi c-kit + hücrelerin üretral tonüs üzerinde kontrol edici etkilerini desteklemektedir (244). Dolayısıyla interstisiyel hücrelerin üretral sfinkter ile ilgili sorunu olan üriner inkontinans hastalarında ilaç tedavileri için yeni hedefler olabilecekleri düşünülmüştür. Vaz deferenste Cajal benzeri hücreler ile ilgili yapılan bir deneysel çalışmada ise vaz ligasyonu sonrası ligatüre edilen vaz segmentinin proksimalinde Cajal benzeri hücrelerin sayısının obstrüksiyonun erken döneminde arttığı, geç dönemde ise azaldığı saptanmış ve bu sonuç ise hücrelerin obstrüksiyonun erken döneminde obstrüksiyonu yenmek için sayıca arttıkları ve obstrüksiyonun devamında da motilite olmadığı için zamanla azaldıkları şeklinde yorumlanmıştır (9).

İnfertilite ile başvuran erkeklerin %15'lik bir kısmında nedenin azospermi olduğu bilinmektedir (140). Nonobstrüktif azospermili hastalarda spermatozoa bulmak amacıyla TESE operasyonu yapılmaktadır. Daha önce konvansiyonel yöntemle yapılan TESE operasyonu günümüzde mikrodiseksiyon yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntemle olgun spermatozoa bulma ihtimali %40-60 arasında değişmektedir (157). Testiküler sperm ekstraksiyonu öncesinde testislerde sperm bulunma ihtimalini kesin olarak öngöreceği bir klinik test bulunmamaktadır. Ancak, bu konuyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmış ve birçok parametre değerlendirilmiştir. Bu parametreler arasında da testis hacmi, daha önce yapılan testis biyopsisi sonucu, serum inhibin-B ve FSH düzeyi ilk etapta göze çarpmaktadır. Testis hacmiyle ilgili yapılan çalışmalarda, TESE'de sperm bulma başarısı ile testis hacminin korele olmadığı görülmüştür. Zira 5 ml'den daha düşük hacimli testislerde dahi sperm bulunabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (163). Keza aynı şekilde serum FSH düzeyinin de TESE'de sperm bulma başarısı üzerine direkt olarak ilişkilendirilmemiştir (165). Testis biyopsisi ele alınacak olursa, günümüzde biyopsi tanı aracı olmaktan uzaklaşmıştır. Zira dokuya verilecek olan hasar göz önüne alındığında biyopsi tanı aracı değil de tedavi amaçlı yapılması gündeme gelmektedir. Eldeki tüm

parametrelerden tek akla yatkın olanı ve çalışmalarla destekleneni serum inhibin-B düzeyidir. Ballesca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada serum inhibin-B düzeyinin belirli bir seviyenin altında olmasını TESE’de spermatozoa bulma şansını azalttığı gösterilmiştir (167). Her ne kadar aksini ortaya koyan çalışmalar olsa da günümüzde serum inhibin-B düzeyindeki düşüklüğün TESE ile spermatozoa bulma şansını düşürdüğü kabul edilmektedir. Buna rağmen günümüzde TESE öncesinde testiste spermatozoa bulunma ihtimalini etkileyecek olan testise özgü moleküler ajanlar ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Bir protoonkogen olan c-kit tarafından kodlanan kit proteininin hücre yüzeyinde tirozin kinaz için transmembran reseptör olduğu bilinmektedir. Stem cell factor bu hücre yüzey proteini için bir ligand görevi görür. Stem cell factor ile kit proteini arasındaki ilişki, aralarında germinal hücreler ve mast hücrelerinin de bulunduğu bir dizi hücre gruplarının matürasyonunda, gelişiminde ve proliferasyonunda göze çarpmaktadır (245). Bu etkileşim sayesinde pubertal dönemde pre-spermatogonya, spermatogonya A ve B’ye farklılaşır. Ullrich ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise bu bulguları destekler niteliktedir. Bu çalışmada c-kit membran reseptörünün tip A ve tip B spermatogonyalar tarafından eksprese edildiği, bundan sonraki mayotik evrelerde de tamamlanmamış c-kit proteini varlığı gösterilmiştir (12). Yoshinaga ve arkadaşları farelerdeki spermatogenez üzerine c-kit’in rolünü araştırdıkları çalışmada erken embriyogenez süresince primordiyal germ hücrelerindeki gelişimin durmasından dolayı c-kit’deki olası bir mutasyonun steriliteye yol açtığını bulmuşlardır. Ayrıca, diferansiye tip A spermatogonyaların farklılaşması için c-kit’e ihtiyaç duyduklarını ancak primitif tip A spermatogonyalar ile spermatojenik kök hücrelerin c-kit’den bağımsız olduklarını öne sürmüşlerdir (246).

Testiste Cajal benzeri hücrelerin araştırmaları ise çok yeni gibi görünmekle birlikte, bu hücrelerin varlığı ilk olarak 2008 yılında Rodríguez ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Yapılan bu çalışmada prostat tümörü tanılı 10 olgunun orşiektomi materyallerinde testis dokusunda interstisiyel alanda c-kit + Cajal benzeri hücrelerin varlığını gösterilmiştir (13). Bu çalışmadaki olguların testis dokularında CD117 kullanılarak Cajal benzeri hücre sayılarının peritübüler alanda 0.4 hücre/ 0.25 mm² olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise bu hücre sayıları kontrol grubunda peritübüler alanda 2.4 hücre/ 1 mm² iken bu oran SCOS grubunda 4.5 hücre/ 1mm²’ye kadar yükselmiştir. Rodríguez’in çalışmasında peritübüler alanda bulunan Cajal benzeri hücrelerin sayısı 1 mm²’ye göre ise 1.6 hücreye tekabül etmektedir. Bu sayı, çalışmamızda

kontrol grubunda saptanan 1 mm²'de ortalama 2.4 hücre sayısına yakın bir değerdir. Çalışmada Cajal benzeri hücre sayısının bizim çalışmamıza göre daha düşük saptanması mikroskopların ve dijital makinaların model ve kalibrasyon farklılıklarına bağlı olabilir. Buna rağmen bu çalışma grubunda bulunan ileri yaşlardaki prostat tümörlü hastalarda hücresel reaksiyonların, hücre motilitesinin ve dolayısıyla spermatogenezin de büyük bir olasılıkla durmuş olduğunu düşünecek olursak Cajal benzeri hücre sayılarının bizim kontrol grubuna göre bu nedenlere bağlı olarak azalmış olabilecekleri söylenebilir.

Rodríguez ve arkadaşlarının bu hücrelerin peritübüler myoid hücrelerle yakın temasta olduğunu, intertübüler sıvının ve hücrelerin motilitesinde ve sekresyonunda görev aldıkları fikrini ortaya atması çalışmamız için başlangıç noktası olmuştur. Nitekim üriner sistemin farklı bölgelerinde pacemaker özelliğine daha önceden değindiğimiz Cajal benzeri hücrelerin peritübüler myoid hücrelerle yakın komşuluğunu göz önünde bulundurduğumuzda bu hücrelerin testis içinde de pacemaker rolünü oynayabileceği hipotezini göz ardı etmemek gerekir. Spermatogonya yüzeyinde bulunan kit proteini ile etkileşime geçen stem cell factorun aynı şekilde Cajal benzeri hücreyi de etkileyerek germinal hücre gelişiminin erken evrelerinde spermatogonyanın matürasyonunda rol oynaması muhtemel iken matürasyon tamamlandıktan sonra da seminifer tübül içerisindeki germ hücrelerinin motilitesine etki etmesi mümkün gibi görünmektedir. Çalışmamızda Cajal benzeri hücreler testiste seminifer tübül çevresinde ve perivasküler alanlarında gösterilmişlerdir. Perivasküler alandaki hücre sayıları, peritübüler alanlara göre oldukça az sayıdadır. Çalışmamızda, bu hücreler obstrüktif azospermi nedeniyle TESE yapılan kontrol grubundaki hücrelere göre çalışma grubunda sayıca daha fazla bulunmuştur. Hücre sayılarının kontrol grubuna göre sırasıyla hipospermatogenez, matürasyon arresti ve SCOS gruplarında giderek artış göstermesi ve bu artışın matürasyon arresti ve SCOS'de istatistiksel olarak anlamlı olması dikkat çekicidir. Bu artış testiküler atrofi ve fibrozis grubunda yerini tedrici bir azalmaya bırakmıştır.

Çalışmamızda testiste Cajal benzeri hücrelerin gösterilmesi ve bu hücrelerin spermatogenezin farklı aşamalarındaki sayısal ve morfolojik anormalliklerinin incelenmesi amaçlanmıştı. Çalışmamız, literatürde testiste c-kit pozitif Cajal benzeri hücrelerin gösterildiği ikinci çalışmadır. Çalışmamızı planlarken bu hücrelerin spermatogenezin olmadığı ya da azaldığı çalışma grubunda, normal spermatogenezin olduğu kontrol grubuna göre azalmış olarak bulunması durumunda bu hücrelerin spermatogenezin indüksiyonunda da görevli hücreler olabilecekleri ihtimalini değerlendirmeyi

düşünmüştük. Fakat çalışmamızın sonucunda Cajal benzeri hücre sayılarının çalışma grubunda kontrol grubuna göre belirgin derecede daha fazla olduğunu bulduk. Bu sonuçlara göre bu hücrelerin spermatogenez regülasyonunda olumlu ya da olumsuz şekilde rol alıp almadıklarının söylenmesi oldukça güçtür.

Cajal hücrelerinin gastrointestinal sistemde ve son zamanlarda da üriner sistemde yapılan çalışmalar ışığında pacemaker hücreler olabilecekleri düşünüldüğünde; Cajal benzeri hücre sayılarının testis biyopsisinde kontrol grubuna göre sperm bulma ihtimalleri giderek azalan hipospermatogenez, matürasyon arresti ve SCOS'de sperm bulma ihtimali ile ters orantılı olarak artış göstermesi bu hücrelerin spermatogenez aşamalarında duraklama olduğu zaman bu duraklamayı yenmek amacıyla proliferere olma eğiliminde olabileceklerini düşündürebilir. Testiküler atrofi ve fibrozis grubunda diğer gruplardan farklı olarak hücre sayılarının azalma eğilimine girmeleri ise bu grupta seminifer tübüllerin azalması ve yok olmasına bağlı Cajal benzeri hücrelerin azaldıkları şeklinde yorumlanabilir. Fakat böyle bir yorumun sağlam temellere dayandırılması için testiste bulunan Cajal benzeri hücrelerin elektrofizyolojik çalışmalarla incelenmesi ve spermatogenezi indükleyici rollerinin olup olmadığının araştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte bu hücrelerin spermatozoa bulunan obstrüktif azospermi grubuna göre spermatogenezin azaldığı ya da hiç olmadığı NOA grubunda artış göstermesi, aklımıza az önceki yorumdan çok farklı olarak bu hücrelerin spermatogenezi olumsuz yönde etkileyen veya inhibe eden hücre grupları arasında olabilecekleri ve bu yüzden NOA grubunda sayıca daha fazla oldukları ihtimalini de düşündürmektedir. Ancak son yıllarda üriner sistemin diğer bölgelerinde ve uzun yıllardan beri gastrointestinal sistemde bu hücrelerin pacemaker hücreler olabilecekleri ile ilgili yapılan çok sayıda yayına bakıldığı zaman bu hücrelerin testisteki olası fonksiyonları, ikinci senaryomuz ile çok uyumlu olamayabilir. Ama yapılan çok sayıdaki çalışmaya rağmen üriner sistemde Cajal benzeri hücrelerin görevi henüz kesin olarak belirlenememiştir. Dolayısıyla testisteki Cajal benzeri hücreler diğer doku ve organlardaki görevlerinden farklı olarak burada hücrelerin kontraksiyonunda, hücreler arası nörotransmisyonunda, hücre motilitesinin regülasyonunda ya da pacemaker hücre olarak görev almıyor olabilirler. Bu hücrelerin aynı zamanda spermatogenez regülasyonundan tamamen bağımsız olan ve peritübüler alanda çok daha farklı düzeylerdeki reaksiyonları katalize edebilen hücreler olabilecekleri göz ardı edilmemelidir. Testiste bu hücrelerin olası görevlerinin belirlenmesi için daha fazla sayılı, ışık mikroskobuna ilaveten elektron mikroskobik çalışmaların da dahil edildiği,

fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması için elektrofizyolojik çalışmalar ile kombine edilen çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu çalışmaların yapılması bu hücrelerin ayrıntılı bir şekilde morfolojilerinin de daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Hücresel düzeyde üriner sistemin diğer bölgelerinde yer alan Cajal benzeri hücreler ile aralarındaki benzerlik ve farklılıkların anlaşılması ise bu hücrelerin fonksiyonlarını aydınlatmaya ışık tutabilir.

Sonuç olarak, Cajal benzeri hücreler, tüm üriner sistemde olduğu gibi testiste de net olarak gösterilebilmişlerdir. Bu hücrelerin testiste spermatogenez ile ilişkili olup olmadığının anlaşılması, yapılacak olan daha geniş serili ve elektron mikroskopik incelemenin yapılacağı çalışmalarla mümkün olabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Cajal benzeri hücrelerin testiste sperm matürasyonu üzerine rolü olduğunu gösteren bulgular ışığında yapılan bu çalışmada, TESE yapılan olguların testis biyopsi spesmenlerinde CD117 ile pozitif boyanan Cajal benzeri hücre sayıları araştırılmış ve sonuçlara göre matürasyon arresti ve SCOS gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Bu sonuca göre Cajal benzeri hücrelerin spermatogenezin aksadığı ya da olmadığı durumlarda arttığı söylenebilir. Fakat elde ettiğimiz sonuç, bu hücrelerin testiste olası fonksiyonlarını aydınlatmak açısından uzaktır. Elektrofizyolojik ve elektron mikroskopik çalışmalar, bu hücrelerin testisteki fonksiyonlarını ortaya koymak için bize oldukça faydalı bilgiler verebilir.

Ürogenital sistemde Cajal benzeri hücrelerin yapısal özelliklerinin ve spermatogenez üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılması amacıyla yapılacak olan çalışmalar, bu hücrelerin genital sistemdeki fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasına ve azoospermi ile ilgili genital sistem patolojilerine yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* 39(5): 137-161, 2003.
2. Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111(2): 492-515, 1996.
3. Yamataka A, Ohshiro K, Kobayashi H, Lane GJ, Yamataka T, Fujiwara T, Sunagawa M, Miyano T. Abnormal distribution of intestinal pacemaker (C-kit-positive) cells in an infant with chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction. *J Pediatr Surg* 33(6): 859-862, 1998.
4. Klemm MF, Exintaris B, Lang RJ. Identification of the cells underlying pacemaker activity in the guinea-pig upper urinary tract. *J Physiol* 519 Pt 3: 867-884, 1999.
5. Exintaris B, Klemm MF, Lang RJ. Spontaneous slow wave and contractile activity of the guinea pig prostate. *J Urol* 168(1): 315-322, 2002.
6. Piaseczna-Piotrowska AM, Dzieciecka M, Kulig A, Danilewicz M, Chilarski A. Different distribution of c-kit positive interstitial cells of Cajal-like in children's urinary bladders. *Folia Histochem Cytobiol* 49(3): 431-435, 2011.
7. Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD, McHale NG. Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra. *J Physiol* 526 Pt 2: 359-366, 2000.
8. Solari V, Piotrowska AP, Puri P. Altered expression of interstitial cells of Cajal in congenital ureteropelvic junction obstruction. *J Urol* 170(6 Pt 1): 2420-2422, 2003.
9. Turunc T, Bayazit Y, Doran F, Bal N, Doran S. Effects of vas deferens obstruction on Cajal-like cells in rats. *Urol Int* 83(1): 86-91, 2009.
10. McCloskey KD, Gurney AM. Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J Urol* 168(2): 832-836, 2002.
11. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, Nishikawa S. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116(2): 369-375, 1992.
12. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2): 203-212, 1990.
13. Rodríguez H, Espinoza-Navarro O, Sarabia L, Tamayo C, Sepulveda M, Inostroza J, Araya JC, Moriguchi K. Histological and functional organization in human testicle expression of receptors c-kit and androgens. *Int J Morphol* 26(3): 603-608, 2008.
14. Rothschild G, Sottas CM, Kissel H, Agosti V, Manova K, Hardy MP, Besmer P. A role for kit receptor signaling in Leydig cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 69(3): 925-932, 2003.

15. Tisher PV. Diameter of testicles. *N Eng J Med* 285(26): 1489-1493, 1971.
16. Setchell BP, Brooks DE. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. *The Physiology of Reproduction*. (Knobil E, Neill JD, ed). New York, Raven. 753-836, 1988.
17. Roosen-Runge EC, Holstein AF. The human rete testis. *Cell Tissue Res* 189(3): 409-433, 1978.
18. Turner TT, D'Addario D, Howards SS. Further observations on the initiation of sperm motility. *Biol Reprod* 19(5): 1095-1101, 1978.
19. Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev* 14(2): 152-164, 1993.
20. Ikeda Y. SF-1: a key regulator of development and function in the mammalian reproductive system. *Acta Paediatr Jpn* 38(4): 412-419, 1996.
21. Hutson JC. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol* 149: 99-143, 1994.
22. Kaler LW, Neaves WB. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat Rec* 192(4): 513-518, 1978.
23. Lipsett MB. Steroid secretion by the testis in man. *The Endocrine Function of the Testis* (James VH, ed). New York, Academic. 1974.
24. Turek PJ. Male Reproductive Physiology. *Campbell-Walsh Urology*. 10 ed. (Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, ed). Philadelphia. Elsevier Saunders. 591-615, 2012.
25. Heller CG, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Rec Prog Horm Res* 20: 545-575, 1964.
26. Hermo L, Lalli M, Clermont Y. Arrangement of connective tissue components in the walls of seminiferous tubules of man and monkey. *Am J Anat* 148(4): 433-445, 1977.
27. Suvanto O, Kormano M. Effect of experimental cryptorchidism and cadmium injury on the spontaneous contractions of the seminiferous tubules of the rat testis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 4(3): 217-224, 1970.
28. Ewing LL, Davis JC, Zirkin BR. Regulation of testicular function: a spatial and temporal view. *International review of physiology*. (Greep RO, ed). Baltimore. University Park Press. 41, 1980.
29. Harrison RG, Barclay AE. The distribution of the testicular artery (internal spermatic artery) to the human testis. *Br J Urol* 20: 5-9, 1948.
30. Harrison RG. The comparative anatomy of the blood supply of the mammalian testis. *Proc Zool Soc* 19: 325-344, 1949.

31. Agger P. Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. *Fertil Steril* 22(5): 286-297, 1971.
32. Muller I. Architectonic of the canals and capillaries of rat testes. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 45(5): 522-537, 1957.
33. Hundeiker M. Lymphatic vessels in the parenchyma of the human testis. Demonstrated by injections. *Arch Klin Exp Dermatol* 235(3): 271-276, 1969.
34. Mitchell GA. The Innervation of the Kidney, Ureter, Testicle and Epididymis. *J Anat* 70(Pt 1): 10-32, 1935.
35. Baumgarten HG, Falck B, Holstein AF, Owman C, Owman T. Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 90(1): 81-95, 1968.
36. Levallet J, Pakarinen P, Huhtaniemi IT. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations and gonadal dysfunction. *Arch Med Res* 30(6): 486-494, 1999.
37. Kiserud CE, Fossa A, Bjoro T, Holte H, Cvancarova M, Fossa SD. Gonadal function in male patients after treatment for malignant lymphomas, with emphasis on chemotherapy. *Br J Cancer* 100(3): 455-463, 2009.
38. Darby K, Granner MD. The Diversity of the Endocrine System. *Harper's Illustrated Biochemistry*. (Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Wei PA, ed). 28th ed. 855-890, 2009.
39. Freeman ER, Bloom DA, McGuire EJ. A brief history of testosterone. *J Urol* 165(2): 371-373, 2001.
40. Hammond GL. Endogenous steroid levels in the human prostate from birth to old age: a comparison of normal and diseased tissues. *J Endocrinol* 78(1): 7-19, 1978.
41. Berman DM, Rodriguez R, Veltri RW. Development, Molecular Biology, and Physiology of the Prostate. *Campbell-Walsh Urology*. (Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, ed). 10th ed. Philadelphia. Elsevier Saunders. 2533-2569, 2012.
42. Witschi E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal fold. *Carnegie Institute Wash Contrib Embryol* 209: 67-80, 1948.
43. Gondos B, Hobel CJ. Ultrastructure of germ cell development in the human fetal testis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 119(1): 1-20, 1971.
44. Hilscher B, Engemann A. Histological and morphometric studies on the kinetics of germ cells and immature Sertoli cells during human prespermatogenesis. *Andrologia* 24(1): 7-10, 1992.
45. Aydos K. Erkek İnfertilitesi. *Temel Üroloji*. (Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N, ed). 3. Baskı. Ankara. 967-1011, 2007.

46. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 56(2): 192-193, 1991.
47. Spira A. Epidemiology of human reproduction. *Hum Reprod* 1(2): 111-115, 1986.
48. van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *BMJ* 302(6789): 1361-1365, 1991.
49. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway D₁, Foster PA, Hinton Ra, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 291(6510): 1693-1697, 1985.
50. Collins JA, Wrixon W, Janes LB, Wilson EH. Treatment-independent pregnancy among infertile couples. *N Engl J Med* 309(20): 1201-1206, 1983.
51. Jarow JP. Life-threatening conditions associated with male infertility. *Urol Clin North Am* 21(3): 409-415, 1994.
52. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR, Hornsby PP, Herbst AL. Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *N Engl J Med* 332(21): 1411-1416, 1995.
53. McAleer IM, Kaplan GW. Is routine karyotyping necessary in the evaluation of hypospadias and cryptorchidism? *J Urol* 165(6 Pt 1): 2029-2031, 2001.
54. Kolettis PN, Sabanegh ES. Significant medical pathology discovered during a male infertility evaluation. *J Urol* 166(1): 178-180, 2001.
55. Lipshultz LI, Corriere JN, Jr. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol* 117(2): 175-176, 1977.
56. Aydin S. Farklı üropatojen mikroorganizmaların sperm motilite üzerine etkisi: İn vitro deneysel çalışması. Doktora Tezi, Yüzüncüyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van. 2003.
57. Sigman M, Jarow JP. Endocrine evaluation of infertile men. *Urology* 50(5): 659-664, 1997.
58. Turek PJ, Kim M, Gilbaugh JH 3rd, Lipshultz LI. The clinical characteristics of 82 patients with Sertoli cell-only testis histology. *Fertil Steril* 64(6): 1197-1200, 1995.
59. Carter JN, Tyson JE, Tolis G, Van VS, Faiman C, Friesen HG. Prolactin-screening tumors and hypogonadism in 22 men. *N Engl J Med* 299(16): 847-852, 1978.
60. Burrows PJ, Schrepferman CG, Lipshultz LI. Comprehensive office evaluation in the new millennium. *Urol Clin North Am* 29(4): 873-894, 2002.
61. Ford WC. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl* 12(1): 59-63, 2010.

62. Correa-Perez JR, Fernandez-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necropermia. *Fertil Steril* 81(4): 1148-1150, 2004.
63. Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Mieusset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril* 74(6): 1164-1174, 2000.
64. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 9(5): 405-428, 2003.
65. Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HW, de Kretser DM. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil Steril* 49(6): 1052-1058, 1988.
66. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen AN, Keding N, Skakkebaek NE, Spira A, Jouannet P. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 17(2): 503-515, 2002.
67. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl* 7(5): 369-382, 1984.
68. Eliasson R. Analysis of semen. *Progress in Infertility* (Behrman SJ, ed). New York, Little Brown, 691-713, 1975.
69. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 60(6): 1069-1075, 1993.
70. Kim FY, Goldstein M. Antibacterial skin preparation decreases the incidence of false-positive semen culture results. *J Urol* 161(3): 819-821, 1999.
71. Jarow JP. Transrectal ultrasonography of infertile men. *Fertil Steril* 60(6): 1035-1039, 1993.
72. Poore RE, Jarow JP. Distribution of intraprostatic hypercholesterol lesions in infertile men. *Urology* 45(3): 467-469, 1995.
73. Eskew LA, Watson NE, Wolfman N, Bechtold R, Scharling E, Jarow JP. Ultrasonographic diagnosis of varicoceles. *Fertil Steril* 60(4): 693-697, 1993.
74. Meacham RB, Townsend RR, Rademacher D, Droese JA. The incidence of varicoceles in the general population when evaluated by physical examination, gray scale sonography and color Doppler sonography. *J Urol* 151(6): 1535-1538, 1994.

75. Donohue RE, Fauver HE. Unilateral absence of the vas deferens. A useful clinical sign. *JAMA* 261(8): 1180-1182, 1989.
76. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 142(1): 62-65, 1989.
77. Belmonte IG, Martin de Serrano MN. Partial obstruction of the seminal path, a frequent cause of oligozoospermia in men. *Hum Reprod* 13(12): 3402-3405, 1998.
78. 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.
79. Levin HS. Testicular biopsy in the study of male infertility: its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Hum Pathol* 10(5): 569-584, 1979.
80. Sabanegh E, Agarwal A. Male Infertility. *Campbell-Walsh Urology* (Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, ed). 10th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 591-615, 2012.
81. Kim ED, Greer JA, Abrams J, Lipshultz LI. Testicular touch preparation cytology. *J Urol* 156(4): 1412-1414, 1996.
82. Sciurano RB, Luna Hisano CV, Rahn MI, Brugo Olmedo S, Rey Valzacchi G, Coco R, Solari AJ. Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients. *Hum Reprod* 24(9): 2353-2360, 2009.
83. Lipshultz L. Subfertility. *Current Urologic Therapy* (Kaufmann JJ, ed). Philadelphia, WB Saunders, 1980.
84. Nagler HM, Martinis FG. Varicocele. *Infertility in Male* (Lipshultz LI, Howards S, ed). St. Louis, Mosby Year Book, 336-359, 1997.
85. Braedel HU, Steffens J, Ziegler M, Polsky MS, Platt ML. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol* 151(1): 62-66, 1994.
86. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, Weidner W, Zini A. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol* 60(4): 796-808, 2011.
87. Gat Y, Bachar GN, Zukerman Z, Belenky A, Gornish M. Varicocele: a bilateral disease. *Fertil Steril* 81(2): 424-429, 2004.
88. Shiraishi K, Takihara H, Naito K. Testicular volume, scrotal temperature, and oxidative stress in fertile men with left varicocele. *Fertil Steril* 91(4 Suppl): 1388-1391, 2009.
89. Khera M, Lipshultz LI. Evolving approach to the varicocele. *Urol Clin North Am* 35(2): 183-9, 2008.

90. Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* 73(3): 461-469, 2009.
91. Ghabili K, Shoja MM, Agutter PS, Agarwal A. Hypothesis: intracellular acidification contributes to infertility in varicocele. *Fertil Steril* 92(1): 399-401, 2009.
92. Gershbein AB, Horowitz M, Glassberg KI. The adolescent varicocele I: left testicular hypertrophy following varicocelectomy. *J Urol* 162(4): 1447-1449, 1999.
93. Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal R, Short RA, Sabanegh E, Marmar JL. Efficacy of varicocelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology* 70(3): 532-538, 2007.
94. Turek PJ. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. *Nat Clin Pract Urol* 2(5): 226-238, 2005.
95. Matthews GJ, Matthews ED, Goldstein M. Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Fertil Steril* 70(1): 71-75, 1998.
96. Score CG. The Descent of the Testis . *Arch Dis Child* 39: 605-609, 1964.
97. de Gouveia Brazao CA, Pierik FH, Erenpreiss Y, de Jong FH, Dohle GR, Weber RF. The effect of cryptorchidism on inhibin B in a subfertile population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59(1): 136-141, 2003.
98. Caroppo E, Niederberger C, Elhanbly S, Schoor R, Ross L, D'Amato G. Effect of cryptorchidism and retractile testes on male factor infertility: a multicenter, retrospective, chart review. *Fertil Steril* 83(5): 1581-1584, 2005.
99. Murphy F, Paran TS, Puri P. Orchidopexy and its impact on fertility. *Pediatr Surg Int* 23(7): 625-632, 2007.
100. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol* 22(2): 133-141, 2006.
101. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364(9430): 273-283, 2004.
102. Wang C, Baker HW, Burger HG, de Kretser DM, Hudson B. Hormonal studies in Klinefelter's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 4(4): 399-411, 1975.
103. Pagon RA. Gene Reviews. (Bird TD, Dolan CR, Stephens K, ed). Seattle, University of Washington, 2012.
104. Zenteno JC, Mendez JP, Maya-Nunez G, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S. Renal abnormalities in patients with Kallmann syndrome. *BJU Int* 83(4): 383-386, 1999.
105. Katagiri Y, Neri QV, Takeuchi T, Schlegel PN, Megid WA, Kent-First M, Rosenwaks Z, Palermo GD. Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children. *Reprod Biomed Online* 8(3): 307-318, 2004.

106. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod* 18(8): 1660-1665, 2003.
107. Blagosklonova O, Fellmann F, Clavequin MC, Roux C, Bresson JL. AZFa deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study. *Mol Hum Reprod* 6(9): 795-799, 2000.
108. Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S, McElreavey K, Scarselli G, Forti G. Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 14(7): 1717-1721, 1999.
109. Ansbacher R. Sperm-agglutinating and sperm-immobilizing antibodies in vasectomized men. *Fertil Steril* 22(10): 629-632, 1971.
110. Patrizio P, Silber SJ, Ord T, Moretti-Rojas I, Asch RH. Relationship of epididymal sperm antibodies to their in vitro fertilization capacity in men with congenital absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 58(5): 1006-1010, 1992.
111. Menge AC, Beitner O. Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil Steril* 51(3): 486-492, 1989.
112. Aydos K. Erkek İnfertilitesi. Campbell Üroloji. (Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, ed). 8'inci baskı. Baltimore, Saunders, 1475-1531, 2005.
113. Sinisi AA, Di FB, Pasquali D, Scurini C, D'Apuzzo A, Bellastella A. Prevalence of antisperm antibodies by Sperm MAR test in subjects undergoing a routine sperm analysis for infertility. *Int J Androl* 16(5): 311-314, 1993.
114. Hjort T. Antisperm antibodies. Antisperm antibodies and infertility: an unsolvable question? *Hum Reprod* 14(10): 2423-2426, 1999.
115. Aulitzky W, Frick J, Galvan G. Pulsatile luteinizing hormone-releasing hormone treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 50(3): 480-486, 1988.
116. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JA. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96(2): 273-288, 2011.
117. Mancini A, Guitelman A, Levalle O, Aparicio N, Aszenmil G. Bromocriptine in the management of infertile men after surgery of prolactin secreting adenomas. *J Androl* 5(4): 294-296, 1984.
118. Lombardo F, Gandini L, Dondero F, Lenzi A. Antisperm immunity in natural and assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 7(5): 450-456, 2001.
119. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 63(6): 1143-1157, 1995.

120. Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertil Steril* 66(5): 822-825, 1996.
121. Buchter D, Behre HM, Kliesch S, Nieschlag E. Pulsatile GnRH or human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin as effective treatment for men with hypogonadotropic hypogonadism: a review of 42 cases. *Eur J Endocrinol* 139(3): 298-303, 1998.
122. Liu PY, Handelsman DJ. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum Reprod Update* 9(1): 9-23, 2003.
123. Foss GL, Tindall VR, Birkett JP. The treatment of subfertile men with clomiphene citrate. *J Reprod Fertil* 32(1): 167-170, 1973.
124. Ronnberg L. The effect of clomiphene citrate on different sperm parameters and serum hormone levels in preselected infertile men: a controlled double-blind cross-over study. *Int J Androl* 3(5): 479-486, 1980.
125. Jones TM, Fang VS, Rosenfield RL, Schoenberg HW. Parameters of response to clomiphene citrate in oligospermic men. *J Urol* 124(1): 53-55, 1980.
126. Zeyneloğlu HB, Öktem M. Polikistik Over Sendromunda Ovulasyon İndüksiyonu. *Türkiye Jinekolojik ve Obstetrik Derneği Uzmanlık Sonrası Eğitim ve Güncel Gelişmeler* 2: 21-34, 2005.
127. Schill WB, Michalopoulos M. Treatment of male fertility disturbances. Current concepts. *Drugs* 28(3): 263-280, 1984.
128. Raman JD, Schlegel PN. Aromatase inhibitors for male infertility. *J Urol* 167(2 Pt 1): 624-629, 2002.
129. Vigersky RA, Glass AR. Effects of delta 1-testolactone on the pituitary-testicular axis in oligospermic men. *J Clin Endocrinol Metab* 52(5): 897-902, 1981.
130. Souza FM, Collett-Solberg PF. Adverse effects of growth hormone replacement therapy in children. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 55(8): 559-565, 2011.
131. Haidl G. Management strategies for male factor infertility. *Drugs* 62(12): 1741-1753, 2002.
132. Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, Gandini L. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 79(2): 292-300, 2003.
133. Schill WB. Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: results of a double-blind study. *Arch Androl* 2(2): 163-170, 1979.
134. Vicari E, La VS, Calogero AE. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculoepididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertil Steril* 78(6): 1203-1208, 2002.

135. Chiang PH, Tsai EM, Shen MR, Chang JC, Lin YC, Huang CH, Chiang CP. Effects of pentoxifylline in the hamster zona-free oocyte spermatozoa penetration assay and on spermatozoa transmembrane migration motility. *Eur Urol* 21(2): 151-154, 1992.
136. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 29(4): 817-827, 2002.
137. Schwarzer JU, Fiedler K, Hertwig I et al. Male factors determining the outcome of intracytoplasmic sperm injection with epididymal and testicular spermatozoa. *Andrologia* 35(4): 220-226, 2003.
138. Adamopoulos DA, Pappa A, Billa E, Nicopoulou S, Koukkou E, Michopoulos J. Effectiveness of combined tamoxifen citrate and testosterone undecanoate treatment in men with idiopathic oligozoospermia. *Fertil Steril* 80(4): 914-920, 2003.
139. Paradisi R, Busacchi P, Seracchioli R, Porcu E, Venturoli S. Effects of high doses of recombinant human follicle-stimulating hormone in the treatment of male factor infertility: results of a pilot study. *Fertil Steril* 86(3): 728-731, 2006.
140. Oates R. Evaluation of the azoospermic male. *Asian J Androl* 14(1): 82-87, 2012.
141. 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.
142. 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.
143. Schlegel PN. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America* (Werthman PE, ed). Saunders Company, 539-555, 1999.
144. 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.
145. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 14(1): 131-135, 1999.
146. Heseltine D, White MC, Kendall-Taylor P, de Kretser DM, Kelly W. Testicular enlargement and elevated serum inhibin concentrations occur in patients with pituitary macroadenomas secreting follicle stimulating hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 31(4): 411-423, 1989.
147. Bouloux P, Warne DW, Loumaye E. Efficacy and safety of recombinant human follicle-stimulating hormone in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 77(2): 270-273, 2002.

148. Al-Ansari AA, Khalil TH, Kelani Y, Mortimer CH. Isolated follicle-stimulating hormone deficiency in men: successful long-term gonadotropin therapy. *Fertil Steril* 42(4): 618-626, 1984.
149. Williams C, Wieland RG, Zorn EM, Hallberg MC. Effect of synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in a patient with the "fertile eunuch" syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 41(1): 176-179, 1975.
150. Melo CO, Silva DM, da Cruz AD. Challenges in clinical and laboratory diagnosis of androgen insensitivity syndrome: a case report. *J Med Case Reports* 5(1): 446-453, 2011.
151. Augarten A, Weissenberg R, Pariente C, Sack J. Reversible male infertility in late onset congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest* 14(3): 237-240, 1991.
152. Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN. Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *J Urol* 165(3): 837-841, 2001.
153. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340(8810): 17-18, 1992.
154. Schlegel PN, Li PS. Microdissection TESE: sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod Update* 4(4): 439-443, 1998.
155. 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.
156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. Nicopoulos 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.
160. 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.

161. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 12(8): 1688-1692, 1997.
162. 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 non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 17(9): 2356-2361, 2002.
163. Hibi H, Ohori T, Yamada Y, Honda N, Asada Y. Probability of sperm recovery in non-obstructive azoospermic patients presenting with testes volume less than 10 ml/FSH level exceeding 20 mIU/ml. *Arch Androl* 51(3): 225-231, 2005.
164. Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, Molero MD, Remohi J, Pellicer A. Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection: a chance of fertility in nonobstructive azoospermia. *J Urol* 160(6 Pt 1): 2063-2067, 1998.
165. Ramasamy R, Lin K, Gosden LV, Rosenwaks Z, Palermo GD, Schlegel PN. High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 92(2): 590-593, 2009.
166. Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, de Jong FH, Weber RF. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83(9): 3110-3114, 1998.
167. Ballesca JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fabreques F, de Osaba MJ, Ascaso C, Vanrell JA. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 15(8): 1734-1738, 2000.
168. Guthauser B, Bailly M, Bergere M, Wainer R, Ville Y, Selva J. Successful pregnancy and delivery after testicular sperm extraction despite an undetectable concentration of serum inhibin B in a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 77(5): 1077-1078, 2002.
169. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM et al. Best practice policies for male infertility. *J Urol* 167(5): 2138-2144, 2002.
170. Cajal SR. Sur les ganglions et plexus nerveux intestin (Abstract). *CR Soc Biol* 5: 217-223, 1893.
171. Cajal SR. Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres (Abstract). *Maloine* 2: 891-942, 1911.
172. Keith A. An account of six specimens of the great bowel removed by operation: with some observations on the motor mechanism of the colon. *Br J Surg* 2: 576-599, 1914.
173. Yamamoto M. Electron microscopic studies on the innervation of the smooth muscle and the interstitial cell of Cajal in the small intestine of the mouse and bat. *Arch Histol Jpn* 40(3): 171-201, 1977.
174. Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* 71: 1-130, 1982.

175. Ohkawa H. Sympathetic neuromuscular transmission in the smooth muscle of guinea-pig prostate gland. *Int J Fertil* 28(2): 68-77, 1983.
176. Imaizumi M, Hama K. An electron microscopic study on the interstitial cells of the gizzard in the love-bird (*Uroloncha domestica*). *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 97(3): 351-357, 1969.
177. McCloskey KD. Interstitial cells of Cajal in the urinary tract. *Handb Exp Pharmacol* 202: 233-254, 2011.
178. Young HM. Embryological origin of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 47(5): 303-308, 1999.
179. Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, Newgreen DF. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol* 180(1): 97-107, 1996.
180. Komuro T, Seki K, Horiguchi K. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch Histol Cytol* 62(4): 295-316, 1999.
181. Rumessen JJ. Identification of interstitial cells of Cajal. Significance for studies of human small intestine and colon. *Dan Med Bull* 41(3): 275-293, 1994.
182. Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 79(4): 958-963, 1992.
183. Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, Chorneyko K, Berezin I, Riddell RH. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 23(4): 377-389, 1999.
184. Torihashi S, Kobayashi S, Gerthoffer WT, Sanders KM. Interstitial cells in deep muscular plexus of canine small intestine may be specialized smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265(4 Pt 1): G638-G645, 1993.
185. Mikkelsen HB, Thuneberg L, Wittrup IH. Selective double staining of interstitial cells of Cajal and macrophage-like cells in small intestine by an improved supravital methylene blue technique combined with FITC-dextran uptake. *Anat Embryol (Berl)* 178(3): 191-195, 1988.
186. Komuro T, Tokui K, Zhou DS. Identification of the interstitial cells of Cajal. *Histol Histopathol* 11(3): 769-786, 1996.
187. Hanani M, Louzon V, Miller SM, Faussone-Pellegrini MS. Visualization of interstitial cells of Cajal in the mouse colon by vital staining. *Cell Tissue Res* 292(2): 275-282, 1998.
188. Ward SM, Burke EP, Sanders KM. Use of rhodamine 123 to label and lesion interstitial cells of Cajal in canine colonic circular muscle. *Anat Embryol (Berl)* 182(3): 215-224, 1990.

189. Xue C, Ward SM, Shuttleworth CW, Sanders KM. Identification of interstitial cells in canine proximal colon using NADH diaphorase histochemistry. *Histochemistry* 99(5): 373-384, 1993.
190. Fang S, Christensen J. Manganese superoxide dismutase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase colocalize in the rat gut. *Gastroenterology* 109(5): 1429-1436, 1995.
191. Werkstrom V, Ny L, Persson K, Andersson KE. Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *Br J Pharmacol* 120(2): 312-318, 1997.
192. Torihashi S, Ward SM, Sanders KM. Development of c-kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology* 112(1): 144-155, 1997.
193. Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, Nishi K, Kobayashi S, Sanders KM. C-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 280(1): 97-111, 1995.
194. Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* 115(2): 314-329, 1998.
195. Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 152(5): 1259-1269, 1998.
196. Cortesini C, Faussone Pellegrini MS, Romagnoli P. Ultrastructural modifications of the esophageal and gastric muscular coat in patients with achalasia (Abstract). *Boll Soc Ital Biol Sper* 53(8): 597-600, 1977.
197. Rumessen JJ. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submuscular border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 111(6): 1447-1455, 1996.
198. Langer JC, Berezin I, Daniel EE. Hypertrophic pyloric stenosis: ultrastructural abnormalities of enteric nerves and the interstitial cells of Cajal. *J Pediatr Surg* 30(11): 1535-1543, 1995.
199. Kenny SE, Vanderwinden JM, Rintala RJ, Connell MG, Lloyd DA, Vanderhaegen JJ, De Laet MH. Delayed maturation of the interstitial cells of Cajal: a new diagnosis for transient neonatal pseudoobstruction. Report of two cases. *J Pediatr Surg* 33(1): 94-98, 1998.
200. Yamataka A, Kato Y, Tibboel D et al. A lack of intestinal pacemaker (c-kit) in aganglionic bowel of patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 30(3): 441-444, 1995.

201. Turner WH, Brading AF. Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther* 75(2): 77-110, 1997.
202. Lang RJ, Exintaris B, Teele ME, Harvey J, Klemm MF. Electrical basis of peristalsis in the mammalian upper urinary tract. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25(5): 310-321, 1998.
203. Brading AF. The physiology of the mammalian urinary outflow tract. *Exp Physiol* 84(1): 215-221, 1999.
204. Burton LD, Housley GD, Salih SG, Jarlebark L, Christie DL, Greenwood D. P2X2 receptor expression by interstitial cells of Cajal in vas deferens implicated in semen emission. *Auton Neurosci* 84(3): 147-161, 2000.
205. Constantinou CE, Silvert MA, Gosling J. Pacemaker system in the control of ureteral peristaltic rate in the multicystic kidney of the pig. *Invest Urol* 14(6): 440-441, 1977.
206. Gosling JA, Dixon JS. Species variation in the location of upper urinary tract pacemaker cells. *Invest Urol* 11(5): 418-423, 1974.
207. Metzger R, Schuster T, Till H, Stehr M, Franke FE, Dietz HG. Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *J Urol* 172(2): 769-772, 2004.
208. Metzger R, Neugebauer A, Rolle U, Bohlig L, Till H. C-kit receptor (CD117) in the porcine urinary tract. *Pediatr Surg Int* 24(1): 67-76, 2008.
209. Pezzone MA, Watkins SC, Alber SM, King WE, de Groat WC, Chancellor MB, Fraser MO. Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(5): F925-F929, 2003.
210. Gillespie JJ, Markerink-van IM, de VJ. cGMP-generating cells in the bladder wall: identification of distinct networks of interstitial cells. *BJU Int* 94(7): 1114-1124, 2004.
211. Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR, de VJ. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience* 71(2): 337-348, 1996.
212. Davidson RA, McCloskey KD. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons. *J Urol* 173(4): 1385-1390, 2005.
213. Sui GP, Rothery S, Dupont E, Fry CH, Severs NJ. Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells. *BJU Int* 90(1): 118-129, 2002.
214. Wiseman OJ, Fowler CJ, Landon DN. The role of the human bladder lamina propria myofibroblast. *BJU Int* 91(1): 89-93, 2003.

215. Ost D, Roskams T, Van Der Aa F, De RD. Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J Urol* 168(1): 293-297, 2002.
216. Johnston L, Woolsey S, Cunningham RM, O'Kane H, Duggan B, Keane P, McCloskey KD. Morphological expression of KIT positive interstitial cells of Cajal in human bladder. *J Urol* 184(1): 370-377, 2010.
217. Kubota Y, Hashitani H, Shirasawa N, Kojima Y, Sasaki S, Mabuchi Y, Soji T, Suzuki H, Kohri K. Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn* 27(4): 330-340, 2008.
218. Rasmussen H, Rumessen JJ, Hansen A, Smedts F, Horn T. Ultrastructure of Cajal-like interstitial cells in the human detrusor. *Cell Tissue Res* 335(3): 517-527, 2009.
219. Brading AF, McCloskey KD. Mechanisms of Disease: specialized interstitial cells of the urinary tract--an assessment of current knowledge. *Nat Clin Pract Urol* 2(11): 546-554, 2005.
220. Sui GP, Wu C, Fry CH. Electrical characteristics of suburothelial cells isolated from the human bladder. *J Urol* 171(2 Pt 1): 938-943, 2004.
221. Hashitani H, Van Helden DF, Suzuki H. Properties of spontaneous depolarizations in circular smooth muscle cells of rabbit urethra. *Br J Pharmacol* 118(7): 1627-1632, 1996.
222. Lyons AD, Gardiner TA, McCloskey KD. Kit-positive interstitial cells in the rabbit urethra: structural relationships with nerves and smooth muscle. *BJU Int* 99(3): 687-694, 2007.
223. Garcia-Pascual A, Sancho M, Costa G, Triguero D. Interstitial cells of Cajal in the urethra are cGMP-mediated targets of nitrergic neurotransmission. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(4): F971-F983, 2008.
224. Biers SM, Reynard JM, Doore T, Brading AF. The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor. *BJU Int* 97(3): 612-616, 2006.
225. Kubota Y, Kajioka S, Biers SM, Yokota E, Kohri K, Brading AF. Investigation of the effect of the c-kit inhibitor Glivec on isolated guinea-pig detrusor preparations. *Auton Neurosci* 115(1-2): 64-73, 2004.
226. Ikeda Y, Fry C, Hayashi F, Stolz D, Griffiths D, Kanai A. Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(4): F1018-F1025, 2007.
227. Sui GP, Wu C, Roosen A, Ikeda Y, Kanai AJ, Fry CH. Modulation of bladder myofibroblast activity: implications for bladder function. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(3): F688-F697, 2008.
228. Roosen A, Datta SN, Chowdhury RA, Patel PM, Kalsi V, Elneil S, Dasgupta P, Kessler TM, Khan S, Panicker J, Fry CH, Brandner S, Fowler CJ, Apostolidis A. Suburothelial myofibroblasts in the human overactive bladder and the effect of botulinum neurotoxin type A treatment. *Eur Urol* 55(6): 1440-1448, 2009.

229. Piaseczna PA, Rolle U, Solari V, Puri P. Interstitial cells of Cajal in the human normal urinary bladder and in the bladder of patients with megacystis-microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome. *BJU Int* 94(1): 143-146, 2004.
230. Hashitani H, Suzuki H. Properties of spontaneous Ca^{2+} transients recorded from interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra in situ. *J Physiol* 583(Pt 2): 505-519, 2007.
231. van der AAF, Roskams T, Blyweert W, Ost D, Bogaert G, De RD. Identification of kit positive cells in the human urinary tract. *J Urol* 171(6 Pt 1): 2492-2496, 2004.
232. Eken A. Üreteropelvik bölge darlığında Cajal hücreleri. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Adana, 2009.
233. Kuzgunbay B. Unilateral distal üreter obstrüksiyonu yapılan sıçanların üreteropelvik bileşkelerindeki Cajal hücrelerinde meydana gelen değişiklikler. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Adana 2005.
234. Balıkcı Ö. Hidroüreteronefrozu olan ve olmayan hastaların böbrek pelvis ve proksimal üreterlerindeki cajal hücrelerinin değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Ana Bilim Dalı, Ankara, 2010.
235. Arena F, Nicotina PA, Arena S, Romeo C, Zuccarello B, Romeo G. C-kit positive interstitial cells of Cajal network in primary obstructive megaureter. *Minerva Pediatr* 59(1): 7-11, 2007.
236. Jeanes A, Wilhelm D, Wilson MJ, Bowles J, McClive PJ, Sinclair AH, Koopman P. Evaluation of candidate markers for the peritubular myoid cell lineage in the developing mouse testis. *Reproduction* 130(4): 509-516, 2005.
237. Roskoski R, Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 337(1): 1-13, 2005.
238. Bustos-Obregon E, Costa del Rio F, Sarabia L. Morphometric Analysis of Mice Testicular Tubules after Administration of Malathion and Maca. *Int J Morphol* 25(2): 245-248, 2007.
239. Espinoza-Navorro O, Vilaxa A, Granifo L, Rojas S, Rodriguez H. Histological study on the male reproductive organs of mouse CF1 treated with boron. *Int J Morphol* 25(2): 341-346, 2007.
240. Der-Silaphet T, Malysz J, Hagel S, Larry AA, Huizinga JD. Interstitial cells of cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 114(4): 724-736, 1998.
241. Gosling JA, Dixon JS. Structural evidence in support of an urinary tract pacemaker. *Br J Urol* 44(5): 550-560, 1972.
242. Lang RJ, Hashitani H, Keller S, Takano H, Mulholland EL, Fukuta H, Suzuki H. Modulators of internal Ca^{2+} stores and the spontaneous electrical and contractile activity of the guinea-pig renal pelvis. *Br J Pharmacol* 135(6): 1363-1374, 2002.

243. Arrighi S, Bosi G, Groppetti D, Cremonesi F. Identification of C-kit-positive interstitial cells in the dog lower urinary tract and relationship with smooth muscle and nerves. Hypotheses for a likely pacemaker role. *Vet Med Int* 2010; 2010.
244. Mamas MA, Reynard JM, Brading AF. Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. *Urology* 61(6): 1079-1085, 2003.
245. Goddard NC, McIntyre A, Summersgill B, Gilbert D, Kitazawa S, Shipley J. Kit and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. *Int J Androl* 30(4): 337-348, 2007.
246. Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T, Nishikawa S. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 113(2): 689-699, 1991.

