



Oligoastenospemik İnfertil Hastalarda Varikosel Saptanan ve Varikosel Saptanmayan Grupların Mitokondrial DNA Delesyonlarının Araştırılması

Arslan ARDIÇOĞLU¹
Faruk KUYUCU¹
Ebru ETEM²
M.Kemal ATİKELER¹
İmed DUKSAL¹
Ömer Ali UYAR¹
Hüseyin YÜCE²

¹ Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Elazığ -TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 20.07.2006
Kabul Tarihi : 21.08.2006

Yazışma Adresi
Arslan ARDIÇOĞLU,
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, 23119 Elazığ-TÜRKİYE

arslanardicoglu@hotmail.com

Erkeğe bağlı infertilite nedenleri içinde en sık görülen varikoseldir. Bu çalışmada varikosel ile birlikte veya varikosel olmaksızın oligoastenospemik saptanan infertil hastaların, mitokondrial DNA (mtDNA)'daki 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar açısından normospermik kontrol grubu ile karşılaştırılması amaçlandı.

Oligoastenospemik saptanan varikoselli (V+) 20 hasta ve varikosel saptanmayan (V-) oligoastenospemik 20 hasta ile kontrol grubu olarak da normospermik 20 hasta çalışmaya dahil edildi. DNA izolasyonu ejakülat örneklerinden yapıldı. mtDNA'daki 7345bp ve 7599bp'lik delesyonların tespitinde primer shift Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanıldı.

Varikosel tespit edilen oligoastenospemik grup ve kontrol grubu 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında, her iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0.009$ ve $p=0.019$). Varikosel tespit edilmeyen oligoastenospemik grup ve kontrol grubu 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında da her iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.011$ ve $p=0.009$). V(+) ve V(-) gruplar 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar açısından karşılaştırıldığında ise sırasıyla her iki delesyon açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P=0.02$ ve $P=0.042$).

Çalışmamızda mtDNA delesyonlarının özellikle varikosel tespit edilmeyen oligoastenospemik infertil hastalarda daha sık olduğu bulunmuştur. Varikosel tespit edilen infertil hasta grubunda da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, mtDNA delesyonu, Varikosel.

Investigation of Mitochondrial DNA deletions in Oligoasthenospermic Infertile Patients with and without Varicocele

The most common cause of male infertility is varicocele. In the present study we aimed to investigate the mitochondrial deletions in the control fertile group compare to the oligoasthenospermic infertile patients with varicocele and without varicocele according to their 7345 bp and 7599 bp deletions in the mitochondrial DNA.

Twenty oligoasthenospermic patients with varicocele (V+), 20 oligoasthenospermic patients without varicocele (V-) and 20 normospermic controls are included to the study. The DNA isolation is performed by using ejaculate samples. Primary shift polymerase chain reaction method is performed in order to detect the 7345 bp and 7599 bp deletions.

After comparison of 7345bp and 7599bp deletions a significant difference was revealed between the oligoasthenospermia group with varicocele and the control group ($p=0.009$ and $p=0.019$). Also, a significant difference was shown after comparison of 7345bp and 7599bp deletion between the oligoasthenospermia group without varicocele and the control group ($p=0.011$ and $p=0.009$). The comparison of 7345bp and 7599bp deletions between the oligoasthenospermia groups with and without varicocele showed a significant difference, too ($p=0.02$ and $p=0.042$).

In our study it was shown that mtDNA deletions are more common especially in the oligoasthenospermia group without varicocele. After comparing the infertile

oligoasthenospermia group with the control, it was shown that deletions were more commonly detected in the infertile varicocele group than the control group.

Key Words: Infertility, mtDNA deletions, Varicocele.

Giriş

Tüm infertilite olgularının % 30-50'sinde erkek faktörü bulunduğu için erkek infertilitesi önemli bir tıbbi problem olarak kabul edilmektedir (1). Pleksus pampiniformisin patolojik dilatasyonu şeklinde tanımlanan varikozel infertilite araştırması nedeniyle başvuranların ortalama % 30-40'ında saptanmaktadır (2, 3, 4). Varikozel semen parametrelerinde Oligozoospermi, Astenozoospermi, Teratozoospermi gibi bozukluklara neden olmaktadır (4). Erkeklerin % 30-40'ında anormal sperm üretim nedeni tam olarak ortaya konamamaktadır.

Genetik değişkenliklerin ağır infertilite olgularının büyük kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir (5). İnfertil ve subfertil erkeklerde kromozomal bozukluklar sık olarak bulunabilmektedir; normal populasyonda % 0.5 civarında bulunan bu durum 9766 infertil erkeğin değerlendirildiği bir çalışmada % 5.8 civarında bildirilmiştir (5).

Mitokondri ökaryot hücrelerin enerji metabolizmasında önemli rol oynamakta ve sperm oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile sağlanan enerji ile hareket etmektedir. mtDNA OXPHOS enzimatik kompleksinin bir kısım alt ünitelerini kodlamaktadır (6). mtDNA'da 7345 ve 7599bp'lik delesyonlar pek çok yapısal genin delesyonuna veya kısmi kaybına (ATPase 6/8, COIII, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6, Cytb, ve 8 tRNA geni) neden olmaktadır (6). Bu mtDNA genlerinin kaybı solunum zincirinde eksikliklere neden olabilmektedir. Delesyonlu mtDNA bölgesinden kodlanan proteinleri içeren defektli solunum zincir proteinleri serbest oksijen radikalleri oluşumunu arttırmakta ve sonuçta oksidatif hasar ortaya çıkmaktadır. Spermatozoaların plazma membranları doymamış yağ asitlerinden zengin olduğu için oksidatif hasardan diğer hücrelerle karşılaştırıldığında daha fazla etkilenmektedirler (7,8). Kao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mtDNA delesyonunun insan sperm hareket azlığı ve infertilite ile ilişkili olduğu saptanmıştır (9).

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

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji polikliniğine infertilite nedeniyle başvuran ve aynı laboratuvar teknisyeni tarafından 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası alınan semen örneklerindeki spermogram çalışmasında, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre oligoastenospermi tespit edilen hastalar dahil edildi.

Hastalar varikozel olan ve varikozel olmayan olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Normal sperm parametrelerine sahip 20 hasta da kontrol olarak kullanıldı. Hastalardan alınan ejakulat örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Hastaların hormon profili (FSH, LH, Total Testosteron, Prolaktin, Estradiol) taranarak normal hormon profiline sahip hastalar çalışmaya alındı. Hastalardan alınan semen örneklerinden DNA ekstraksiyonu Pure Gene DNA izolasyon kitinin protokolüne göre yapıldı. mtDNA'daki 7345bp ve 7599bp'lik mutasyonların tespiti için Kao ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı (7). Her bir hasta için PZR ürünü 3 µl hasta DNA'sı, 6 µl MgCl₂, 6 µl 10X buffer, 6 µl dNTP (2.5mM), 1 µl primer 1 (30pmol), 1 µl primer 2 (30pmol), 0.3 U Taq DNA polimeraz ve 19.7 µl ddH₂O içerecek şekilde hazırlandı. PZR koşulları 94°C'de 5 dakika, denatürasyon için 94°C'de 40 saniye, yapışma için 60°C'de 40 dakika, uzatma için 72°C'de 40 dakika olmak üzere toplam 35 döngü ile gerçekleştirildi. En son döngüdeki uzatma periyodu 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Elde edilen PZR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde yürütüldü.

İstatistiksel analiz SPSS programında Mann Whitney-U Testi ile değerlendirildi. P<0.05 ise sonuçlar anlamlı olarak değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmaya kontrol grubu olarak alınan 20 hastanın yaşları ortalama 33±7 (26- 40), varikozel negatif 20 bireyin yaşları ortalama 33,5±5,5 (28-39) ve varikozel pozitif 20 hastanın yaşları ise ortalama 34±9(25-43) olarak tespit edildi.

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

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

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

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

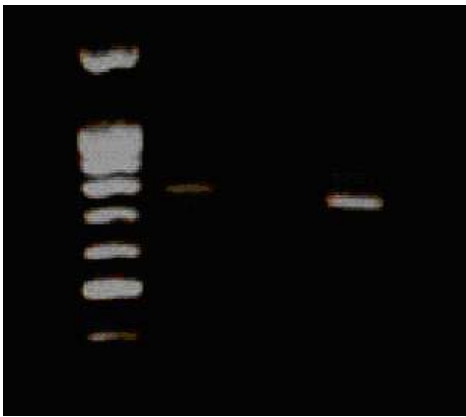
Tablo1'de olgular ve tespit edilen delesyonlar gösterilmiştir.

Tablo 1. V(+) ve V(-) gruplarda 7345bp ve 7599bp'lik delesyonlar.

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

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

Şekil 1'de primer shift PCR kullanılarak 7345 ve 7599 mtDNA delesyonlarının varlığı gösterilmiştir.



Şekil 1. 7345bp ve 7599bp'lik mtDNA delesyonlarının gösterimi. Sütun 1: DNA boyut markırı, Sütun 2 ve 4: 756bp ve 702bp'lik ürünler (7345bp'lik delesyon için), Sütun 3: 555bp'lik ürün (7599bp'lik delesyon için).

Tartışma

Defektif sperm fonksiyonu erkek infertilitesinin en sık karşılaşılan nedenlerindendir (7). Erkek infertilitesi astenospermi veya oligoastenospermi ile beraberlik göstermektedir. Her iki durumda da mtDNA'da nokta mutasyonları ve büyük delesyonlar tespit edilmiştir (10). Delesyonlu mtDNA bölgesinden kodlanan proteinleri içeren defektli solunum zincir proteinleri serbest oksijen radikalleri oluşumunu arttırmakta ve sonuçta oksidatif hasar ortaya çıkmaktadır. Spermatozoaların plazma membranları doymamış yağ asitlerinden zengin olduğu için oksidatif hasardan diğer hücrelerle karşılaştırıldığında daha fazla etkilenmektedirler (7). Mitokondrial disfonksiyona endojen ve ekzojen serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasar ve mtDNA mutasyonlarının neden olabileceği gösterilmiştir (8).

Pek çok çalışmada 4977bp'lik delesyon ve sperm disfonksiyonu arasındaki ilişkiler incelenmiştir. 4977bp'lik delesyonun incelendiği 2 çalışmada farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalardan ilkinde 4977bp'lik delesyonun düzeyi ve ayrılmış sperm fraksiyonlarındaki hareketliliğin derecesi arasında negatif bir ilişki bulunmuştur (9). Diğer çalışmada ise semen örnekleri analiz edilmiş ve sperm patolojisiyle delesyon arasında herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir (11). Kao ve arkadaşları 7599bp'lik mtDNA delesyonunu normal fertil kişilerin %11'inde, primer infertililerin %83.3'ünde ve sekonder infertililerin %42.8'inde tespit etmişlerdir (7). Çalışmamızda 7345 ve 7599bp'lik mtDNA delesyonları Varikosel (-) infertil grupta sırasıyla %60 ve %55, Varikosel (+) infertilite grubunda %25 ve %20 oranlarında, sağlıklı kontrolde %20 ve %15 oranlarında tespit edilmiştir.

Lestienne ve arkadaşları oligoastenospermili hastalarda yaptıkları çalışmada mtDNA'da pek çok delesyonunun varlığını tespit etmişlerdir. Özellikle intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) programlarına alınan bireylerde mtDNA delesyonlarının araştırılmasının gerekli olduğunu belirtmişlerdir (12). Sperm mtDNA'sının PZR ile amplifikasyonu, fertil bireylerle karşılaştırıldığında, infertil ve subfertil erkeklerde mtDNA delesyonlarının yüksek insidansını göstermektedir (13). Çalışmamızda da Varikosel (-) ve Varikosel (+) infertilite gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla mtDNA delesyonlarına sahip olduğu gösterilmiştir.

Smith ve arkadaşları varikoselli hastaların semen örneklerindeki total oksidatif stres ve sperm DNA hasarı arasında bir ilişkinin bulunduğunu belirtmişlerdir (14). Chen ve arkadaşları 4977bp'lik mtDNA delesyonunu oligospermili grupta %47.3, oligoastenospermili grupta %17.7 oranında tespit etmişlerdir. Seminal oksidatif streste artışla mtDNA 4977bp'lik delesyon arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir (15). Bu çalışmada varikosel sonucu oluşan infertil hastalarda mtDNA delesyonlarının sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında arttığı tespit edilmiştir. Weese ve arkadaşları kontrol bireylerle karşılaştırıldığında Reaktif Oksijen Türleri (ROT)'nın varikoselli infertil ve fertil erkeklerde arttığını tespit etmişlerdir (16). Varikoselli hastaların spermatozoalarında oksidatif hasar bu bireylerdeki belirli

antioksidanların hücredeki yetersizliğinden dolayı artabilir. Sharma ve arkadaşları varikoselli hastalarda kontrollerle karşılaştırıldığında total ROT'un yüksek antioksidan kapasitenin düşük olduğunu belirtmişlerdir (17). Hendin ve arkadaşları varikosel öncesi ve sonrası ROT ölçümlerini yapmışlar ve varikoselde ROT'un arttığını tespit etmişlerdir (18). ROT nükleer DNA'da hasar meydana getirebileceği gibi mtDNA'da da benzer şekilde hasara neden olabilmektedir (16). Çalışmamızda V(+) grupta, V(-) oligoastenospermik gruptan mtDNA delesyonlarının daha az oranda görülmesi, varikoselde

infertilite etyolojisinin birçok kompleks mekanizma üzerinden oluştuğunu göstermektedir.

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

Kaynaklar

- Leifke E, Nieschlag E: Male infertility treatment in the light of evidence-based medicine. *Andrologia* 1996; 28: 23.
- Kendirici M, Boylu U, Miroğlu C: Andrologic surgery of the 15th century. in *Cerrahiyetü'l Haniyye. The History of Male-Female Sexuality and Fertility in Asia Minör*. (Eds: Kendirci M, Kadioğlu A, Miroğlu C), İstanbul, 2003; 127-148.
- Hendry VVF, Sommerville IF, Hail RR et al.: Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol* 1973; 45: 684-692.
- Cockett ATK, Takihara M and Cosentino MJ. The varicocele. *Fertil Steril* 1984; 41:1-12.
- Rucker GB, Mielnik A, King P, Goidstein M, Schlegel PN: Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction. *J Urol* 1998; 160:2068.
- Carra E, Sangiorgi D, Gattuccio F. Male infertility and mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Com* 322 (2004); 333-339.
- Kao SH, Chao HT, Wei YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* vol.4 no.7 pp. 657-666, 1998.
- Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):514-9.
- Kao SH, Chao HT, Wei YH. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol. Reprod.* 52 (1995) 729-736.
- Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61, 953-960.
- St John JC, Sakkas D, Barratt CL. A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J Androl.* 2000;21:189-199.
- Lestienne P, Reynier P, Chretien MF, Penisson-Besnier I, Malthiery Y, Rohmer V. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA Rearrangements. *Molecular Human Reproduction* 1997; 3(9); 811-814.
- Carra E, Sangiorgi D, Gattuccio F. Male infertility and mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Com* 322 (2004); 333-339.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod.* 2005; 16; 256-262.
- Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wei YH. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod.* 2002; 17(3):718-25.
- Weese DL, Peaster ML, Himsi KK, Leach GE, Lad PM, Zimmern PE. Stimulated reactive oxygen species generation in the spermatozoa of infertile men. *J Urol.* 1993; 149(1):64-7.
- Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod.* 1999;14(11):2801-7.
- Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol.* 1999;161(6):1831-4.