

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜRK POPULASYONUNDA ERKEK FAKTÖRLÜ İNFERTİLİTEDE
KROMOZOMAL ANOMALİ VE Y KROMOZOM MİKRODELESYONLARI
İNSİDANSININ BELİRLENMESİ

DR. GÜLAY GÜLEÇ CEYLAN
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. HALİT ELYAS

BU ÇALIŞMA FÜBAP TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.

(PROJE NO:1186)

ELAZIĞ-2007

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.
DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....

.....

.....**Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

Canım Aileme

TEŞEKKÜR

Araştırma görevlisi olarak çalıştığım sürede eğitimime olan katkıları ve tez hazırlığı sırasında esirgemediği yardımları nedeniyle danışman hocam Sayın Prof. Dr. Halit ELYAS'a, yönlendirmeleri için Yrd. Doç.Dr. Hüseyin YÜCE'ye, tez çalışmalarım boyunca sürekli desteğini gördüğüm eşim Dr. Cavit CEYLAN'a, ihtiyaç duyduğumda yanımda olan bölüm arkadaşlarıma ve canım aileme teşekkür etmeyi bir borç biliyorum. Ayrıca ihtisas sürem boyunca bana en büyük mutluluğu yaşatan kızlarıma da teşekkür ederim.

5. İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	
2. ABSTRACT	
3. GİRİŞ	1
3.1. İnfertilite	1
3.1.1. İnfertilitenin Tanımı	1
3.1.2. Kadın İnfertilitesi	1
3.1.2.1. Oosit üretimindeki anormallikler (Ovulatuvar fonksiyonlar)	3
3.1.2.2. Anatomik faktörler (Uterin ve tubal faktörler).....	3
3.1.2.3. Servikal Faktörler	3
3.1.2.4. İmmunolojik faktörler	3
3.1.2.5. Genetik nedenler	4
3.1.2.6. Açıklanamayan infertilite	4
3.1.3. Erkek İnfertilitesi	4
3.1.3.1. Erkek İnfertilitesinde Genetik Nedenler	6
3.1.3.2. Erkek Genital Sisteminin Embriyolojisi	7
3.1.3.3. Spermatogenez ve Genetik Kontrolü	8
3.2. X Ve Y Kromozomlarının Karşılaştırılması	12
3.3. Y Kromozomu Ve Fertilite.....	13
3.3.1. Testis Belirleyici Faktör (TDF)	15
3.3.2. Azospermi faktörü (AZF).....	16

3.3.2.1. AZFa.....	18
3.3.2.2. AZFb	18
3.3.2.3. AZFc.....	19
3.3.3. Y Delesyon Mekanizması	20
3.3.4. Y Kromozomu Moleküler Tarama Endikasyonları.....	21
3.3.5. Y Delesyonu Taramasında Sekans Tagged Sites (STS) Seçiminin Prensipileri.....	23
3.4. İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI)	24
3.5. Fertilitede Kromozomların Yeri ve Kromozomal Anomaliler.....	24
3.5.1. Sayısal Seks Kromozom Anomalileri	25
3.5.1.1. Klinefelter Sendromu	26
3.5.1.2. 47,XYY Sendromu	27
3.5.1.3. Miks Gonadal Disjenezi	28
3.5.1.4. Otozomal Anöploidiler.....	28
3.5.2.Yapısal Kromozom Anomalileri	29
3.5.2.1. Robertsonian ve Resiprokal Translokasyonlar.....	29
3.5.2.2. Otozomal İnversiyonlar	30
3.5.2.3. 46,XX erkek sendromu.....	30
3.6. Genotip/Fenotip Korelasyonu	31
3.7. Çalışmanın Amacı	32
4. GEREÇ ve YÖNTEM	
4.1. Hastaların Seçimi	
4.2. Sitogenetik Preparatlarının Hazırlanması.....	35

4.2.1. Kullanılan Solüsyonlar, Araç ve Gereçler.....	35
4.2.2. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	36
4.2.3. Periferik Kan Kültür Ortamının Hazırlanması	36
4.2.4. Hazırlama İşlemleri	37
4.3. Moleküler Çalışmalar	37
4.3.1. Örneklerin toplanması ve analize hazırlanması	37
4.3.2. Kimyasal maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar	38
4.3.3. DNA İzolasyonu	39
4.3.4. PCR Protokolü.....	40
4.3.5. Oligonükleotidler (primerler)	40
4.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	42
4.3.7. PCR Optimizasyonu	43
4.3.8. Agaroz Jel Elektroforezi.....	43
4.4. İstatistiksel Analiz	44
5. BULGULAR	45
6. TARTIŞMA	57
7. KAYNAKLAR	71
8.ÖZGEÇMİŞ	83

6. TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri	34
Tablo 2: Çalışmada kullanılan primerlerin nükleotid sekansları.....	41
Tablo 3: Hasta gruplarına göre tespit edilen karyotipler	46
Tablo 4: Hasta bireylerde tespit edilen sitogenetik anomaliler	47
Tablo 5: 11 hastada tespit edilen Yq11 mikrolelesyonları	51
Tablo 6: Yq11 mikrolelesyonlarının AZF bölgelerine göre dağılımı	51
Tablo 7: Yq11 mikrolelesyonlu hastaların klinik bulguları	52
Tablo 8: Azospermik, oligospermik ve normospermik infertil hasta bireylerde elde edilen kromozomal anomali ve Y kromozom mikrolelesyon frekansları	55
Tablo 9: Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması.....	56

7. ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: 47,XYX karyotipi tespit edilen olgunun metafaz plağı	48
Şekil 2: 46, XY,Yqh(+) karyotipi tespit edilen olgunun metafaz plağı	48
Şekil 3: 46,XY, inv(9)(p11q13) karyotipi tespit edilen olgunun metafaz plağı....	49
Şekil 4: 46,XY, inv(9)(p11q13), inv(9)(p11q13) karyotipi tespit edilen olgunun metafaz plağı.	49
Şekil 5: Y kromozom mikrolelesyonu bulunmayan bir olgunun analizine yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	53
Şekil 6: sY255 (AZFc) bölgesinde delesyon saptanan 5 nolu azospermik hastanın agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	54

8. KISALTMALAR LİSTESİ

WHO :	Dünya Sağlık Örgütü
USG :	Ultrasonografi
HSG :	Histerosalpingografi
FSH :	Folikül Stimulan Hormon
LH :	Lüteinizan Hormon
SCOS :	Sertoli Cell Only Sendromu
DNA :	Deoksiribonükleik Asit
TDF :	Testis Determining Factor (testis belirleyici faktör)
SRY :	Sex Determining Region of Y (Y kromozomu cinsiyet belirleyici faktör)
TESE :	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
ICSI :	İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu
INOA :	İdyopatik Nonobstruktif Azospermi
MSY :	Male Spesifik Region of Y (Y'nin erkek spesifik bölgesi)
PABY1:	Y kromozomu kısa kolu üzerinde yer alan psödootozomal sınır
PABY2:	Y kromozomu uzun kolu üzerinde yer alan psödootozomal sınır
Yp :	Y kromozomu kısa kolu
Yq :	Y kromozomu uzun kolu
DYS1 :	Y kromozomu proximal uzun kol üzerinde bulunan ökromatik bölge
DYZ :	Y kromozomu distal uzun kol üzerinde bulunan heterokromatik bölge
LINE :	Long Interspersed Nuclear Elements (Uzun tekrar elemanları)
SINE :	Short Interspersed Nuclear Element (Kısa tekrar elemanları)

HMG :	High Mobility Group
SRVX :	X'e Bağlı Cinsiyet Dönüştürücü Lokus
AZF :	Azospermi Faktörü
STS :	Sequence Tagged Sites (İşaretli Sekans Bölgeleri)
ZFY :	Zinc Finger Protein (Y'ye bağlı)
DDFRY:	Drosophila Fat Facets Related Y
DBY :	Dead Box Polypeptide Y
DAZ :	Deleted in Azoospermia
RBMV:	Y Kromozomu Üzerinde Yer Alan RNA Bağlayıcı Motif
PCR :	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NOR :	Nükleolar Organize Edici Bölgeleri
RNA :	Ribonükleik Asit
IVF :	İn Vitro Fertilizasyon
EAA :	Avrupa Androloji Akademisi
EMQN:	Avrupa Moleküler Genetik Kalite Birliği

1. ÖZET

İnfertilite, çiftlerin en az bir yıl süreyle, hiçbir kontrasepsiyon yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen, çocuk sahibi olamama durumudur ve üretken çağdaki çiftlerin %10-15'inde görülen major bir sağlık problemidir. Erkek faktörü, infertil çiftlerin yaklaşık olarak %50'sinden sorumludur. İnsan Y kromozomu, spermatogenez için gerekli olan ve gonadal farklılaşmanın testis yönünde gelişmesi için gerekli olan genleri içermektedir. Bu çalışmanın temel amacı, ciddi erkek faktör infertilitesi olan hastalarda ve fertil kontrol grubunda hem kromozomal anomali hem de Y kromozom mikrodelesyonlarının frekansını ve tipini belirlemektir. Çalışmada 90 infertil hasta, 75 fertil erkek kontrol grubu olarak incelendi. 90 infertil hastadan 30'u nonobstruktif azospermik, 30'u oligospermik, 30'u ise normospermik infertil hasta idi. Bunlardan 5 azospermik hastada (%16.7), 4 ciddi oligospermik hastada (%13.3), 2 de normospermik infertil hastada (%6.7) Y kromozom mikrodelesyonu saptandı. AZFc lokusu en fazla delesyona uğrayan bölge (%63.6) idi. 10 azospermik, 4 oligospermik, 3 de normospermik infertil hastada kromozomal anomali tespit edildi. 75 fertil erkek ise genetik olarak normal bulundu. Sonuç olarak çeşitli kromozomal anomaliler ve Y kromozom mikrodelesyonları infertiliteye neden olabilir, bu yüzden infertil hastalara genetik inceleme mutlaka önerilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi, Y kromozom mikrodelesyonu, kromozomal anomali.

2. ABSTRACT

THE DETERMINATION OF THE FREQUENCY OF CHROMOSOMAL ABNORMALITIES AND Y CHROMOSOME MICRODELETIONS IN MALE FACTOR INFERTILITY IN TURKISH POPULATION

Infertility is defined as an inability to conceive a child after one year of regular unprotected intercourse and it is a major health problem affecting about 10-15% of all the couples. Infertility is due to a male factor in approximately 50% of cases. Human Y chromosome contains genes necessary for gonadal differentiation into a testis and genes for full spermatogenesis. The main purpose of this study is to detect the frequency and type of both chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in patients with severe male factor infertility and fertile control subjects. This study was carried out in 90 infertile and 75 fertile men. Results of 90 patients, 30 had nonobstructive azoospermia, 30 had oligozoospermia and 30 had normozoospermia. 5 out of 30 (16.7%) azoospermic patients, 4 out of 30 (13.3%) oligozoospermic patients and 2 out of 30 (6.7%) normozoospermic patients had Y chromosome microdeletions. AZFc locus (63.6%) was the most frequently deleted region. 10 cases with azoospermia, 4 cases with oligozoospermia and 3 cases with normozoospermia had chromosomal abnormalities. 75 men with proven fertility were genetically normal. As a result, various chromosomal abnormalities and deletions of Y chromosome can cause infertility, therefore genetic screening must be suggested to infertile patients.

Key words: Male infertility, Y chromosome microdeletion, chromosomal abnormality.

3. GİRİŞ

3.1. İnfertilite

3.1.1. İnfertilitenin Tanımı

İnfertilite, çiftlerin en az bir yıl süreyle, hiçbir kontracepsiyon yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen, çocuk sahibi olamama durumudur. Daha önce hiç gebelik oluşmamışsa, primer infertilite, canlı doğumla sonuçlansın ya da sonuçlanmasın, en az bir gebelik oluşmuşsa, sekonder infertilite denir (1). İnfertilite, üretken çağıdaki çiftlerin %10-15'inde görülen major bir sağlık problemi (2,3). İnfertilite olgularının yaklaşık üçte biri erkek, üçte biri kadın ve üçte biri de her ikisindeki patolojilerden kaynaklanır. Bu nedenle erkek faktörü infertil çiftlerin en azından %50'sinden sorumludur. Değerlendirme ve tedavide çifti bir birim olarak kabul etmek ve önemli bir sorun ortaya çıkana kadar paralel araştırmalar yürütmek infertilite değerlendirmesinde çok önemlidir (4). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) standart tanısal protokolleri kullanarak oluşturduğu verilere göre ise infertil çiftlerin %37'sinde kadın faktörü; %8'inde erkek faktörü, %35'inde her iki faktör birden bulunmuş, %5'inde de nedeni belirlenememiştir. %15'i gözlem sırasında gebe kalmıştır (1). İnfertilite nedeniyle incelenen çiftler çoğunlukla subfertilidir ve bu subfertil çiftlerin çoğunda da birden fazla infertilite faktörü vardır. Bu nedenle çiftin incelemesi tüm infertilite faktörlerini aydınlatma yönünde olmalıdır (5).

3.1.2. Kadın İnfertilitesi

Kadın infertilitesi nedenleri %40 ovulasyon bozukluğu, %40 tubal ve pelvik patoloji, %10 nedeni açıklanamayan infertilite, %10 ise diğer nedenlere (anatomik,

enfeksiyöz, endokrin, çevresel faktörlere) bağlı oluşurlar (6). Kadın infertilitesinin sebebini belirlemede yapılan testler hormon profili, postkoital test (servikal mukusun değerlendirilmesi), bazal vücut ısısı takibi, endometrial biyopsi, luteal faz progesteron ölçümü (ovulasyonun değerlendirilmesi), ultrasonografi (USG), histerosalpingografi-histeroskopi (HSG) ve laparaskopidir (uterus, tuba, over anatomisinin değerlendirilmesi) (6). Kadında ilerleyen yaşla beraber over rezervi, overin gonadotropinlere verdiği cevap ve tedavi başarısı olumsuz etkilenir ve anöploidi oranı artar. Daha önce termde gebeliği olanlar genital organların intrauterin gelişim için yeterli olabileceğini gösterebilir. Düşük, postpartum ve postoperatif komplikasyonlar kadın fertilitatesini engelleyebilir. Menstruasyon düzeni ve son adet tarihi, hipotalamus, hipofiz, overler ve endometrium aksının düzeni hakkında bilgi verir. Tedavi edilmemiş hastalarda spontan gebelik oluşumunda infertilite süresi major bir faktördür. Bu hastalarda üreme sisteminde organik bir problem ya da germ hücrelerinde fonksiyonel bir sorun olabilir. Sistemik hastalık varlığının ve özellikle galaktore, hirsutismus gibi şikayetlerin sorgulanması gereklidir. Kadın partnerin sigara içiciliği, bir menstrüel siklusta, gebe kalabilme olasılığını yani fekdabiliteyi olumsuz yönde etkilemektedir. Operasyon sonrası oluşabilecek adhezyonlardan enfeksiyonlara kadar geniş bir yelpaze oluşturan problemler tedaviyi ve sonuçlarını etkileyebilir (7).

Kadında fekdabiliteyi etkileyen durumlar şu şekilde incelenebilir:

3.1.2.1. Oosit üretimindeki anormallikler (Ovulatuar fonksiyonlar)

Kadın infertilitesinin en sık nedeni olup (%27) oosit üretimi ile ilgili en sık rastlanılan durumlar anovülasyon, oligoovülasyon, over foliküllerinin yaşlanmasıdır. Bazı testler kullanılarak ovülasyonunun olup olmadığı tespiti yapılabilir (7).

3.1.2.2. Anatomik faktörler (Uterin ve tubal faktörler)

İnfertil çiftlerin yaklaşık %20 sinde tubal ya da peritoneal faktör sorumludur. Pelvik inflamatuvar hastalıklar, apendisit, septik abortus, önceki tubal cerrahi, pelvik enfeksiyona neden olan rahim içi araç kullanımı, Chlamidya trachomatis ile subklinik pelvik enfeksiyonlar tubal hastalığa katkıda bulunurlar. Tubal durumu değerlendirmek için en çok kullanılan testler HSG ve laparoskopidir (5,7).

3.1.2.3. Servikal Faktörler

Sperm ile servikal mukus etkileşiminin değerlendirilmesi infertilite incelemesinin bir bölümünü oluşturmaktadır. Servikal mukus spermin penetre olabilmesi için gerekli şartlara sahip olmalıdır. Spermin geçişine izin verecek olan preovulatuar mukus ince, berrak, aselüler, miktarı artmış ve alkali özellikte olmalıdır (5).

3.1.2.4. İmmunolojik faktörler

İnfertil kadınlarda otoantikör oranı fertil kadınlardan çok daha fazla bulunmuştur (%15-45 e karşın %1-4) (7).

3.1.2.5. Genetik nedenler

Turner sendromu, X kromozomu translokasyon ve delesyonu, fertilite ve fekonidabilite ile ilgili genlerdeki mutasyonlar (FSH, LH reseptör mutasyonu vb.), galaktozemi gibi enzim eksiklikleri infertilite nedenleri arasındadır (7).

3.1.2.6. Açıklanamayan infertilite

Komplet infertilite değerlendirmesinde spesifik neden tespit edilemeyen duruma açıklanamayan infertilite denir. Bu hastaların tedavi edilmediği takdirde 3 yıl içinde gebe kalma oranı %30'dur (7).

3.1.3. Erkek İnfertilitesi

İnfertil çiftlerin yaklaşık %50'sinde, fertilitiyi sağlayacak yeterli sayıda spermatozoa üretemeyen erkek partnere ait nedenlerden dolayı infertilite (erkek faktörlü infertilite) gelişmektedir (8). Hormon üretimindeki bozukluklar, testiküler yapı, ejakulasyon ve/veya spermatozoanın kendisi konsepsiyon şansını zıt yönde etkileyebilir (9). İnfertil popülasyonun %40'ından kalitatif ve kantitatif sperm üretim anomalileri sorumludur. Vakaların %60-70'inde azalmış testiküler sperm fonksiyonunun kaynağı bilinmemektedir (3). Erkek infertilitesinin nedenleri arasında vas deferens obstruksiyonu, fiziksel travma, enfeksiyon gibi nedenler yanında yaşam stili (obesite, psikolojik problemler, yaş, egzersiz, sigara içme) bulunmaktadır (9). Ayrıca varikosel ve endokrin bozukluklar da erkek infertilitesinin ciddi nedenleri arasında sayılabilir (3,10). Erkek faktörlü infertilite, sperm sayısı, motilite ve morfolojisini de içeren düzensizliklerle ilişkilidir (11). Son zamanlarda, özellikle son 30-50 yıllık dönemde, genel erkek popülasyonunda normal erkeklerden alınan ejakulatın kalitesi ve sperm konsantrasyonunda ilerleyici bir azalma, erkek infertilitesi insidansında artma ve testiküler kanserlerde daha yüksek bir prevalans gözlemlendiği belirtilmektedir. Ayrıca, azalmış sperm konsantrasyonu ile malign hastalıklar arasındaki ilişki, infertilitenin ileride gelişebilecek lenfoma, testiküler

tümör ve bazı endokrin kanserlerin habercisi olabileceği yönünde olduğu düşünülmektedir (12).

Erkek infertilitesi nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

1) Pretestiküler nedenler

a- Hipotalamik hastalıklar:

- İzole gonadotropin yetmezliği (Kallmann sendromu)
- İzole LH yetmezliği
- İzole FSH yetmezliği
- Doğumsal hipogonadotropik sendromlar

b- Hipofizer hastalıklar

- Hipofiz yetmezliği (Tümörler, infiltratif süreçler, operasyon, ıslanlama)
- Hiperprolaktinemi
- Hemokromatoz
- Eksojen hormonlar (östrojen-androjen fazlalığı, glikokortikoid fazlalığı, hiper/hipotiroidizm)

2) Testiküler nedenler:

- a- Kromozom anomalileri (Klinefelter sendromu, vs)
- b- Noonan sendromu (erkek Turner sendromu)
- c- İzole Sertoli hücre sendromu (SCOS)
- d- Gonadotoksinler (ilaçlar, ıslanlama)
- e- Orşit
- f- Travma

g- Sistemik hastalıklar (böbrek yetmezliği, orak hücre hastalığı, vs)

h- Defektif androjen sentezi veya aktivitesi

ı- Kriptorşidizm

i- Varikosel

3) Posttestiküler nedenler:

a- Sperm iletim bozuklukları

- Doğumsal bozukluklar

- Edinsel bozukluklar

- Fonksiyonel bozukluklar

b- Sperm motilite veya fonksiyonu bozuklukları

- Sperm kuyruğunun doğumsal defektleri

- Olgunlaşma defektleri

- İmmunolojik defektler

- Cinsel disfonksiyon

- Enfeksiyon (13)

3.1.3.1. Erkek İnfertilitesinde Genetik Nedenler

Erkek infertilitesi, bugün major bir sağlık problemidir ve üretken çağdaki erkeklerin %40-50'sinde sperm üretiminde kalitatif veya kantitatif anomaliler bulunmaktadır (14). Genetik ve çevresel faktörlerin bu durumdan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Bir diğer faktör ise, Y kromozomu ve spermde deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına neden olan oksidatif streştir, infertil erkeklerin semenlerinde total antioksidan kapasitede azalma ve reaktif oksijen türlerinin seviyesinde artma

gözenmektedir (14). İnsanlarda erkek infertilitesine yol açan birçok genetik neden tanımlanmıştır (15).

Obstrüktif azospermisi olan hastalar kistik fibroz mutasyonu taşıyabildiği gibi, nonobstrüktif azospermisi veya ciddi oligospermisi olan hastalarda Y kromozomu uzun kolunda mikrolelesyon bulunabilir (16). Spesifik gen mutasyonlarının testiküler oluşumu, internal ve external genitalya gelişimini ve spermatogenezi ters yönde etkilediği bilinmektedir. Genitoüriner traktusu etkileyen sendromlar da duktal fonksiyonu ve/veya ejakulasyonu etkileyebilir (17).

3.1.3.2. Erkek Genital Sisteminin Embriyolojisi

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyetinin fertilizasyon anında belirlenmiş olmasına karşın yedinci haftaya kadar gonadlarda cinsiyete özgü değişiklikler ortaya çıkmamaktadır. Gonadlar üç kaynaktan köken alır. Bunlar; karın arka duvarındaki mezodermden köken alan mezotelyum, altındaki mezenkim ve primordial germ hücreleridir. Gonadlar 5. hafta dolayında mezonefroz üzerinde kalınlaşmış bir alan olarak belirirler. Gonadal kabartı denen çoğalmış hücre topluluğuna dönüşürler, primer seks kordları denen uzantılarla alttaki mezenkimle ilişki kurarlar. Böylece korteks ve medullası olan bir gonad ortaya çıkmış olur. Dişi genetiğe sahip embriyolarda medulla gerileyecek ve korteks overe diferansiye olacaktır. Erkek genetikte ise korteks gerileyecek ve medulla testise diferansiye olacaktır. Erkek yönde gelişim için gerekli olan Y kromozomunun kısa kolunda bulunan genler cinsiyete özgü gelişim için çok büyük bir öneme sahiptir. Ancak testis belirleyici faktör (TDF) varlığında testiküler diferansiyasyon olmaktadır, seminifer tübüller de bu şekilde diferansiye olabilmektedir(18).

3.1.3.3. Spermatogenez ve Genetik Kontrolü

Spermatogenez hücre proliferasyonu, mayoz ve farklılaşmasını kapsayan ve 70 gün gibi uzun bir sürede gerçekleşen karmaşık bir işlemdir. Erkek germ hücre üretiminde yer alan genetik değişiklikler bazen olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Bu bulgular şiddetli erkek infertilitesinde kullanılan özellikle testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ve intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) gibi üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinin uygulanması açısından önemlidir. Bu nedenle erkek infertilitesi ile ilişkili genetik bozuklukların bilinmesi gerekmektedir (15).

Spermatogenez, olgun spermatozoanın üretildiği süreçtir ve kromozom sayısı bu süreçte haploid sayıya indirilir. Seminifer epitelyumda bulunan hücre tipleri, farklılaşma sırasına göre; spermatogonya, primer ve sekonder spermatosit, spermatidler ve olgun spermatozoadır. Spermatogonya mitozla bölünür (17). Spermatogenik farklılaşma başladığında, spermatogonyal kök hücre mitotik olarak önce Tip A spermatogonyom, ardından Tip B spermatogonyuma bölünür. Preleptoten spermatositleri, $2n$ sayıda kromozomu taşır, bu spermatositlerde bulunan DNA, normal DNA miktarının iki katıdır ($4n$), yani her bir kromozom iki kardeş kromatide duplike olmuştur. Mayotik profazda, homolog kromozomlar çiftleşir ve genetik materyal alışverişi gerçekleşir. I. mayotik redüksiyon bölünmesinin metafaz, anafaz ve telofazında, çiftleşen homolog kromozomlar birbirinden ayrılır ve zıt kutuplara gider. Sonuçta iki kardeş sekonder spermatosit oluşur. Bunlardan her biri haploid sayıda kromozom içerir (23), fakat her bir kromozom iki kardeş kromatidden oluştuğundan diploid miktarda DNA içerir. Mayoz II'de ise kardeş kromatidler karşı

kutuplara çekilir, böylece her bir spermatid haploid kromozom sayısı ve haploid miktarda DNA'ya sahip olur. Normal spermatogenez, hipotalamus, pitüiter sistem, Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri ve spermatogenik epitelyumu da içeren birbiriyle ilişkili olaylara bağlıdır (17). Spermatogenez değişimleri sistemik hastalıklar, kriptorşidizm, endokrinolojik hastalıklar, seminal yolakta tıkanıklık veya enfeksiyonlar gibi birçok nedenle oluşabilir. İnsan spermatogenezi bozuklukları, sıklıkla (%50 oranında) idiopatik olarak ortaya çıkar ve genetik nedenlerden dolayı oluşabilir. Spermatogenezin hipotalamik/pitüiter kontrolünde yer alan genlerde mutasyonlar tanımlanmıştır ve bu mutasyonlar hipogonadotropik hipogonadizmin bazı tiplerinden sorumludur (19,20,21).

Sperm analizi 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası alınan ejakulat örneğinde yapılır. Semen analizinde optimal bir değerlendirme yapabilmek için birkaç hafta aralıkla toplanmış, iki yada üç semen örneğinin incelenmesi yapılmalıdır (22).

Bir sperm analizinin WHO'ya göre (1999) normal değerleri şu şekildedir:

Volüm	:	2.0 ml ya da yukarısı.
pH	:	7.2 ya da yukarısı.
Sperm konsantrasyonu:		20×10^6 veya daha üzerinde sperm/ml.
Total sperm sayısı	:	Ejakulatta 40×10^6 veya daha üzerinde spermatozoa.
Motilite	:	%50 veya daha üzerinde spermin A+B derecesi motilite veya %25 veya daha fazlasının A derecesi motilite göstermesi.
Morfoloji	:	Kesin kriterlere göre %15 ya da üzeri.
Canlılık	:	%75 veya üzerinde canlı sperm.
Lökosit	:	1 milyon/ml.den az. (22)

Sperm morfolojisi günümüzde önemli bir fertilite potansiyeli parametresi olarak kabul edilmektedir. İlk kez Kruger tarafından tanımlanan kesin kriterler kullanılarak yapılan sperm morfolojisi analizi ise özellikle in vitro fertilizasyon yapılacak adaylarda daha doğru yönlendirme yapılabilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Buna göre %14 üzeri normal fertilite hızlarına sahiptir. %4-14 arası daha düşük, %4 altı ise hiç ya da çok daha düşük fertilizasyon hızlarını gösterir (23).

Spermiogram sonucunda elde edilen değerler WHO'a (1999) göre şu şekilde sınıflandırılır:

- Normospermi: Semende 20milyon/ml üzerinde sperm bulunması
- Oligospermi : Semen içinde sperm sayısının 20 milyondan az olması
- Astenospermi: İleri hareketliliğin %50'nin altında olması
- Teratospermi : Morfolojinin %15 altında olması
- Oligoastenoteratospermi: Her üç değişkende olan bozukluğa işaret eder
- Azospermi : Ejakülatta hiç spermatozoa olmaması
- Aspermi : Hiç ejakülat elde edilememesi (22)

Azoospermi, tüm erkeklerin %1'inde, infertil erkeklerin ise %10-15'inde izlenir (4). Azoospermi teşhisi en az iki kez tekrarlanan (15dk, 3000 devir) santrifüj edilmiş ejakulatta spermatozoa bulunmaması ile konur, fakat bu yöntem ile oligospermik hastada hastada sperm varsa, spermin fonksiyonel defektini saptamak oldukça güçtür (4,24).

İdiopatik nonobstruktif azospermi veya ciddi oligospermi erkek infertilitesinde özel bir gruptur. Açıklanmamış infertilite nedenleri başında idiyopatik nonobstruktif azospermik erkekler (INOA) yer alır, bunlar ögonadaldır ve primer

infertilite, düşük testiküler hacim ve yüksek FSH seviyesi ile karakterizedir, tüm bunlar testiküler lezyonun muhtemelen konjenital olduğunu düşündürmektedir (25). Eğer azospermi ciddi intrinsik testiküler defekte bağlı ise, serum FSH düzeyinde belirgin bir artış görülürken, hipogonadotropik hipogonadizmde ise serum FSH düzeyi normalin altındadır. Azospermik hasta grubunda, atrofik testisi olmayan ve serum FSH düzeyi normal ya da hafif yüksek vakalarda testis biopsisi, obstrüktif azospermi ve testiküler defekti ayırmada en önemli tanısal yöntemdir. Serum FSH seviyesi normalin iki ya da üç katından fazla saptanırsa, ileri tetkikler germinal epitelin tamamen harap olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılır. Normal ya da normalin biraz üzerinde serum FSH düzeyi saptanan azospermik hastalarda spermatogenik aktivite ve germinal epitelyum hakkında bilgi edinebilmek için her iki testisten biopsi almak gerekir. Biopside normal spermatogenezin gösterilmesi ile herhangi bir seviyede duktal obstrüksiyon olabileceği düşünülmelidir (5). Azospermik infertilite nedeniyle yapılan testis biopsilerinde alınan sonuçlar şu şekilde sınıflandırılabilir:

- 1- Germ hücre aplazisi (Sertoli cell only sendromu): %29 oranında ortaya çıkar.
- 2- Spermatositik arrest: Maturasyon dizisinde duraklama olan bu durum %26 oranında bulunmuştur.
- 3- Generalize fibrozis: Biopsilerde %18 gibi bir sıklık göstermiştir.
- 4- Normal spermatogenez: İnfertiliteye rağmen %27 oranında normal doku bulunmuştur (5).

Diğer yandan, obstrüktif azospermi ise seminal kanallarda komplet obstrüksiyon sonucu semende ve ejakülasyon sonrası idrarda spermatozoa ve

spermatogenetik hücrelerin bulunmamasıdır (26). Genital sistem obstrüksiyonu erkek infertilitesinin düzeltilebilir sebeplerindendir. Duktal sistem obstrüksiyonu tüm azospermik hastaların %40'ının sebebidir (4). Bu yönden azospermi, tamamen ayrı bir etyolojiyle bir laboratuvar parametresidir (25).

Erkek faktörlü infertilitenin en sık ve düzeltilebilir nedenlerinden biri de varikoseldir. Genel erkek popülasyonunda varikosel insidansı yaklaşık olarak %15 olmasına rağmen, infertil erkeklerin 1/3'ünde infertiliteden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Varikosel bulunan oligospermiklerde %2 oranında kromozom anomalisine rastlanırken, Y kromozom mikrolezyonları ise vakaların %6-8'inde gözlenmektedir. Varikoselektomiden bir yıl sonra vakaların %34-46'sında sperm sayısında %50 oranında bir artış görülür (27).

3.2. X ve Y Kromozomlarının Karşılaştırılması

X ve Y kromozomları mayoz sırasında DNA değişimini tamamladıklarında birbirlerinden bağımsız gelişim göstermektedirler. Memeli Y kromozomu büyüklük olarak X kromozomunun 1/3'ü kadar olmakla birlikte, araştırmalar her iki kromozomda bulunan benzer 19 gen üzerinde yoğunlaşmıştır. X kromozomu kısa kolu sonunda bulunan genler Y kromozomuna benzerlik göstermektedir. X kromozomunun kısa kolunun uç bölgesi ile Y kromozomunun uç bölgesi homolog yapıdadır ve bu bölgeler “psödootozomal bölge” olarak tanımlanmaktadır. X ve Y kromozomlarının bu bölgeleri arasında mayoz bölünme sırasında “crossing over” görülmektedir (28,29,30). Büyük inversiyonların izlendiği Y'deki mutasyonlar, X'in daha büyük bölgeleri ile Y'nin daha küçük bölgeleri arasında rekombinasyona götürmektedir (31).

3.3. Y Kromozomu ve Fertilite

İnsan Y kromozomu, spermatogenez için gerekli olan ve gonadal farklılaşmanın testis yönünde gelişmesi için gerekli olan genleri içermektedir (17,32, 33). İnsan Y kromozomu 60 milyonun üzerinde nükleotid içermesine rağmen, diğer kromozomlara oranla gen sayısı en az kromozomdur. Y kromozomu, erkek karakteristik özelliklerinin genetik belirleyicisi olarak rol oynar ve birçok ilginç biyolojik özellikler gösterir (31). Y kromozomunun kısa kolu (Yp) ve uzun kolu (Yq) proximal bölgesi ökromatik bölge iken, Yq'nun distal bölgesi heterokromatin bölgesidir ve bu bölgenin uzunluğu değişkendir (29). Y kromozomunun %85'ini oluşturan erkek spesifik bölge; MSY (Y'nin erkek spesifik bölgesi), 3 ökromatik (x-transpoze, x-dejenere, amplikonik) ve bir heterokromatik mozaik zincir taşır. Bugüne kadar 156 transkripsiyon ünitesi, 78 protein kodlayan gen ve Y kromozomu ile ilgili 27 farklı protein tanımlanmıştır (31). Yp ve Yq kollarının üzerinde sırasıyla psödootozomal sınır bölgesi, PABY1 ve PABY2 psödootozomal bölgeleri ve X kromozomu üzerinde ise bunların homologları vardır. Bu bölgeler dışında kalan bölgeler mayotik rekombinasyona katılmaz. Dolayısıyla da bu durum Y kromozomunun yaklaşık %95'ini nonrekombine halde bırakır (31,34).

Y kromozomu;

- i) psödootozomal sınır bölgesi (PABY)
- ii) kısa kol üzerindeki perisentrik bölge (seks belirleyici geni -SRY- içerir)
- iii) proximal uzun kol üzerinde bulunan ökromatik bölge (DYS1)
- iv) distal uzun kol üzerinde bulunan heterokromatik bölge (DYZ1)
- v) DYZ3

bölgelerinden oluşur (31). DYZ3 bölgesi sentromerik zincirleri bünyesinde bulundurduğu için Y kromozomunun yaşamını sürdürmesi ve çoğalması için hayati öneme sahiptir (31,34). İnsan Y kromozomu, çoğunluğu tekrar elementlerinden oluşmak üzere, sınırlı sayıda fonksiyonel genleri içerir, ayrıca bazı alfoid tekrarlar, major insan SINE (short interspersed nuclear element) ve birkaç satellit sekans ailesini içermektedir. Alfoid sekanslar, Y kromozomu sentromeri yanında kümelenmiştir ve diğer kromozomlardakinden ayrılabilir. Y kromozomu Alu tekrarlarının çoğunluğu, genomik Alu sekansı ile oldukça az benzerlik göstermektedir. Alu sekansı, insan genomunda en fazla bulunan tekrar elementleridir. Buna karşın Y kromozomu LINE (long interspersed nuclear elements) tekrarları, diğer kromozomlardaki LINE'lerden ayırd edilemez. Bu yüzden Alu tekrar sekansları, diğer erkek spesifik (heteromorfik) sekanslarla birlikte gelişmektedir (31). Kodlayıcı olmayan, tekrarlayıcı DNA'nın fazla olmasından dolayı Y kromozomunda delesyonlar sık görülür (9). Y kromozom mikrodelesyonları, histolojik olarak Sertoli cell only sendromu (SCOS), matürasyon arresti ve hipospermatogenezi içeren, farklı spermatogenik değişikliklerle bağlantılıdır (29,35). Y'ye bağlı sekanslar yanında infertilite sinyal mekanizmasında yer alan protoonkogenlerdeki parakrin sistemleri veya mutasyonları kontrol eden otozomal genlerle de infertilite oluşabilir (31).

3.3.1. Testis Belirleyici Faktör (TDF)

Testis gelişimini belirleyen faktör ya da faktörlerin araştırılması sırasında birçok gen incelenmiştir. Bunlar arasında H-Y antijeni (Histokompatibilite Antijeni) ve ZFY (Zinc Finger Protein, Y-linked) geni de vardır. Ancak bugün için bu

faktörlerin testis belirlenmesinde rolleri olmadığı kabul edilmektedir. Bipotansiyel gonadın testis yönüne farklılaşması için gerekli olan gen “Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesi”ndeki (SRY) testis belirleyici faktör (TDF) genidir. Her iki şekilde de adlandırılan bu gen, farklılaşma için gerekli olmakla beraber yeterli değildir. Yp11.3 bandında tanımlanan ve intronsuz olan SRY’nin tek exonunun oluşturduğu 1.1kb boyutundaki transkriptlerin ürettiği proteinler, 204 aminoasit uzunluğundadır ve HMG-BOX’a ait homolog diziler içerir. HMG (high mobility group)-BOX; ileri düzeyde korunan DNA bağlayıcı, 79 aminoasitlik bir motiftir. DNA’nın kıvrılmasına yardımcı olarak, hedef genin aktivasyonu veya supresyonunu ve gendeki transkripsiyonunun hızlanması veya yavaşlamasını sağlar. 46,XY kadınlarda yapılan çalışmalarda X kromozomunun kısa kolu üzerinde (Xp21.2-p22.11) cinsiyet dönüştürücü gen (SRVX, X-linked sex reversal locus) adlı bir gen haritalanmıştır. Bir hipoteze göre SRY, SRVX’i baskılamak üzere işlev görmekte, SRVX ise otozomal genlerin supresyonunda rol oynamaktadır. Normal 46,XY erkekler ve 47,XXY Klinefelter sendromlu erkeklerde SRY geni SRVX’in aktif tek kopyasını baskılayabilir, böylece serbest kalan otozomal lokus testis formasyonunu gerçekleştirebilir. 46,XX dişilerde SRVX aktiftir ve otozomal genleri baskılayarak, bipotansiyel gonadın over yönünde farklılaşmasını sağlar. Eğer SRVX, iki aktif kopya halinde ise SRY, SRVX’in fonksiyonlarını yeterince azaltamayacak ve testis oluşumu engellenecektir. Bu model gonadal farklılaşmada X, Y ve otozomal genlerin birlikte çalıştığını açıklamaktadır (5, 17, 32,33).

3.3.2. Azospermi faktörü (AZF)

Germ hücre gelişimi otozom ve Y kromozomu üzerinde yer alan pek çok genin kontrolü altındadır. Y kromozomu uzun kolunda, spermatogenezde yer alan gen ve gen aileleri bulunmaktadır, bunlar germ hücre gelişimi ve farklılaşmasında kritik bir öneme sahiptir (14). İnfertil erkeklerde, Y kromozomu uzun kolundaki (Yq) mikrolelesyonlar patojenik neden olabilirler (3).

Y kromozomu 7 delesyon aralığına ayrılmıştır. Bu aralıkların her biri de alt aralıklara (subinterval) ayrılmıştır. İnsan spermatogenezi kontrolünde yeri olan, Y kromozomu üzerindeki bir veya bir grup genin var olduğu hipotezi ilk olarak Tiepolo ve Zuffardi tarafından 1976 yılında bildirilmiştir (32). Spermatogenezde önemli olan genler, Y kromozomu uzun kolunda, 5. ve 6. delesyon aralığında, 11.23 bandında lokalizedir. Bu bölge azospermik faktör bölgeleri (AZF) olarak bilinmektedir. AZFa proximal Yq11'de yer alırken, AZFb ve AZFc distal Yq11'de yer almaktadır. Bu bölgeler birbiriyle çakışmamaktadır. Bu AZF genleri, RNA bağlayıcı proteinleri kodlarlar ve gen ekspresyonu, RNA metabolizması, paketlenmesi, sitoplazmaya transportu ve splicing regülasyonunda yer alırlar. 1992'de Vollrath ve ark. Y kromozomunun 43 aralıklı bir delesyon haritasını düzenlemişlerdir, bu bölgeler Y kromozomu boyunca uzanan "sequence tagged sites" (STS) denen bölgeleri içermektedir (3,14,32,35,36). Y kromozom mikrolelesyonları, Klinefelter sendromundan sonra spermatogenik bozukluğun ve erkek infertilitesinin ikinci en sık sebebidir (33,37). Bu yüzden AZF delesyonlarının genetik taraması erkek infertilite çalışmalarında mutlaka yapılmalıdır. İnsan Y kromozomu sekansının keşfedilmesiyle, Y kromozom mikrolelesyonlarının moleküler mekanizmasının

palindromik sekanslardaki benzer parçalar arasında homolog rekombinasyon sonucu gerçekleştiği anlaşılmıştır. Bu da Y kromozomunun yeniden düzenlenmeleri veya delesyonları ile sonuçlanmaktadır (33,38). Y kromozomu uzun kolu üzerindeki mikrolelesyonlar, idiyatik erkek infertilitesinde bazı vakalardan sorumlu olabilir, Y kromozom mikrolelesyonları, genellikle karyotipte bulunamaz ve AZF faktörü oluşturan genlerin kaybından sorumludur (19,36). Ayrıca bu AZF bölgelerindeki mikrolelesyonlar azospermi ile olduğu kadar Sertoli cell only sendromundan hipospermatogeneze kadar değişen farklı testis histolojisi ile de ilişkilidir (3).

Her bir AZF bölgesi delesyonu farklı fenotipik etkiler oluşturur (10). Sargent ve ark.nın yaptıkları çalışmada, 4 infertil erkekte AZFa bölgesi incelenmiş ve sadece birinde delesyon tespit edilmiştir (39). AZFb bölgesindeki delesyonların ise, azospermi, oligospermi ve normospermi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. AZFc bölgesi delesyonlarının azospermi ve ciddi oligospermi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (40). Pek çok vakada AZF bölgesi delesyonlarının spermatogenez kaybına yol açtığı gösterilmiştir. Üç AZF bölgesi içinde en fazla delesyon bulunan bölge AZFc'dir, bunu AZFb bölgesi izler (41).

Y kromozom mikrolelesyonu, azospermik infertil erkeklerin %9'unda, ciddi oligospermik erkeklerin ise %11.6'sında tanımlanmıştır (42). Yani, Y kromozom mikrolelesyonları, infertil erkeklerdeki en sık moleküler genetik neden olmasına rağmen, azospermik erkeklerin %85'i, oligospermik erkeklerin ise %90'ında delesyon bulunmaz. Çünkü, diğer Y kromozom bağımlı faktörler, örneğin multikopyalı gen ailelerinde tekrar sekanslarındaki değişiklikler, Y kromozomuna

spesifik genlerdeki polimorfizm veya mutasyonlar ve duplikasyon gibi bazı yeniden düzenlenmeler infertil fenotipe katkıda bulunmaktadır (43).

AZF bölgeleri delesyonlarını tetikleyen bir Y kromozomu haplotipi olabilir. Bundan dolayı, bazı bireyler daha fazla de novo delesyona yatkın olabilirler. İleri baba yaşı da Y sekansları kaybını tetikleyebilir (44).

3.3.2.1. AZFa

AZFa bölgesi, yaklaşık 1100 kb uzunluğundadır ve tek kopya genleri olan iki ana aday gen içerir:

a) DFFRY (Drosophila Fat Facets Related Y, USP9Y)

b) DBY (Dead Box Polypeptide Y)

AZFa bölgesinin komplet (tam) delesyonunda AZFa'da yer alan iki genin içinde bulunduğu 792kb'lik kısmı uzaklaşır. Sadece USP9Y veya DBY'yi içeren delesyonlar daha az görülmektedir. Bu iki genin mutasyonu spermatogenik bozukluğa yol açmaktadır. Çoğu AZFa delesyonu birbirinden 800kb uzaklıkta olan 10 kb'lık iki tekrar dizisi arasındaki rekombinasyondan kaynaklanır (37). Ayrıca AZFa bölgesindeki büyümeyi kontrol eden bir genin delesyonunda da kısa boy izlenmektedir (10).

3.3.2.2. AZFb

AZFb delesyonları infertil erkek popülasyonunda nadir görülmektedir, fakat hasta seçim kriterlerine göre insidansı %1-5 oranında artmaktadır. RBMY1 (Related Binding Motif of Y) geni AZFb delesyonlarında aday bir genidir ve tanımlanan ilk AZF aday genidir. Ekspresyonu testise sınırlıdır. Bu gen Y kromozomunun her iki kolunda yer alan, gen ve psödogenlerin yaklaşık 30 kopyasını içermektedir, fakat

fonksiyonel olan genlerin AZFb bölgesinde Yq'da kümелendiđi düşünölmektedir. Fakat bu bölgede RBMY1 genini etkilemeyen delesyonlar da görölmektedir. Bunun nedeni de tekrar dizileri arasındaki homolog rekombinasyon nedeniyledir. AZFb bölgesi AZFc bölgesi gibi palindromlarda organize olan büyük tekrar dizileri içeren bir yapıya sahiptir, fakat bunların çoğunluğu tek kopya dizileridir. Yine bu bölgede testiküler fenotipten sorumlu olan diğer bilinen veya bilinmeyen genler olabilir, yani başka AZFb aday genleri bulunabilir (29,44,45).

3.3.2.3. AZFc

AZF'ler içinde, AZFc ciddi oligospermik ve azospermik hastalar içinde, özellikle nonobstruktif infertilitesi olan erkeklerde en sık delesyona uğrayandır. İnsan genomik yapısının giderek anlaşılmasıyla, Y kromozomu uzun kolunun palindromları ve tekrarları içeren çok sayıda DNA sekansına sahip olduğu ortaya konmuştur (35,46,47,48,49). Bu karakteristik yapıdan dolayı azospermik veya oligospermik erkeklerde bulunan AZF bölgelerinde delesyonların meydana geldiği düşünölmektedir (50). AZFc, ana aday geni DAZ (Deleted in Azoospermia) kümesidir. Erişkin testisinde transkripte olan ve germ hücrelerinde eksprese olan bir gen kümesidir (22,44). AZFc bölgesi 12 gen ve transkripsiyon uniti içermektedir (37). AZFc bölgesinde büyük delesyonlar olduğu gibi, yine bu bölgede kısmi (parsiyal) delesyonlar da görölebilir, bu kısmi delesyonlar az sayıda genlerin ve transkripsiyon ünitlerinin kaybına neden olabilir (33). AZFc bölgesi, AZFc aday geni olan DAZ haricinde çok sayıda testis spesifik gen ailesi içermektedir. Bu bölgede oldukça uzun tekrar dizileri bulunmaktadır ve çoğu AZFc delesyonunun 3.5Mb'lık

bir segment kaybına yol açan iki 229kb'lık tekrar dizileri arasındaki homolog rekombinasyon sonucu oluştuğu tespit edilmiştir (45).

AZFb ve AZFc bölgelerinin her ikisi birden 24 geni kapsamaktadır (37). AZFb'nin komplet delesyonu 6.2Mb'lık bir kısmı uzaklaştırırken, AZFc'nin komplet delesyonu ise 3.5 Mb'lık bir kısmı uzaklaştırır ve en sık görülen Y kromozom delesyon bölgesidir (37). RBM ve DAZ genleri, RNA binding proteinleri kodlarlar. Bu proteinler, RNA metabolizmasında yer alan, RNA paketlenmesi, sitoplazmaya transportu ve splicing gibi işlemlerde yer alan heteronükleer ribonükleer protein (hnRNP) ailesine benzer yapıda olan proteinlerdir. Bu bölgelerin fiziksel boyutu, AZFa ve AZFb için 1-3Mb, AZFc için ise 3Mb olarak tahmin edilmektedir (44).

Kent ve ark.larının Y kromozomu üzerinde yaptıkları incelemelerde, ilk defa AZF b ve AZFc arasında dördüncü bir bölge olan AZFd tanımlanmıştır. Bu bölgede mikrodelesyona sahip hastalarda hafif oligospermi veya normal sperm sayısı gözlenmesine rağmen, anormal sperm morfolojisi saptanmıştır (28). AZFb, AZFc ve AZFd bölgelerindeki delesyonlar SCOS, komplet spermatogenik arrest/azoospermi, oligospermi gibi çeşitli testis histopatolojileri ile birlikte de olabilir (51).

3.3.3. Y Kromozomu Delesyon Mekanizması

1994'ten beri yapılan klinik ve moleküler çalışmalarda, erkek infertilitesinde Y kromozomu genleri ve Y kromozom mikrodelesyonlarının rolü incelenmiştir (43). Hastalardaki mikrodelesyonların analizi spermatogenez regülasyonunda yer alan gen veya gen ailelerinin rollerini açığa çıkarmaya çalışmaktadır (31). De novo Y delesyonlarının sıklıkla görülmesi genetik materyalin spontan kaybına bağlanmaktadır. Y kromozomunun yapısındaki farklılık; kromozom boyunca

tekrarlanan elementlerin fazla olması ve bu tekrarların rekombinasyon yapılan bölgede (X ve Y kromozomları arasındaki homolog bölgede) görülmesiyle ilgili olabilmektedir. Ayrıca AZF delesyon bölgelerini arttıran, özel Y kromozom dizilimleri de bulunabilmekte ve bunun sonucunda bazı kişiler de novo delesyonlara diğerlerinden daha yatkın olabilmektedir. İlerlemiş baba yaşının da Y kromozom gen dizi kaybını arttırdığı düşünülmektedir (52).

3.3.4. Y Kromozomu Moleküler Tarama Endikasyonları

Y kromozomu mikrolelesyon taraması, hastanın azospermisi veya oligospermisinin nedeninin anlaşılmasına ve prognozun belirlenmesine yardımcı olur. Hangi hastalarda Y kromozomu moleküler taramasının yapılması gerektiği ise şu şekilde belirlenebilir: Dünya literatürüne göre, klinik olarak delesyonlar azospermik veya sperm konsantrasyonu 1×10^6 /mL olanlarda görülmektedir. Çok nadiren sperm konsantrasyonu $1-5 \times 10^6$ /mL olan infertil hastalarda delesyon bulunabilir. Testiküler histolojiyle seçilen hastalarda, örneğin Sertoli cell Only Sendrom'lu (SCOS) hastalarda, mikrolelesyon insidansı daha yüksek olmasına rağmen, moleküler analiz için hangi hastaların aday olduğu konusunda kesin seçim kriterleri verilemez (29,53). ICSI veya TESE/ICSI adayları olan ciddi oligospermik veya azospermik hastalara delesyon taraması önerilmelidir, zira AZFa bölgesinde komplet delesyonu olan vakalarda veya AZFb bölgesinde veya AZFb+c bölgesindeki komplet delesyon vakalarında TESE yapılmamalıdır. Ayrıca, AZFc bölgesindeki delesyonlar, eğer yardımcı üreme metodu kullanılırsa, erkek yavruya geçebilir (37,54). Bu yüzden delesyon tanısının prognostik bir önemi vardır ve terapötik yaklaşımda önemlidir (37).

Genetik danışmanlık, bozuk spermatogenezli bir erkek çocuk sahip olma riski hakkında bilgi edinmek için gereklidir. Fakat farklı genetik geçmiş ve çevresel faktörlerin üreme ve fertilite üzerine olan etkileri nedeniyle fenotip tam olarak bilinemez. Şimdiye kadar Yq mikrolelesyonlu babalardan doğan 17 erkek ve 18 dişi ICSI bebeği rapor edilmiştir, bu çocuklar fenotipik olarak normal iken, sadece bir erkek çocuk pulmoner atrezi ve hipoplastik sol ventrikül tanısı almıştır. Genel olarak, Y kromozom mikrolelesyonu moleküler tanı endikasyonu, vakadan vakaya değişebilen önemli bir klinik karardır ve klinisyenlerin hangi hastalar için bu tanıyı uygun gördükleri oldukça önemlidir (37).

Delesyonların tanısal değerlendirilmeleri Y kromozomu üzerinde seçilmiş bölgelerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gerçekleştirilmektedir. MSY-spesifik sequence tagged sites (STS) primerleri, kromozom veya gendeki anonim yani ortak genleri amplifiye ederler (47). MSY haritası şu anda çıkarılmış olmasına rağmen, gerçekte bu genlerin ve transkripsiyon birimlerinin spermatogenezdeki ve infertiliteye yol açan rolleri hakkında henüz bilgi yoktur. Ayrı genlere spesifik STS primerleri kullanılarak, ICSI adaylarının DNA örneklerinde mikrolelesyon bulunma oranı artmaz (55,56,57). Y kromozom mikrolelesyonu tanısında önemli olan Y kromozomunda yer alan STS primerlerinin hangilerinin kullanılacağıdır. Kullanılan STS primerlerinin bulunduğu bölgeler polimorfik olmamalı, klinik olarak bilinen mikrolelesyon örneğine göre oligo/azospermi ile etkilenmiş erkeklerde spesifik olarak delesyonunun bilindiği bölgeler olmalıdır (37).

3.3.5. Y Delesyonu Taramasında İşaretli Sekans Bölgeleri (Sequence Tagged Sites: STS) Seçiminin Prensipleri

Simoni ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda infertil erkeklerin %7'sinden fazlasının Y kromozom mikrolelesyonuna sahip olduğu ve azalmış sperm sayısı ile insidansın arttığını göstermişlerdir. Bu da, 1997'de Pryor ve arkadaşlarının ortaya koyduğu erkek infertilitesinde Y kromozom mikrolelesyonlarının önemli bir etyolojik faktör olduğu yolundaki fikirleriyle benzeşmektedir. Bu gözlemlerin ışığı altında düşük sperm sayılı erkeklerin Y kromozom mikrolelesyonu açısından değerlendirilmesi gerektiği ortaya konmuştur. Ayrıca yardımcı üreme tekniğine gitmeden önce de hastalara Y kromozom mikrolelesyonu yönünden taranmaları önerilmelidir. Yazarlar, Y kromozomunu analiz etmede kullanılan STS sayısı ile hastalarda bulunan delesyon frekansı arasında bir korelasyon yokluğu tespit etmişler. Bu yüzden en sık delesyona uğrayan bölgeleri bulan STS 'leri kullanmışlardır ve bu bölgeler için daha fazla primer kullanılması daha fazla delesyon bulma oranını önemli ölçüde artırmaz. Bu yüzden infertil erkekleri değerlendirmede kullanılan STS'lerin seçiminde daha önce yayınlanan delesyonları bulma amaçlanmıştır. Delesyon olaylarının daha az sıklıkta görüldüğü Y kromozomu bölgesinde bulunan delesyonların, AZFa'da olduğu gibi, ciddi infertiliteyle sonuçlanacağı bildirilmektedir. Delesyonların en fazla bulunduğu bölgelerdeki STS sayısını artırma, örneğin AZFc'de olduğu gibi, delesyonun boyutu hakkında bilgi verecektir. Bu prensiplere dayanarak, Y kromozomu önemli bölgelerinin iyi taranması, 20-30 STS ile elde edilebilir. Pryor ve arkadaşlarının (1997) yaptıkları çalışmalarda, oligozoospermik hastalarda bulunan tek bir STS delesyonunun, hastanın

infertilitesine yol açmayacak bir polimorfizmi temsil ettiği ortaya konmuştur. Fakat bu çalışmada infertil hastalarda da bu delesyonların bulunması, infertil bir hastada Y kromozomunu değerlendirirken, bu STS'lerin STS panelinden çıkarılmaması gerektiği önerilmektedir (58).

3.4. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ilk olarak 1992 yılında Palermo tarafından ortaya konmuş ve ciddi erkek faktörlü infertilite tedavisinde yeni bir çıkır açmıştır. Fakat tüm dünyadaki IVF merkezlerinden alınan ICSI gebelik oranları ortalamadan daha aşağıdadır (%30-50) (59). ICSI'nin tanımlanmasıyla Y kromozomu mikrodelesyonu bulunan erkeklerin, ejakulattan veya cerrahi olarak elde edilen spermatozoa kullanılarak ciddi oligospermi veya azospermisi bulunmasına rağmen çocuk sahibi olma ihtimalleri vardır. Y kromozom mikrodelesyon tanısı konduğunda, çiftin üreme yöntemleri hakkında bilgilendirilmeleri önemlidir. Bu üreme yöntemleri, ICSI, donör semen kullanımıyla artifisyonel inseminasyon ve herhangi bir tedavi kullanmama olabilir. Y kromozomu mikrodelesyonu olan infertil çiftlerin çoğunluğu (%79) fertilite problemi açısından ICSI'yi seçerler Fakat ICSI kullanıldığında, çocuk erkek olursa, aynı mikrodelesyonu ve fertilite problemlerini muhtemelen yaşayacaktır (20,35,44). ICSI ile tedavi edilen infertil çiftlerdeki başarı oranı %76 iken, bu oran standart IVF tedavisi örneğin inutero inseminasyon görenlerde %15'dir (60).

3.5. Fertilitede Kromozomların Yeri ve Kromozomal Anomaliler

Kondanse olmuş haliyle kromozomlar, gamet oluşumunda yer almaktadır. Premayotik bölünmelerde, mayozda, fertilizasyonda ve tüm ardışık mitotik

bölünmelerde de yer almaktadır. Bu yüzden erkeklerde normal kromozom fonksiyonundaki defektlerin infertiliteye neden olması çok da şaşırtıcı değildir. İnfertil erkeklerde bulunan kromozomal anomaliler, ya gonozomal anöploidilerdir veya mayozda normal kromozomlar gibi davranan, fakat germ hücre bozukluğuna yol açan yapısal anomalilerdir. Yapısal anomaliler içinde inversiyonlar (parasentrik veya perisentrik), dengeli translokasyonlar (Robertsonian/resiprokal, otozomal/gonozomal) ve Y kromozom delesyonları yer almaktadır. Sayısal anomaliler içinde klasik trizomiler (trizomi 21) ve cinsiyet kromozom trizomileri (XXY veya XYY) yer alır. Bunlar mozaik veya non-mozaik olabilir. Sayısal anomalilerin bir diğer tipi ise spermde görülen anöploidilerdir (9,19). Erkek infertilitesi nedenleri arasında kromozomal anomaliler ispatlanmış subfertiliteli rastgele seçilen hastaların yaklaşık %2-3'ünde oluşmaktadır. 10×10^6 spermatozoa/ml altında sperm sayısı olan hastalarda, kromozomal anomali oranı %5-7 civarında iken, azospermik hastalarda bu oran %10-15'e çıkmaktadır (11). Cinsiyet kromozom anomalileri azospermik hastalarda daha sık görülürken, otozomların anomalileri ise daha çok oligospermik hastalarda görülmektedir. Resiprokal translokasyon, Robertsonian translokasyon ve inversiyon sıklığı da infertil erkeklerde yenidoğan popülasyonuna göre artmıştır (61).

3.5.1. Sayısal Seks Kromozom Anomalileri

Kromozom anomali insidansı, normal popülasyona göre infertil erkeklerde yaklaşık olarak 10 kat daha fazladır. Pek çok infertil erkek normal karyotipe sahiptir, fakat semen analizleri anormaldir. Pek çok vakada, bu hastalar artmış anöploid sperm ve diploid sperm oranına sahiptir (62). Bazı infertil erkeklerin normal fertil

populasyon ile karşılaştırıldığında düşük kalitedeki spermatozoalarında kromozomal nondisjunction, yani ayrılamama sıklığının yüksek olması da bu spermlemlerle oluşacak çocukta dikkati çeken bir konudur. ICSI sonrası oluşan gebeliklerde otozomal trizomiler ve seks kromozom anöploidileri daha yüksek oranda bulunmuştur (15).

3.5.1.1. Klinefelter Sendromu

Klinefelter sendromu, en sık görülen cinsiyet kromozom anomalisidir. Yaklaşık olarak 1/660 sıklıkta görülür. Bu sendrom, bir veya daha fazla X kromozomu varlığıyla karakterizedir. Karyotipi çoğunlukla 47,XXY'dir, mozaik veya nonmozaik olabilir (63). Extra X kromozomu anneden veya babadan gelebilir. Çalışmaların %67'sinde her iki X kromozomunun anneden geldiği belirtilmiştir. Anne ve baba yaşı yüksektir. Extra X kromozomunun anne veya baba kaynaklı olması hastaların kliniğini değiştirmez (5). Extra X kromozomu, %50'nin üstünde olasılıkla paternal mayoz I'deki nondisjunctionla, %40 olasılıkla maternal mayoz I veya II'de, geri kalan ise postzigotik olarak meydana gelir (10). Klinefelter sendromlu bir erkek prototipi genellikle uzun boylu, dar omuzlu, geniş kalça, seyrek vücut kıllanması, jinekomasti, küçük penis, androjen yetmezliği, azospermi ve azalmış sözel zeka ile karakterizedir. Çok az kısmına puberteden önce tanı konur (63). Bu hastalarda değişken derecede spermatogenik bozukluk vardır, fakat erkekler, karyotip mozaik olmadığı müddetçe, genel olarak sterildir. Nonmozaik vakalarda dahi, fonksiyon gören ve 46,XY karyotipinde olan germ hücrelerine rastlanmıştır, bunun nedeni ise hastaların gonadal mozaik olmasıdır. Bu yüzden üretken olan Klinefelter sendromlu erkekler anöploidik çocuk sahibi olmaya daha yatkındır (10). Nonobstruktif azospermik olgularda bulunan en sık genetik

bozukluktur ve ekstra bir X kromozomu vardır. Yaklaşık 1/500 oranında görülür ve mayoz esnasında X kromozomunun ayrılmaması sonucu gelişir. İki ebeveyn gametlerinden biri ek olarak bir adet X kromozomu taşımaktadır. En şiddetli fenotipik bozukluğun yaşandığı Klinefelter erkeği, virilizasyon eksikliğine bağlı olarak puberteye ulaşamamaktadır. Olguların spermatogenik ve androjenik aksları tümü ile hatalıdır. Testisleri küçük, seminifer tubülleri sklerotiktir. Leydig hücreleri hipertrofik ve nonfonksiyoneldir. Klinefelter sendromlu olgularda tüm genetik olumsuzluklarla birlikte geniş bir fenotipik spektrumu vardır. Hafif spektrumlu genç erişkinlerin yaklaşık % 50'sinde TESE ile sperm bulunabilir. Elde edilen spermeler ICSI ile gebelik oluşturabilir. Klinefelter sendromlu erkekler, meme kanseri ve osteoporoz açısından daha fazla risk altındadır. Bu nedenle sendromun tanısının konulması sadece reproduktif sağlık için değil, aynı zamanda hastanın uzun dönem genel sağlığı için de önemlidir (64). Klinefelter sendromlu hastaların tedavisinde özellikle pubertenin geciktiği veya görülmediği olgulara ve yaşlarına göre testesteron düzeyleri normalin altında olan hastalara androjen replasmanı yapılmalıdır (5).

3.5.1.2. 47,XYY Sendromu

Yenidoğanlarda %0.1-0.4 oranında görülür. Tipik olarak boylarının uzun olmasından başka bir fenotipik özellikleri yoktur. %1-2 oranında agresif ve antisosyal özellik gösterirler. Spermatogenik değerlendirme normal ile azospermi arasında değişse de genellikle fertildirler. İnfertil olanların testiküler biopsilerinden de değişik maturasyon arrest formlarından komple germinal aplaziye kadar değişebilen sonuçlar elde edilir. Çoğu hastada LH ve testesteron seviyeleri

normalken, germ hücre hasarına paralel olarak FSH seviyesi normal ya da yüksek bulunur (5).

Paternal mayoz II'deki Y kromozomu nondisjunction yoluyla da 47,XYY sendromunun oluştuğu düşünülmektedir. Bu sendrom, insan koryonik gonadotropini fonksiyonunu etkileyerek hormonal dengesizliğe yol açar. Gonadal mozaiklik sonucu fertilite olabilir. Marker kromozom taşıyıcıları ise mayotik arrest ve instabilite nedeniyle yüksek infertilite riski altındadırlar (9).

3.5.1.3. Miks Gonadal Disgenezi

Miks gonadal disgenezili hastalar fenotipik olarak erkek, dişi veya ambigius genitalya olabilir. Cinsiyet doğumda organların görünümüne göre belirlenmektedir. Erken embriyonik gelişim sırasında Y kromozomlarından birinin kaybı sık olarak görülen 45,XO/46,XY mozaik yapısına sebep olabilir. Bu hastaların yaklaşık olarak %33'ünde normal karyotip bulunmaktadır. Bu durum seks kromozom anöploidi dışındaki bozuklukların da bulunabildiğini düşündürmektedir. Eğer tek taraflı testis skrotumda ise normal leydig hücre popülasyonu bulunmaktadır, ancak seminifer tübüllerde germ hücreleri yoktur. Eğer testis intraabdominal ise erkek ve dişiye ait malignitelere eğilim vardır (15).

3.5.1.4. Otozomal Anöploidiler

Çoğunlukla otozomal anöploidiler yaşamla bağdaşmaz. Yaşamla bağdaşan Down sendromlu hastalar fertil veya infertil olabilirler (15).

3.5.2.Yapısal Kromozom Anomalileri

3.5.2.1. Robertsonian ve Resiprokal Translokasyonlar

Y kromozomu ve otozomal kromozomları arasında translokasyon bulunan hastalar, erkek çocuklarına azospermiyi geçirebildiği gibi ayrıca erkek gamet deformitelerine veya idiopatik steriliteye de neden olabilir (65). Resiprokal translokasyonlar, azalmış fertiliteye, spontan abortuslara ve translokasyonun yerine göre doğum defektlerine yol açabilir (10). Kromozomlar arası translokasyonlar mayotik hataya ve hücre ölümüne neden olabilir. Resiprokal X-otozom translokasyonuna sahip olan erkeklerde ciddi spermatogenik arrest ve azospermi görülebilir (10). Resiprokal Y-otozom translokasyonları ise anormal cinsiyet kromozomu eşleşmesinden dolayı anormal spermatogeneze neden olur. İnfertil erkeklerde en sık görülen resiprokal translokasyon, 13q-14q arasındaki translokasyondur [t(13q14q)]. t(13q14q) ve t(14q21q) taşıyıcısı olan infertil erkeklerde yapılan mayotik çalışmalar mayozda spermatogenez esnasında infertiliteye yol açan yeniden düzenlenmiş otozomlarla açıklanabilir. Nükleolar organize edici bölgeleri (NOR), akrosentrik kromozomların heterokromatik kısa kolları üzerinde bulunur. Bu bölgelere RNA sentezinde ihtiyaç duyulduğu gibi cinsiyet vezikülleriyle ilişkilendirilmede de ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı NOR bölgelerini kaybetmiş Robertsonian translokasyonlar hücre karışıklığına, germ hücre ölümüne ve fertilitede azalmaya neden olur (9). İnfertil erkeklerde görülen translokasyonlar çoğunlukla resiprokaldır ve bu tip translokasyonlar daha çok oligospermik erkeklerde (%1.7) azospermik erkeklerden (%0.6) daha sık görülür.

Aynı şekilde Robertsonian translokasyonlar da oligospermik erkeklerde (%0.9) azospermik erkeklere göre (%0.3) daha sıktır (66).

3.5.2.2. Otozomal İnversiyonlar

İnfertil erkeklerde polimorfik kromozomal varyantların yeri de belirtilmelidir. Pek çok normal varyant ile bozuk spermatogenez arasındaki ilişki henüz kesin değildir. İnfertil erkeklerde polimorfik kromozomal varyantların insidansı oldukça geniş bir aralığa yayılmıştır (%3.46-35.7). En sık oluşan heterokromatik varyant ise normal populasyonda %1-1.65, infertil erkeklerde ise %1.17-5 sıklıkla 9 nolu kromozomun perisentrik inversiyonudur [inv(9)(p11q13)] (66). Bu inversiyonlar azospermi ve ağır oligoastenoteratospermi ile ilişkilidir. Buna uygun olarak ICSI veya IVF gebeliklerinde normale göre daha yüksek oranda translokasyon ve inversiyonlar çocuğa kalıtsal olarak geçmektedir (15).

Y kromozomu heterokromatin bölgesi, distal Yq12'ye denk gelmektedir. Bu bölge genetik olarak inaktiftir ve normal populasyonda uzunluğu değişkendir (67). Y kromozomu uzun kolunun heterokromatin bölgesinin artmış uzunluğu infertil erkeklerde %7.14, normal populasyonda ise %1.4 oranında bildirilmiştir. Y kromozom polimorfizmlerinin spermatogenezi etkileyen nedenlerden biri olduğu düşünülmektedir (68,69).

3.5.2.3. 46,XX erkek sendromu

20000 canlı doğumda bir görülür. Genellikle fenotipik görünüm, seksüel ve psikososyal kimlik erkek yönündedir, ancak semen analizleri azospermi gösterir. Çoğu vakalar sporadikse de otozomal resesif kalıtım da bildirilmiştir. %10 olguda ise fenotipik olarak belirsiz genital ve hipospadias görülebilir. Olguların %33'ünde

jinekomasti ve testis biopsisinde tübüler hyalinizasyon, leydig hücrelerinde ps doadenomat z kümelenme ve tübüler fibrozis saptanır. Spermatogenez bozukluğuna sekonder FSH yüksek bulunurken, testesteron seviyesi düşük veya normalin alt sınırındadır. Paternal mayoz sırasında Xp ve Yp uçları arasında, SRY geninin translokasyonu sonucunda XX genotipe rağmen, primitif gonad testis yönünde farklılaşır. SRY genini taşıyan distal Yp ucunun herhangi bir otozoma translokasyonu da benzer fenotipe neden olabilir. Bir diğer alternatif ise, SRVX genindeki bir mutasyonla, bu genin otozomal lokalizasyonlu diğer bir gen üzerindeki inhibisyonunun ortadan kalkmasıdır. Sonuç olarak hastalarda AZF geni eksiktir ve azospermi söz konusudur (5).

3.6. Genotip/Fenotip Korelasyonu

Normospermik erkeklerin çoğunluğunda delesyon bulunmadığından, Y mikrolelesyonlarının spermatogenik bozukluk için spesifik olduğu rapor edilmiştir (43). Fertilite Y delesyonları ile uyumlu olmasına rağmen, dişi partnerin fertilite durumuna bağlı olarak düşük sperm sayısında bile doğal fertilizasyonun gerçekleşebileceği gerçeğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, Y delesyonlarını infertilite nedeninden ziyade oligo/azospermi nedeni olarak ele almak daha uygun olacaktır. Tüm AZFa bölgesi delesyonu komplet SCOS ve azospermi ile sonuçlanır. USP9Y veya DBY geni gibi AZFa bölgesinde yer alan izole genlerin delesyonu ise değişken bir testiküler fenotiple ilişkilidir. Bu tip delesyonlar şimdiye kadar sadece sporadik olarak tanımlanmışlardır. AZFb ve AZFb+c komplet delesyonları ise (P5/proximal P1, P5/distal P1, P4/distal P1) azospermi ile sonuçlanan SCOS veya spermatogenik arrest ile karakterizedir. AZFa bölgesi komplet delesyonuna sahip

hastalarda, testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) işleminde herhangi bir sperme rastlanmamıştır. AZFa delesyonu komplet delesyonunda olduğu gibi AZFb veya AZFb+c komplet delesyonlarının tanısı sperm sayısı düzeltilmesi ile uyumsuzdur ve bu hastalara ICSI önerilmemelidir (37). AZFc bölgesi delesyonları ise değişken bir klinik ve histolojik fenotiple ilişkilidir (37,54,70). Genel olarak AZFc delesyonları rezidüel spermatogenezle uyumludur. AZFc delesyonları, azospermik veya ciddi oligospermik erkeklerde bulunabilir ve nadiren de erkek yavruya geçebilir. Azospermik ve AZFc delesyonlu erkeklerde TESE ile sperm elde etme şansı yüksektir ve ICSI ile çocuk sahibi olabilirler. Bu hastaların erkek çocukları ise AZFc delesyonlu olacaktırlar (37).

Delesyonlarla ilişkili olan fenotipler değişkendir ve genellikle delesyonun lokalizasyonu ile klinik fenotip arasında bir bağlantı yoktur (20).

3.7. Çalışmanın Amacı

İnfertilite, üretken çağıdaki çiftlerin %10-15'inde görülen major bir sağlık problemidir (2,3). Erkek faktörü infertil çiftlerin en azından %50'sinden sorumludur (4). Erkek faktörlü infertilitede hormon üretimindeki bozukluklar, testiküler yapı, ejakulasyon ve/veya spermatozoanın kendisi konsepsiyon şansını zıt yönde etkileyebildiği gibi pek çok genetik nedenlerin de bu durumdan sorumlu olduğuna inanılmaktadır (9). Dolayısıyla bu durumun etyolojik nedenlerinin tam olarak aydınlatılması çiftleri çocuk sahibi olamama kabusundan kurtaracaktır. İnfertil erkeklerde bulunan kromozomal anomaliler, ya gonozomal anöploidilerdir veya mayozda normal kromozomlar gibi davranan, fakat germ hücre bozukluğuna yol açan yapısal anomalilerdir (9). Y kromozomu mikrodelsyon taraması, hastanın

azospermisi veya oligospermisinin nedeninin anlaşılmasına ve prognozun belirlenmesine yardımcı olur (37). Sitogenetik analizler, moleküler çalışmalar ve bu incelemelerin sonucunda hastalara verilecek olan genetik danışmanlık özellikle azospermik ve oligospermik infertil erkek grubunda infertiliteye yol açan genetik faktörlerin belirlenmesine ve yardımcı üreme teknikleriyle doğacak olan çocuklardaki genetik riskleri tayin etmeye yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada amaç azospermi ile normospermi arasında yer alan daha geniş bir yelpazedeki infertil hastalardaki sitogenetik ve Y kromozom mikrolelesyon taramasını değerlendirmektir. Ayrıca infertil hasta grubu ile fertil kontrol grupları arasında bir karşılaştırma yaparak kromozomal anomali ve Y kromozom mikrolelesyonlarının hem tipini hem de frekansını belirlemek ve tüm bu testlerin sonucunda hastalara genetik danışmanlık vererek, yardımcı üreme teknikleri hakkında bilgi verip hastalara yardımcı olmaktır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca onaylanan çalışmada, hastalar Elazığ ili ve çevresinde yaşayan, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.na infertilite nedeniyle başvuran bireylerden seçildi. Bu hastalardan kendi rızaları alınarak kan örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak fertilitesi kanıtlanmış, en az bir veya daha fazla çocuğu olan bireyler çalışmaya alındı. Bu çalışmada 90 infertil hasta ve 75 kontrol grubu olmak üzere toplam 165 birey çalışmaya alındı. Sperm parametreleri WHO'ya (1999) göre değerlendirilen 90 hastanın 30'u nonobstruktif azospermik, 30'u oligospermik, 30'u ise normospermik infertil hasta idi. Çalışmaya alınan bireylerden en küçük olanı 20 ve en büyük olanı ise 44 yaşındaydı. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin demografik sonuçları Tablo 1'de özet olarak sunulmuştur.

Tablo 1: Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri (Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir).

	Azospermik	Oligospermik	Normospermik	Kontrol
n	30	30	30	75
Yaş	31.47 $\pm$ 6.82	30.57 $\pm$ 5.26	30.57 $\pm$ 5.62	30.83 $\pm$ 5.25

Vakalar çalışmaya alınırken aşağıdaki kriterler göz önünde bulunduruldu:

1. Spermioqramında azospermi saptanan, pellet negatif vakalara yapılan testis biopsisi sonucunda nonobstruktif azospermi ve hormon profilinde yüksek FSH saptanan bireyler.
2. Semen analizi sonucunda oligospermi veya normospermi çıkan, hormon profili normal sınırlarda olan bireyler.
3. Yaş ortalaması reproduktif dönemde olan erişkin bireyler.
4. Fertilitesi kanıtlanmış, en az bir çocuğu olan erişkin erkekler.

Spermioqramında azospermi tespit edilip, testis biopsisi sonucu normal olan obstruktif azospermi tanısı konan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

4.2. Sitogenetik Preparatlarının Hazırlanması

4.2.1. Kullanılan Solüsyonlar, Araç Ve Gereçler

Kolşisin (Biological Industries, Israel), Metanol (Merck, Darmstadt, Germany), Etil alkol (Merck, Darmstadt, Germany), Mc Coy's 5A Basal Medyum (Irvine Scientific, California), New Born Calf Serum (Biological Industries, Israel), L- Glutamin (Sigma, U.S.A, Germany, U.K), Fitohemaglutinin (PHA) solüsyonu (Biological Industries, Israel), Penisilin- Streptomisin-Niasin (Biological Industries, Israel), Glasiyel asetik asit (Merck, Darmstadt, Germany), % 70- % 85 - % 100'lük etanol, Giemsa boyası (Merck, Darmstadt, Germany), Söransan tamponu (pH=6.80), Trypsin Certified (Difco, 1:250), Distile su, Entellan (Merck, Darmstadt, Germany), Heparin (A.I.), KCl (Potasyum klorid), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany), $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany), mikroskop (Nikon Eclipse E600), etüv (Nüve EN 400), santrifüj (Hettich Universal), hassas elektronik

terazi (Chyo), enjektörler, pipetler, 15 ml'lik kültür tüpleri, şaleler, mezürler, lamel, lam, fotoğraf filmi, pH metre (HANNA Instruments).

4.2.2. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Hipotonik solüsyon : 0.075 M KCl 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

Fiksatif (Tesbit solüsyonu) : 1:3 oranında asetik asit: metil alkol (metanol) ile hazırlandı. 2 ml asetik asit ve 6 ml metil alkol karıştırıldı.

Söransan Tamponu (pH = 6.80) : 18.96 gr Na₂HPO₄ ve 18.16 gr KH₂PO₄ 1000 ml distile suda çözüldü. Daha sonra toplam hacim 2000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon 1 N NaOH veya 1 N HCL ile pH=6.80'e ayarlandı.

Giemsa Boya Solüsyonu : 5 ml Giemsa boyası üzerine pH'ı 6.80 olan söransan tamponundan 95 ml ilave edilerek hazırlandı.

4.2.3. Periferik Kan Kültür Ortamının Hazırlanması

1. Mc Coy's 5A Basal medium.....100 ml
2. New Born Calf Serum..... 20 ml
3. L-Glutamin.....1 ml
4. Fitohemaglutinin (PHA) solüsyonu..... 4.25 ml
5. Penisilin- Streptomisin-Niasin..... 1 ml

Yukarıda belirtilen oranlar kullanılarak hazırlanan besi yerinden steril, kapaklı tüplere 5 ml konularak -20°C'de saklandı. Kültür yapılmadan önce besiyeri oda ısısında çözülerek kullanıldı.

4.2.4. Hazırlama İşlemleri

Steril disposable 5 ml'lik enjektör 0.5 ml heparinle yıkandı. Heparinle yıkanmış enjektör ile hastalardan 3-4 ml venöz kan alınarak içerisinde 5 ml besi yeri olan tüpe 8-10 damla (0.5 ml) ekildi ve ekimden hemen sonra 37°C'de etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Kültürün 70. saatinde 100 µl (10 µg/ml) kolşisin ilave edilerek tüp hafifçe alt üst edildi. 2 saatlik 37°C'de inkübasyonu takiben 72. saatte etüvden çıkarılan deney tüpleri, 1250 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki supernatant, pastör pipeti ile atıldı. Pellet üzerinde kalan 1 ml'lik sıvı, pastör pipeti ile karıştırıldı ve üzerine hipotonik solüsyondan 8 ml (0,075 M KCl) vorteks kullanılarak damla damla ilave edilerek 37°C'de 20 dakika bekletildi. Süre sonunda tekrar 1250 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak dipteki pellet üzerine 8 ml fiksatif damla damla ilave edildi. Tekrar 1250 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Fiksasyon üç kez tekrar edildi. Son fiksasyondan sonra pastör pipeti ile süpernatant atılarak hücreler karıştırıldı. Süspansiyon pipete çekildi. Önceden temizlenmiş ve üzerine ad, soyad, tarih, sıra numaraları yazılmış lamlar kuvvetli nefesle nemlendirildi. Hücre süspansiyonu 8-10 cm'lik mesafe ve 45°'lik bir açı ile lam üzerine damlatıldı. Preparatlar oda sıcaklığında bir hafta yaşlandırılarak GTG bantlama metodu ile bantlandı.

4.3. Moleküler Çalışmalar

4.3.1. Örneklerin alınması, saklanması ve analizlere hazırlanması

İncelemeye alınan tüm hastaların antekübital veninden alınan kanları DNA izolasyonu için daha önceden hazırlanmış EDTA'lı tüplere 2cc olarak alındı. Kan alma işleminden sonra DNA saflaştırılması yapılabilecek kadar kanlar ortalama olarak

1 hafta -20°C’de bekletilerek birkaç defa alt-üst edilip homojen hale getirildikten sonra çalışıldı.

4.3.2. Kimyasal maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar

DNA purifikasyon kiti (Promega Cat.#1125), 1.5 ml’lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 100 ve 1000 µl’lik pipet (Eppendorf), pipet uçları (Axygen scientific), mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157.MP, Germany ve Eppendorf microcentrifuge type 5415C, Germany), elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan), hız ayarlı vorteks (Labinco L46, he Netherlands), elektroforez aparatı 1200V-500mA E815 (Belgium), electrophoresis box (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout,Belgium), Eppendorf Mastercycler gradient (Netheler Mlnz Gmbh, 22331 Hamburg, Germany), UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France), amonyum asetat, amonyum klorür, potasyum hidrojen karbonat, sodyum dodesil sülfat (SDS), izopropil alkol, % 70’lik etil alkol, borik asit, EDTA, bromphenol blue, xylene cyanole, ficoll, agaroz, ethidium bromide, TRIS baz, potasyum asetat, magnesium asetat, TRIS-asetat, DTT (dithiotreitol), deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Larova, Gmbh,Germany), Taq DNA polimeraz (Bioron Ludwigshafen, Germany), Magnezyum Klorür, 100bp DNA step marker’leri (Favorgen, Biotech corp.,Taiwan).

4.3.3. DNA İzolasyonu

DNA saflaştırılması Promega firmasından alınan ticari “Wizard Genomic DNA Purification Kit”i ile gerçekleştirildi. Deney aşamaları aşağıdaki şekilde uygulandı:

1. 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lizis solüsyonu eklendi.
2. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı, sonra 300 µl kan cell lysis solusyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi, bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edildi. 13 000-16 000 rpm’de de 20 saniye santrifüj edildi.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.
5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
6. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visküz bir hale geldiği gözlemlendi. Karıştırma sonunda hücre çökeltileri görünürse bunlar çözülene kadar solüsyon 37°C de inkübe edildi. Eğer 1 saat sonra hala çökeltiler görülüyorsa ek olarak 100 µl nuclei lysis solüsyonu ilave edilip inkübasyon tekrarlandı.
7. 1.5 µl Rnase solüsyonu eklendi ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi için beklenildi.

8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 10-20 saniye vortekslemedi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. 13 000-16 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktararak karıştırıldı.
11. Solüsyon alt-üst edilerek ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar karıştırıldı.
12. 13 000-16 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
13. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklendi ve -20°C'de saklandı.

4.3.4. PCR Protokolü

- 20°C'de saklanmış olan DNA'lar çıkartılarak 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi ve üstte kalan % 70'lik etanol atıldı. DNA örneklerinin üzerine 50 µl distile su konarak oda ısısında 1 saat, takiben 37°C'lik etüvde bir gece beklemeye bırakıldı.

4.3.5. Oligonükleotidler (primerler)

Çalışmada Biobasic firmasına (Biobasic, Ontario, Canada) ait primerler (oligonükleotidler) kullanıldı. Bu primerler PCR deneylerinde insan DNA'sı üzerinde ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirecek şekilde seçildi. Çalışmada DNA varlığını göstermek için ZFX/ZFY geni internal kontrol olarak tercih edildi. sY14 (SRY) primeri, Y kromozomu kısa kolunda yer alan TDF geni varlığını belirlemek için, negatif kontrol olarak ise bidistile su (ddH₂O) kullanıldı. Kullanılan primerlerin nükleotid sekansları tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan primerlerin nükleotid sekanslar

Primer adı	Primer sekansı	AZF bölgesi	PCR ürün boyutu
ZFX/ZFY	F- ACCRCTGTACTGACTGTGATTACAC R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	İnternal kontrol	495 bp
sY14	F- GAATATTCCCGCTCTCCGGA R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	Kontrol	472 bp
sY84	F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC	AZFa	326 bp
sY86	F- GTGACACACAGACTATGCTTC R- ACACACAGAGGGACAACCCT	AZFa	320 bp
sY127	F- GGCTCACAAACGAAAAGAAA R- CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	AZFb	274 bp
sY133	F- ATTTCTCTGCCCTTCACCAG R- TGATGATTGCCTAAAGGGAA	AZFb	177 bp
sY134	F- GTCTGCCTCACCATAAAACG R- ACCACTGCCAAAACCTTCAA	AZFb	301 bp
sY254	F- GGGTGTTACCAGAAGGCAAA R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	AZFc	400 bp
sY255	F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT R- CTCGTCATGTCATGTGCAGCCAC	AZFc	126 bp

PCR işleminde kullanılacak olan primer konsantrasyonu 20 pmol, PCR son hacmi de 25µl olarak planlandı. Yapılan ön denemeler sonucunda en iyi sonucun 20 pmol ile elde edildiği gözlemlendi. Stok ve çalışma primerleri hazırlanarak derin dondurucuda saklandı.

4.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Her bir 0.5'lik tüpe 5 µl hasta DNA'sı ve üzerine 2.5 µl MgCl₂, 2.5 µl 10X buffer, 2.5 µl dNTP (2.5mM) (Larova, GmbH, Germany), her bir forward ve reverse primerden 2 µl (20pmol), 0.2 U Taq DNA polimeraz (Bioron Ludwigshafen, Germany) ve 8.5 µl ddH₂O konuldu. Hazırlanan tüpler vortekslendi ve PCR için hazır hale getirildi.

Hasta ve kontrollerden elde edilen DNA örnekleri PCR ile çoğaltıldı. PCR koşulları Simoni ve arkadaşlarınca belirlenen protokole göre uygulandı (71). Buna göre; PCR işleminin birinci aşamasında çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek amacıyla tek bir döngü 5 dakika 94°C'de gerçekleştirildi. PCR işleminin ikinci aşamasında ise sırasıyla 94°C'de 30 saniye denatürasyon (melting), 56 °C'de 40 saniye bağlanma (annealing) ve 65°C'de 4 dakika uzatma (extension) olmak üzere 35 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Üçüncü aşama olan en son siklustaki uzatma periyodu 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Total PCR ürününün %40'ı agaroz jel elektroforezinde koşturuldu. Agaroz jelin yüzdesi DNA fragmentlerinin beklenen hacimlerine göre belirlendi. PCR ürünleri daha ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

4.3.7. PCR Optimizasyonu

Bu metodla yapılan PCR denemelerinde en iyi sonucu alabilmek için bağlanma ısısında bazı değişiklikler yapıldı. Sırasıyla 52°C, 55°C, 56°C ve 57°C bağlanma ısıları kullanıldı. En iyi sonuç bağlanma ısısının 56°C olduğu PCR ürünlerinde saptandı. Delesyon saptanan her bir hasta için 4 defa PCR kuruldu. Her bir hasta için kurulan 4 PCR ürünüde de bant görülmediği takdirde Y kromozom mikrolelesyon varlığı teyid edildi.

4.3.8. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturuldu. Agaroz peqGOLD Laboratories (Germany) firmasından satın alındı. % 3'lük agaroz jelin hazırlanmasında 3gr agaroz tartılarak üzerine 120 ml 0.5XTBE tamponu eklendi ve mikrodalga fırında eritildi. Bu tamponun stok şekli olan 5X tampon şu şekilde hazırlandı: 54gr TRIS-base, 27.5 gr borik asit, 20mL 0.5 M EDTA (pH 8) bir miktar distile su içinde çözülerek 1L'ye tamamlandı. Elektroforez için horizontal tipte jel elektroforez sistemi kullanıldı. Eriyen agaroz-TBE solüsyonu içerisine UV ışığında DNA fragmanlarını görmek için 7 µl Ethidium bromide (EtBr) konuldu ve agaroz-TBE solüsyonu içinde iyice karışması sağlandı. Hazırlanan solüsyon daha önce kenarları bantlanmış olan elektroforez aparatına döküldü ve donmaya bırakıldı.

PCR ürünlerinden 10 µl alınarak 3 µl yükleme tamponuyla (%15 ficoll, %0.25 brom phenol blue (BPB), %0.25 xylene cyanole (XC) bir miktar distile su içinde çözülerek 100ml'ye tamamlandı) karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. DNA'lar jellere yüklenirken, beklenen bantların boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla aynı jel üzerine Favorgen firmasından (Favorgen, Biotech corp.,Taiwan) alınan 100bp

DNA step marker'i de yüklendi. Jeller oda sıcaklığında 60 V ve 25 mA sabit akımda yürütüldü. 1 saatlik yürütmeden sonra jeller UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı.

4.4. İstatistiksel Analiz

Hastaların demografik özelliklerindeki farklılıklar (yaş) her 4 gruptaki bireyler göz önüne alınarak belirlendi. Gruplara ait belirleyici (descriptive) istatistiksel testler uygulandı. Hasta ve kontrol grupları arasındaki farklılıklar Yates Ki-kare testi ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Bütün istatistiksel testler “SPSS® for Windows computing program, Version 11.5” paket programı ile gerçekleştirildi (72).

5. BULGULAR

En iyi PCR şartlarını belirlemek için sırasıyla 52, 55, 56⁰C bağlanma derecesi ile yapılan deneyler sonucunda en uygun bağlanma sıcaklığının 56⁰C olduğu gözlemlendi. Bant kalitesinin yeterince iyi olmasından dolayı daha yüksek sıcaklıklar denenmedi. En uygun primer miktarının da 20 pmol olduğu gözlemlendi.

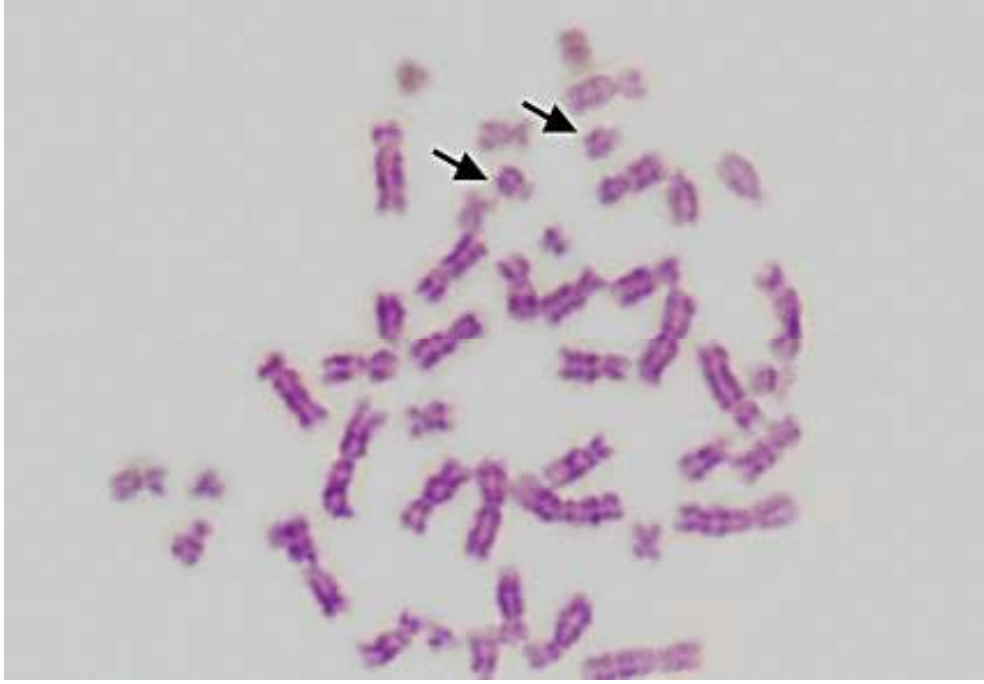
Toplam 90 hasta Yq mikrolelesyonu ve sitogenetik inceleme için tarandı. Azospermik, oligospermik ve normospermik infertil hasta gruplarının her birinden 30'ar hasta çalışmaya alındı. Azospermik hasta grubunda yer alan bireylere yapılan testis biopsisi sonucunda nonobstruktif azospermi tanısı kondu. Bunlardan 12 hastada (%40) SCOS, 10 hastada (%33.3) matürasyon arresti, 8 hastada (%26.7) ise generalize fibrozis saptandı. Hasta ve kontrol grubundaki bireylere ilk olarak sitogenetik sonuçlarını öğrenmek amacıyla karyotip analizi yapıldı. Azospermik hasta grubunda 8 hastada (%26.7) Klinefelter sendromu, 1 hastada (%3.3) 47,XYY sendromu, 1 hastada (%3.3) ise 46,XY,Yqh(+) tespit edilmiş olup, ilgili veriler tablo 3 ve 4'de gösterilmektedir. Hastalardan elde edilen sitogenetik sonuçları şekil 1, 2 ve 3'de gösterilmektedir. Azospermik hasta grubunda %33.3, oligospermik hasta grubunda %13.3, normospermik infertil hasta grubunda ise %10 oranında kromozomal anomaliye rastlandı. Kontrol grubundaki fertil bireylerde herhangi bir kromozomal anomaliye rastlanmadı. Sırasıyla hasta grupları ve belirlenen karyotipler aşağıda tablo 3'de gösterilmektedir:

Tablo 3: Hasta gruplarına göre tespit edilen karyotipler

Karyotipler	Azospermik		Oligospermik		Normospermik infertil		Kontrol	
	Frekans	%	Frekans	%	Frekans	%	Frekans	%
46,XY(normal)	20	66.7	26	86.7	27	90	75	100
47,XXY	8	26.7	1	3.3	-	-		
46,XY,Yqh(+)	1	3.3	2	6.7	2	6.7		
47,XYY	1	3.3	-		-	-		
46,XY,inv(9)inv(9)			1	3.3	-	-		
46,XY,inv(9)					1	3.3		
Toplam	30	100	30	100	30	100		

Tablo 4: Hasta bireylerde tespit edilen sitogenetik anomaliler

Hasta	Sperm sayısı	Karyotip	Y mikrolelesyonu
A5	Azospermi	47,XXY	AZFc
A6	Azospermi	46, XY,Yqh(+)	AZFb
A9	Azospermi	47,XYY/46,XY (%87.5/%12.5)	—
A11	Azospermi	47,XXY	—
A20	Azospermi	47,XXY	—
A21	Azospermi	47,XXY	—
A22	Azospermi	47,XXY	—
A23	Azospermi	47,XXY	—
A24	Azospermi	47,XXY	—
A26	Azospermi	47,XXY	—
O5	Oligoastenospermi	46,XY,Yqh(+)	—
O14	Oligospermi	47,XXY	—
O17	Oligoastenospermi	46,XY,inv(9)inv(9)	—
O29	Oligospermi	46,XY,Yqh(+)	—
N65	Normospermik infertil	46,XY,Yqh(+)	—
N69	Normospermik infertil	46,XY,inv(9)	—
N70	Normospermik infertil	46,XY,Yqh(+)	—



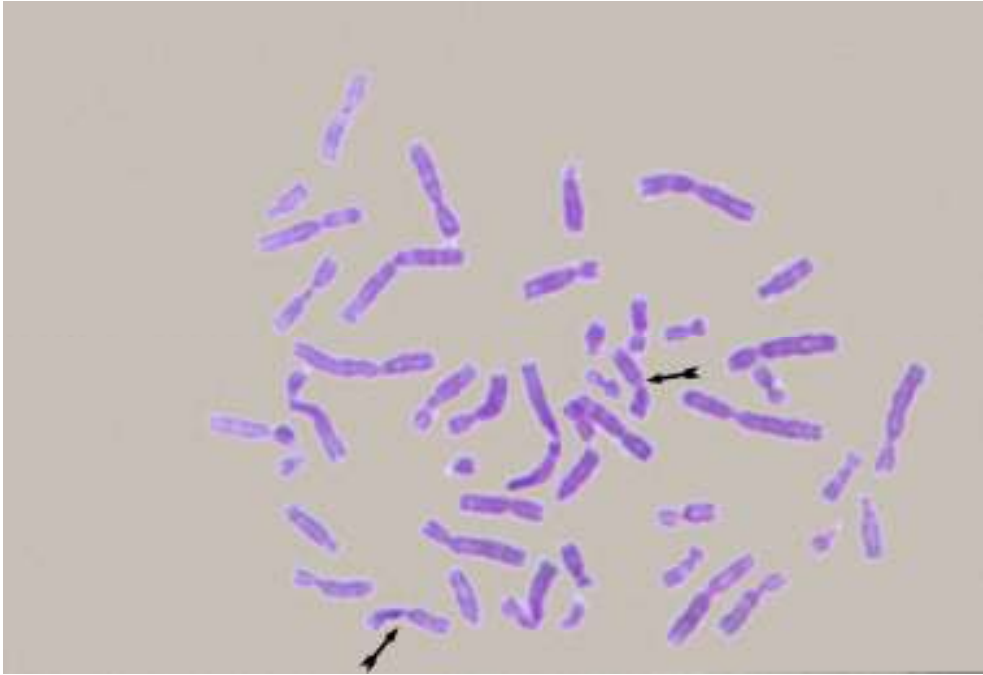
Şekil 1: 47,XY,Y karyotipi tespit edilen olgunun metafaz plağı.



Şekil 2: 46, XY,Yqh(+) karyotipi tespit edilen olgunun metafaz plağı.



Şekil 3: 46,XY, inv(9)(p11q13) karyotipi tespit edilen olgunun metafaz plağı.



Şekil 4: 46,XY, inv(9)(p11q13), inv(9)(p11q13) karyotipi tespit edilen olgunun metafaz plağı.

Hastalar daha sonra Yq mikrolelesyonu açısından incelendi. Y kromozom mikrolelesyonları tayininde Simoni ve ark. daha çok multiplex PCR'ı önermektedirler (71). Bu çalışmada önce multiplex PCR denendi, fakat delesyon bulunan bölgelerin ayırımında güçlük çekildiğinden her bir primer için basit PCR uygulandı. Böylelikle, herhangi bir mikrolelesyonu gözden kaçırma ihtimali ortadan kalktı. AZFa, AZFb ve AZFc bölgeleri için sırasıyla 2 STS (sY84, sY86), 3 STS (sY127,sY133, sY134) ve 2 STS (sY254, sY255) incelendi. Azospermik hasta grubunda 5, oligospermik hasta grubunda 4 ve normospermik hasta grubunda ise 2 Yq mikrolelesyonu saptandı (Tablo 5). En sık olarak AZFc bölgesinde (%63.6) delesyon saptanırken, AZFb bölgesinde %54.5, AZFa bölgesinde ise %9.1 oranında delesyon saptandı (Tablo 6). Azospermik hasta grubunda görülen delesyonlar en sık AZFc (%40) bölgesinde iken, bunu AZFb+c, AZFa+c ve AZFb (%20) delesyonları eşit oranda takip eder. Oligospermik hasta grubunda ise AZFb+c bölgesinin delesyonu %50 oranında görülürken bunu AZFb ve AZFc %25 oranlarıyla izler. Normospermik infertil hasta grubunda delesyonlar AZFb bölgesinde izlenmiştir.

Tablo 5: 11 hastada tespit edilen Yq11 mikrolelesyonları

Hasta	ZFY	sY14	sY84	sY86	sY127	sY133	sY134	sY254	sY255
A5	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A6	+	+	+	+	+	-	+	+	+
A10	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A12	+	+	-	+	+	+	+	+	-
A15	+	+	+	+	+	-	+	+	-
O3	+	+	+	+	+	+	+	+	-
O16	+	+	+	+	+	-	+	+	-
O18	+	+	+	+	+	-	-	+	+
O26	+	+	+	+	-	+	+	+	-
N5	+	+	+	+	+	-	+	+	+
N15	+	+	+	+	-	+	+	+	+

(+): Delesyon yok, (-): Delesyon var

Tablo 6: Yq11 mikrolelesyonlarının AZF bölgelerine göre dağılımı

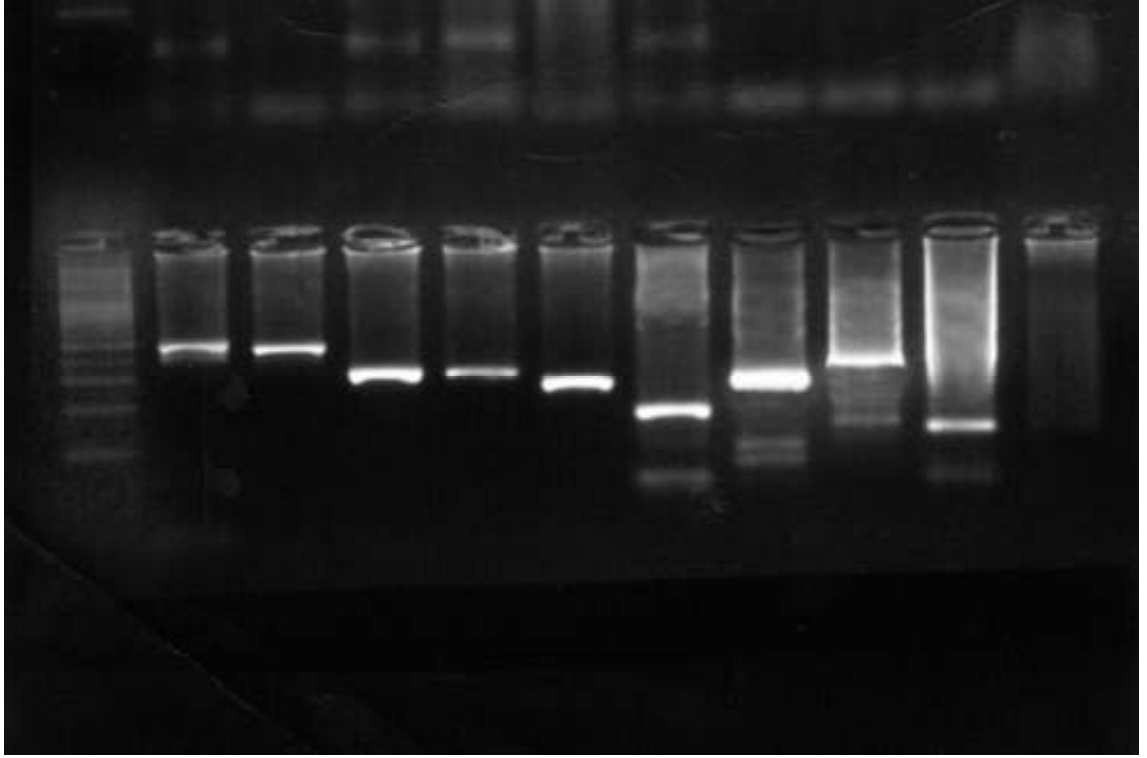
	AZFa	AZFb	AZFc
Delesyon oranı(%)	%9.1	%54.5	%63.6

Azospermik hastaların yapılan hormon değerlendirmelerinde FSH ve LH yüksek bulunurken, testesteron normalin alt sınırında tespit edildi. Oligospermik hastalarda ise FSH, LH ve testesteron düzeyleri normal ve normale yakın bulundu. Hastaların klinik özellikleri, hormon profilleri ve Yq mikrolelesyonu açısından karşılaştırılmaları Tablo 7’de yer almaktadır. AZFc bölgesinde Yq mikrolelesyonu saptanan ve moleküler inceleme sonucunda Yq mikrolelesyonu saptanmayan olguların moleküler sonuçları Şekil 5 ve 6’da gösterilmektedir:

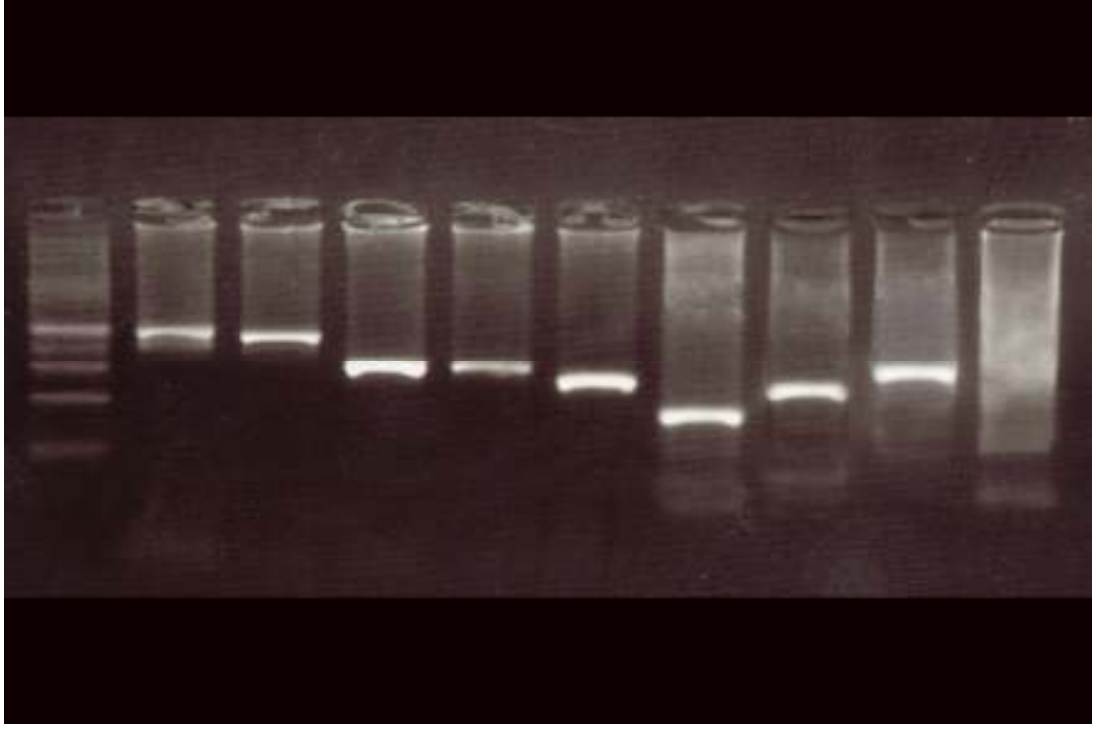
Tablo 7: Yq11 mikrolelesyonlu hastaların klinik bulguları

Hasta	Spermsayısı	Hormonprofili	Histopatolojikbulgular	Karyotip
Delesyonlubölge				
A5	Azospermik	Yüksek	SCOS	47,XXY AZFc
A6	Azospermik	Yüksek	MA	46,XY,Yqh(+) AZFb
A10	Azospermik	Yüksek	SCOS	46,XY AZFc
A12	Azospermik	Yüksek	SCOS	46,XY AZFa, AZFc
A15	Azospermik	Yüksek	MA	46,XY AZFb, AZFc
O3	Oligospermik	Normal	-	46,XY AZFc
O16	Oligospermik	Normal	-	46,XY AZFb, AZFc
O18	Oligospermik	Normal	-	46,XY AZFb
O26	Oligospermik	Normal	-	46,XY AZFb, AZFc
N5	Normospermik	Normal	-	46,XY,Yqh(+) AZFb
N15	Normospermik	Normal	-	46,XY AZFb

SCOS: Sertoli Cell Only Syndrome; MA: Matürasyon arresti



Şekil 5: Y kromozom mikrolelesyonu bulunmayan bir olgunun analizine yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1: 100bç'lik DNA boyut markırı, Sütun 2: ZFY/ZFX, Sütun 3: SRY, Sütun 4: sY84, Sütun 5: sY86, Sütun 6: sY127, Sütun 7: sY133, Sütun 8: sY134, Sütun 9: sY254, Sütun 10: sY255, Sütun 11: Bidistile su (negatif kontrol).



Şekil 6: sY255 (AZFc) bölgesinde delesyon saptanan 5 nolu azospermik hastanın agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1: 100bp'lik DNA boyut markırı, Sütun 2: ZFY/ZFX, Sütun 3: SRY, Sütun 4: sY84, Sütun 5: sY86, Sütun 6: sY127, Sütun 7: sY133, Sütun 8: sY134, Sütun 9: sY254, Sütun 10: sY255.

Hasta grupları arasındaki frekans farklılıkları tablo 8'de gösterilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında ise Yates Ki-kare testi ile kullanıldı (Tablo 9).

Tablo 8: Azospermik, oligospermik ve normospermik infertil hasta bireylerde elde edilen kromozomal anomali ve Y kromozom mikrodelesyon frekansları

		Azospermi (%)	Oligospermi (%)	Normospermik (%)	Toplam (%)
Y kromozom delesyonu	Var	5(%16.7)	4(%13.3)	2(%6.7)	11(%12.2)
	Yok	25(%83.3)	26(%86.7)	28(%93.3)	79(%87.8)
Kromozomal anomali	Var	10(%33.3)	4(%13.3)	3(%10)	17(%18.9)
	Yok	20(%66.7)	26(%86.7)	27(%90)	73(%81.1)
Genetik anomali	Var	15(%50)	8(%26.7)	5(%16.7)	28(%31.1)
	Yok	15(%50)	22(%73.3)	25(%83.3)	62(%68.9)

Tablo 9: Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması

		Hasta	Kontrol	P
Delesyon				
	Var	11 (%12.2)	0 (%0)	0.005*
	Yok	79 (%87.8)	75 (%100)	
Kromozomal				
anomali	Var	17 (%18.9)	0 (%0)	0.000*
	Yok	73 (%81.1)	75 (%100)	

*: Yates Ki-kare analizi

6. TARTIŞMA

6.1. Sitogenetik verilerin değerlendirilmesi

İnfertilite vakalarının yaklaşık %50'sinde erkek faktörü yer almaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar erkek infertilitesinin genetik temeli üzerine yoğunlaşmıştır (73). Erkek faktör infertilitesinde vakaların %60'ında sitogenetik anomaliler ve Y kromozom mikrolelesyonları söz konusudur. Azospermiklerin %13.7'sinde, oligospermiklerin ise %4.6'sında kromozomal anomaliler bulunurken, bu oran toplam infertil erkek popülasyonunun %5.1'ini oluşturmaktadır (61). Ayrıca infertil erkeklerde resiprokal translokasyonların, inversiyonların yenidoğanlar ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda bulunduğu bilinmektedir. Quilter ve ark.nın yaptığı çalışmada, 103 infertil hasta değerlendirilmiş, bunların %9.7'sinde sitogenetik anomali saptanmıştır (61). 1444 infertil erkek hastanın alındığı diğer bir çalışmada ise kromozomal anomali oranı %7.6 olarak bildirilmiştir. Bu anomalilerin özellikle cinsiyet kromozom anomalileri ve otozomal Robertsonian tipi translokasyonlar olduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmaya göre, sperm sayısı ile kromozomal anomali arasında ters bir ilişki olduğu belirtilmektedir (74). Kromozomal anomalilerin infertiliteyi nasıl indüklediği tam olarak belli değildir. Muhtemelen anormal olarak dağılan kromatinin varlığı mayotik bölünmeye engel olur ve bu yüzden sperm üretimi azalır. Anormal kromozomlu spermatozoa, anormal embriyonik gelişime ve erken gebelik kaybına neden olabilir (11). İnfertil erkeklerde kromozom anomali insidansı, oligospermik erkeklere (%1.7-4.6) göre azospermik erkeklerde (%12.5-31) daha yüksektir (73). Ayrıca, azospermik hasta grubunda cinsiyet kromozom anomalileri daha yüksek iken, oligospermik hasta grubunda

otozomal anomaliler daha sık görülmektedir. Robertsonian translokasyonlar, dengeli translokasyonlar, inversiyonlar (parasentrik veya perisentrik) ve marker kromozomlar gibi yapısal anomali insidansı da infertil erkeklerde artmıştır (73).

Bu çalışmada, azospermik hasta grubunda kromozomal anomali insidansı %16.7 bulunurken, oligospermik grupta bu oran %13.3 olarak bulundu. Daha önce yapılan çalışmalara uygun olarak azospermik hasta grubunda kromozomal anomali insidansı, oligospermik gruba göre daha yüksekti, yani sperm sayısı azaldıkça kromozomal anomali insidansının arttığı görüldü. Bu durum cinsiyet kromozom anomalileri için de geçerliydi. Azospermik hasta grubunda sadece cinsiyet kromozom anomalileri bulunurken, oligospermik hasta grubunda cinsiyet ve otozomal kromozom anomalileri birlikte görüldü. 10 azospermik hastanın 8'inde (%80) Klinefelter sendromu, 1'inde (%10) XYY sendromu, 1'inde (%10) 46XY,Yqh(+) gözlenmiştir. Literatürle uyumlu olarak bu çalışmada da azospermik hasta grubunda en sık görülen kromozomal anomali Klinefelter sendromu olarak bulundu. Oligospermik hasta grubunda bir hastada (%3.3) Klinefelter sendromu, iki hastada (%6.7) 46,XY,Yqh(+), bir hastanın ise 9 nolu kromozomunun homozigot perisentrik inversiyonu saptandı. Şamlı ve ark.nın yaptığı bir çalışmada 383 azospermik, 436 oligospermik hasta incelenmiş ve 436 oligospermik hastanın 4'ünde (%0.9) Klinefelter sendromu tespit edilmiştir. 9 nolu kromozomun heterozigot perisentrik inversiyonu bir polimorfizm olarak kabul edilmesine rağmen, homozigositesinin primer infertiliteyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (75). Normospermik infertil hasta grubunda ise iki hastada 46,XY,Yqh(+), bir hastada ise 46,XY,inv(9) saptanmıştır. 9 nolu kromozom perisentrik inversiyonunu taşıyan

hastaların anne veya babalarında taşıyıcılık gözlenirken, homozigot olan bireyin hem anne hem de babasının taşıyıcı olduğu belirlendi. Kontrol grubu ve hasta grubu karşılaştırıldığında kromozomal anomali açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

6.2. Moleküler çalışma verilerinin değerlendirilmesi

Y kromozom mikrolelesyonları spermatogenez bozukluğundan dolayı erkek infertilitesinin en sık genetik nedenleri arasındadır ve infertil erkeklerin %2.7-55.5'inde tanımlanmıştır. Y kromozom mikrolelesyonlarının frekansı, spermatogenez defektinin ciddiyeti ile artmaktadır. Sadece semen analizi, klinik bulgular veya sitogenetik analiz Y kromozom delesyonu tahminine yardımcı olamaz (3). Y kromozomu mikrolelesyonu üzerine yapılan bir dizi çalışmada mikrolelesyon frekansını azospermiklerde %12.1, oligospermiklerde %3.4 olarak göstermektedir. Fertil erkeklerde de düşük bir oranda (%2) kodlayıcı olmayan bölgelerde çok küçük delesyonlara rastlanabilir (10,76).

Tiepolo ve Zuffardi (1976), 1160 infertil erkeğin sitogenetik analizini yapmışlar ve Y kromozomu uzun kolu (Yq) distal bölgesinde %0.5 oranında delesyon bulmuşlardır. Bu yüzden Yq distal ökromatik bölgesinde bir azospermik faktör (AZF) varlığını önermişlerdir. Karyotipik analiz, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile önemli bir şekilde geliştirilmiş ve Y kromozom haritalanması yapılandırılmıştır. Diğer bir çalışmada, 50 azospermik ve oligospermik hasta çalışılmış ve 4 erkekte Yq'nun 6. aralığında (subintervalinde) delesyon saptanmıştır. Daha önceki çalışmalar, nonobstruktif veya ciddi oligospermik olan erkeklerin %3-18'inde Y mikrolelesyonu bildirilmiştir (32,77). Toplam 340 azospermik erkeğin

analiz edildiği bir çalışmada ise 29 bireyde (%8.5) Y kromozom mikrolelesyonu bulunmuş, bunların da en sık AZFc bölgesinde gerçekleştiği (%82.8), bunu AZFb (%55.2) ve AZFa (%24.1) bölgelerinin delesyonlarının izlediği görülmüştür. AZFa'da mikrolelesyonlar gözlenirken, AZFb ve AZFc'de ise makrolelesyonlar gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada, Y kromozom delesyonu bulunan azospermik erkeklerin testiküler dokularından yapılan histolojik çalışma, germ hücrelerinin tamamen kaybını ve sadece Sertoli hücrelerinin var olduğunu göstermiştir (10).

Anomalilerdeki frekans farklılıkları, farklı etnik gruplardan hastaların çalışmalara alınması, hastaların çalışmaya alınma kriterleri ve farklı STS primerlerinin kullanılması veya PCR tekniklerindeki farklılıkların sonucu oluşabilir (32). Y kromozom haplotipleri, genetik geçmiş ve çevresel etkiler de farklılık yaratabilir. Bu yüzden infertil erkeklerde mikrolelesyon analizi, infertilite etyolojisini tanımlamada ve hastaya tedavi seçeneği sunmada oldukça faydalı olabilir. Y kromozom kalıtımı paternal olduğundan ve somatik parsiyel Y kromozom delesyonu olan erkekler, yardımcı üreme tekniklerinden faydalanarak çocuk sahibi olduklarında, erkek çocukları da aynı genetik defekte sahip olabilir, bu yüzden ciddi oligozoospermili ve nonobstruktif azospermili erkeklerde yardımcı üreme tekniğine başvurmadan önce mutlaka Y kromozom delesyon analizi yapılmalıdır (31,78). Oliva ve ark. azospermi hakkındaki verileri değerlendirmiş ve dünyada mikrolelesyon frekansını %13 olarak bulmuşlardır (79). Choi ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, Y mikrolelesyonlu erkeklerden bir kez TESE veya ejakulasyon ile sperm elde edildiğinde, fertilizasyon ve gebelik oranının normal Y kromozomlu nonobstruktif erkeklerden çok da farklı olmadığı belirtilmektedir (76). Obstruktif azospermik

hastalarda spermatogenezin normal olarak devam ettiği, fakat bu hastaların testiküler spermelerinde yüksek oranda birden fazla ve büyük ölçekli mitokondriyal DNA delesyonları mevcut olduğu gösterilmiştir. Fertil erkeklerde de bu şekilde yüksek anormal sperm oranı bulunmuştur (79). Oligospermik, azospermik veya Yq mikrodelesyonlu hastaların lenfositlerinde az, fakat önemli derecede bir cinsiyet kromozom anöploid oranında artış vardır, bu da defektif hücre bölünmesi mekanizması varlığını göstermektedir (80).

Pek çok AZF delesyonu, germ hücrelerinde veya postzigotik dönemlerde oluşan delesyonlar sonucu meydana gelen de novo olaylardır. Germ hücre delesyonları, normal ve AZF delesyonlu Y kromozomu taşıyan mozaik bir sperm popülasyonu oluştururlar. Y delesyonlu bir spermle normal bir oositin fertilizasyonu yaşayan bir canlı ile sonuçlanırsa, bu canlı seksüel olarak tüm dokularında aynı AZF delesyonunu taşıyabilir ve ciddiye hafif dereceye kadar değişen spermatogenez bozukluğuna sahip veya tamamen sağlıklı olabilir (81,82,83). Bu vakaların PCR delesyon analizleri, aynı veya komşu AZF subintervallerindeki birkaç delesyonu gösterebilir (81,82). Diğer yandan, erken embriyogenez sırasında gerçekteşen postzigotik delesyonlar, AZF delesyonu olan ve olmayan somatik ve germ hücre hatlarına sahip mozaik bireylere yol açabilir. Postzigotik delesyonlar infertil bireylerde oluşmasına rağmen, infertiliteyle ilişkili pek çok AZF delesyonu probandin babasındaki germ hücre hattında gerçekteşen Y mikrodelesyonları sonucudur (12).

AZF_a ve AZF_b bölgelerinin komplet delesyonunda, tam bir genotip-fenotip korelasyonu görölmesine rağmen, kısmi AZF_a ve AZF_b ile ilişkili ve AZF_c

delesyonlarının tüm tiplerindeki değişken fenotip, çevresel ve genetik faktörlerin etkinliğini göstermektedir (43). AZFc mikrolelesyonlu bir erkeğin ejakulat veya testis dokusunda bulunan spermatozoaların kaliteleri normal olabilir. Fertilizasyon, embriyo gelişimi ve canlı doğum mümkündür. Doğan çocuklar somatik olarak sağlıklı, kızlar normal olarak üretkendirler. Erkek çocuklar ise, babalarından gelen mikrolelesyona uğramış Y kromozomunu alabilir, erişkin çağa geldiklerinde ise testis dokusunda sperm bulunan ağır oligospermik ve azospermik veya testis dokusunda sperm bulunmayan azospermik olabilirler (64).

FSH seviyesi, spermatogenezle ilişkili değildir. Ayrıca, yüksek serum FSH'sı olan hastalarda, testesteron konsantrasyonu ile serum FSH seviyesi arasında ters bir ilişki olmadığı ortaya konmuştur. İdyopatik azospermide yüksek serum FSH'sı ve Yq mikrolelesyonu arasında bir ilişki olabileceği çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (84).

Y kromozomu mikrolelesyonları, primer testikülopatilerde önemli bir genetik neden olduğundan, son zamanlarda kriptorşidizmin Y kromozom mikrolelesyonu sonucu oluştuğu öngörülmektedir (85). Pryor ve ark. varikoselli hastalarda Y kromozom mikrolelesyon oranını incelemişler ve bu oranı %3 oranında tespit etmişlerdir (83).

Y kromozom mikrolelesyonları, Sertoli Cell Only Sendromu (SCOS), matürasyon arresti ve hipospermatogenez gibi farklı spermatogenik değişikliklerle ilişkili olabilir (73,86). Vogt ve ark. AZFc bölgesindeki delesyonlara kıyasla, AZFa ve AZFb bölgelerindeki delesyonların spermatogenez bozukluğu ile daha çok ilişkili olduğuna ve bu bölgelerdeki delesyonların daha kötü prognozlu olduğuna ortaya

çıkarmışlardır (87). Ferlin ve ark. ise germ hücrelerinin tamamen yokluğu veya ciddi derecede azaldığı durumlarda Y delesyonlarında artış gözlenirken, testikülopatinin daha hafif durumlarının ise Y delesyonu ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir (46). Silber ve ark. AZFb ve ötesinde bir kayıp olduğunda, spermatogenezin tamamlanmadığını bildirmişlerdir. Bu bulgu pek çok çalışma ile uyumluluk gösterirken, bir kaçıyla da uyuşmamaktadır (55).

Y kromozom mikrolelesyonlarının infertil erkeklerde en sık moleküler genetik sebep olduğu bilinmekle birlikte, azospermiklerin %85'inde, şiddetli oligozoospermiklerin ise %90'ında delesyonlar tespit edilememektedir. Bu kişilerde genellikle tespit edilen multikopya gen ailelerinde Y kromozomu ile ilişkili varyantlar, Y spesifik gen mutasyonları, duplikasyonlar gibi genetik durum infertil fenotipi oluşturmaktadır. Androlojide fertilite normospermi ile değil, fertilitesi ispatlanmış erkekler olarak tanımlanmaktadır ve çoğu çalışmada bu kişiler kontrol grubunu oluşturmaktadır. Bu çalışmada da fertilitesi ispatlanmış erkekler, yani en az bir çocuk sahibi olan erkekler kontrol grubu olarak seçilmiştir ve herhangi bir kromozomal anomali ve Y mikrolelesyonu saptanmamıştır. Çevresel faktörler veya farklı genetik altyapı (Yq genlerinin yokluğunun kompensasyonu otozomal veya X'e bağlı faktörlerce sağlanması olasıdır) bu değişken fenotipi açıklayabilir (88). Krausz ve McElreavery 229 kontrol bireyin 12'sinde DAZ bölgesinin dışında küçük delesyonlar bildirmiştir (89). Kostiner ve ark.'a göre bu kişilerde delesyon saptanmasının nedeni polimorfik varyant taşıyıcısı teknik hata veya oligozoospermik fertiller olabileceği yönündedir (90). AZFa veya AZFb bölgelerinin tamamının (komplet) delesyonu Sertoli cell-only ve spermatogenetik arrest ile ilişkilidir (90,91).

Bu bölgelerin parsiyel delesyonu veya AZFc bölgesinin parsiyel veya komplet delesyonu hipospermatogenez (oligospermi) ile Sertoli cell-only sendromu arasında değişken fenotiplerle uyumlu gözükmemektedir. Bu fenotipik varyasyon, AZFc delesyonu olan hastalarda görüldüğü gibi, zaman içinde germinal epitelyumun progresif regresyonu gibi bir mekanizma ile de açıklanabilir (92). Ayrıca kişilere ait genetik alt yapı ve çevresel faktörlerin etkisi ile de açıklanabilmektedir. Tüm hastaların hormonal durumları analiz edilmiş iki Danimarka çalışma grubunda tüm hastalarda FSH seviyeleri ortalamanın üzerinde tespit edilmiştir (88,93). Foresta ve ark. ise mikrodelesyonlu hastalardaki Sertoli hücre fonksiyonunun idiopatik olanlara göre daha az şiddetli olduğunu savunmaktadırlar (94).

Y delesyonlarının ortaya konulması diagnostik, prognostik ve koruyucu öneme sahiptir. Azoospermiklerde saptanabilecek komplet AZFa veya AZFb delesyonu, testiküler sperm elde edilmesi açısından negatif prognostik değere sahiptir (91). Oligospermik hastaların da zaman içinde progresif olarak sperm konsantrasyonu azalması riski bulunmaktadır. Bu nedenle bu kişilere ait sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonu ileride TESE gibi invaziv tekniklere maruz kalmasını engelleyebilir (16). Yq mikrodelesyonu olan hastaların IVF, ICSI ve hatta doğal konsepsiyonla ile fertil oldukları bilinmektedir. Ancak delesyonu olmayan erkeklerde gözlenen fertilizasyon oranı ve embriyo gelişimi açısından bu grubun farklılık gösterip göstermediği bilinmemektedir (96).

1995 yılından beri yapılan çalışmalar Y kromozom mikrodelesyonlarını şiddetli erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde rutin çalışmanın bir parçası haline getirmiştir. Başlangıç dönemlerindeki delesyon frekansındaki değişkenlikler, fertil

erkeklerdeki delesyonların varlığı, en yüksek sensitiviteyi sağlayacak STS sayısı gibi konular hemen hemen çözümlenmiştir. Delesyon frekansının sperm sayısı (oligo veya azospermik) ve etyoloji (idiopatik veya non-idiopatik) subgruplarında farklılık gösterdiği bilinmektedir. Normospermik bireylerde delesyonların olmaması veya daha az olması, delesyonlar ile spermatogenez arasında spesifik bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Ayrıca bundan daha önemlisi tüm markerların taranması yerine iyi seçilmiş daha az sayıda markerın tanısal amaçlı çalışılması uygundur (58). Bu şekilde iyi seçilmiş markerlar ile %95'in üzerinde klinikle ilişkili delesyonlar saptanabilir (71). Birçok çalışmaya rağmen bugün AZF genlerinin fonksiyonlarının, gen-spesifik delesyonlar ve mutasyonların, multikopya gen ailelerinin tek veya multipl kopyalarının delesyonlarının önemi, inversiyon ve duplikasyonlar gibi diğer yapısal anomalilerin spermatogenetik hasar yönünden etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Her ne kadar kesin bir fenotip-genotip korelasyonu sadece komplet AFZa ve AZFb delesyonlarında görölse de, parsiyel AZFa, AZFb ve tüm AZFc delesyon tiplerindeki değişken fenotip, genetik temelin önemini ve çevresel faktörlerin spermatogenez üzerindeki etkilerini göstermektedir (71).

Proximal delesyonu olan infertil erkeklerde (AZFa ve AZFb bölgeleri) spermatogenezde önemli defektler gözlenirken, örneğin SCOS yüksek prevalansı gibi, distal AZFb ve AZFc bölgeleri delesyonları, rezidüel spermatogenezle uyumlu olabilir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %10-15'inde, Y kromozomunda yapısal değişiklikler bulunmaktadır. Testis diferansiyasyonunu kontrol eden Y kromozomu SRY bölgesi sağlamdır, fakat delesyonlar azospermi veya ciddi oligospermiyle sonuçlanan Y kromozomu uzun kolunda bulunabilirler. AZF gen bölgesindeki

delesyonlar, 4000 erkekte birinde oluşabilen de novo delesyonlarla spermatogenik bozukluğun en fazla tanımlanan nedenidir. De novo Y delesyon yüksek frekansı Y kromozomunun spontan genetik materyal kaybına yatkın olduğunu gösterir. Y kromozomu instabilitesi, kromozom boyunca kümelenen tekrarlayıcı elementlerin yüksek frekansına da bağlı olabilir ve delesyonlar rekombinasyon veya DNA replikasyonu sırasındaki kaymalarla oluşabilir (44).

PCR, Yq mikrolelesyonlarını bulmada oldukça duyarlı bir tekniktir. Üç büyük AZF gen bölgesi delesyonunun %90'ından fazlası bir primer seti kullanılarak bulunabilir. Genellikle ciddi infertilitesi olan erkekler tedaviye başlamadan önce Yq mikrolelesyonu açısından taranmalıdır. Herhangi bir delesyon tespit edilirse, en çok göz önüne alınması gereken durum, delesyonun babadan oğula geçebilmesidir. Normal olarak fertil erkeklerde bu tip delesyonlar oluşmadığından, Y kromozom mikrolelesyonu olan babanın erkek çocuğu infertil olacaktır (44).

Yayınlanmış literatür bilgisi doğrultusunda Y kromozom mikrolelesyonları hakkında şunlar söylenebilir:

- 1- Y delesyonları özellikle 1 milyon spermatozoa/ml altında olan hastalarda tespit edilmektedir.
- 2- Delesyonlar 5 milyon spermatozoa/ml üzerindeki sperm sayılarında oldukça nadirdir (yaklaşık %0.7) ve tek STS'nin delesyonunun olduğu durumlarda Southern blotting gibi bir teknik ile doğrulanmadan delesyonun önemi şüphe ile karşılanmalıdır.

3- En sık delesyon frekansı AZFc (yaklaşık %60) bölgesindedir. Bunu AZFb ve AZFb+c veya AZF a+b+c bölgeleri (%35) izlemektedir. AZFa bölgesi oldukça nadirdir(%5).

4- İzole gen-spesifik delesyonlar oldukça nadirdir ve şu ana kadar sadece AZFa bölgesinde tespit edilmiştir.

5- Delesyonlar diğer androlojik bulgularla birlikte (varikozel, kriptorşidizm, hipogonadotropik hipogonadizm, obstruktif azospermi) görülme olasılığı (%7) açısından bağımsızdır (37).

Y kromozom mikrodelesyonunu frekansını inceleyen pek çok çalışmada, ciddi spermatogenez bozukluğu olan seçilmiş bir grup infertil erkek çalışmaya alınırken, diğer taraftan sadece infertilite kliniğine başvuran seçilmemiş erkekleri kapsayan az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu yüzden, erkek infertilitesini değerlendirmede Y kromozom mikrodelesyonunun klinik önemini saptamak için, infertilite kliniklerine başvuran ve seçilmemiş infertil çiftlerin erkek partnerlerini inceleyen çalışmalara ihtiyaç vardır (78).

Bu çalışmada infertilite nedeniyle laboratuvarımıza başvuran ve semen analizi sonucunda azospermi, ciddi veya hafif oligospermi ve normospermi olan hasta grupları Y kromozom mikrodelesyonu için incelendi. Her bir AZF bölgesinden tek bir nonpolimorfik STS lokusunun analizi AZFa, AZFb veya AZFc bölgelerinin herhangi birinde delesyon olduğunu tayin etmede yeterliydi, fakat her bir bölgeden en az 2 STS lokusu değerlendirilerek tanısal doğruluk teyid edildi. Bu incelemelerin sonucunda 5 (%16.7) azospermik hastada, 4 (%13.3) oligospermik hastada, 2 (%6.7) normospermik infertil hastada Y mikrodelesyonu saptandı. Bu oranlar daha önce

yapılan çalışmalara uygundur. Yine literatürde belirtildiği gibi en fazla delesyon görülen bölge AZFc (%63.6) iken bunu sırasıyla AZFb (%54.5) ve AZFa (%9.1) bölgeleri izlemekteydi. Hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise Y mikrolelesyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

şu ana kadar yayınlanan bilgiler ve geçen yıllardaki deneyimleri, tanısal protokollerin oldukça farklı olduğunu, yanlış veya tamamen doğru olmayan tanıların gerçekleştiği ortaya konmuştur. Bu yüzden, Avrupa Androloji Akademisi (European Academy of Andrology- EAA) ve Avrupa Moleküler Genetik Kalite Birliği (European Molecular Genetics Quality Network- EMQN) adı altında bir grup, Y kromozom mikrolelesyonları moleküler tanısında laboratuvar prensiplerinin yayınlanmasını önermişler ve bunu desteklemişlerdir (37). Bu çalışmada da EAA ve EMQN'a göre laboratuvar prensipleri uygulandı. Fakat EAA ve EMQN'e göre primerlerin en iyi bağlanma ısısı 57⁰C olarak belirtilirken, bu çalışmada 56⁰C'de en iyi sonuç elde edildi ve uygulandı.

Sonuç olarak, moleküler genetiğin hızlı gelişimi kromozomal anomaliler ve Y kromozomu mikrolelesyonlarının erkek faktörlü infertilitede önemli bir neden olduğunu ve ciddi testikülopatinin en sık genetik etyolojisini oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu tip bulgular hem erkek infertilitesinde dikkatli bir tanı, hem de tedavisi için esas oluşturmaktadır. Bu nedenle, genetik taramalar şimdilerde büyük androloji ve infertilite merkezlerinde temel bir ögedir. Y kromozom mikrolelesyonlarının prognostik değerinden dolayı, yardımcı üreme tekniklerinden faydalanmadan önce, sitogenetik analiz ve bu delesyonlar yönünden bir tarama önerilmektedir. İnfertil bir erkekte, bir kromozomal anomali veya mikrolelesyon

bulunması, hastalığın tanısını sağlar, klinikçileri fertilitiyi sağlamada gereksiz ve pahalı yöntemlerden uzaklaştırır, bazı önemli etik sorunlara çözüm getirir. Öncelikle hasta kromozomal anomali yönünden değerlendirilmeli, daha sonra gen düzeyinde incelemeler gerçekleştirilmelidir. Herhangi bir mikrolelesyon tespit edilirse, en çok göz önüne alınması gereken durum, delesyonun babadan oğula geçebilmesidir. Zira babada Y kromozom mikrolelesyonu saptanmışsa bu kişinin erkek çocuğu infertil olabilir. İnsan fertilitesi hakkındaki moleküler genetik bilgi hızla artmakta olduğundan, Yq mikrolelesyon çalışmaları daha geniş kapsamlı tanısal metodlar ve spermatogenez hakkındaki bilgilerin gelişmesi açısından yardımcı olacaktır. Yardımcı üreme tekniklerindeki yaklaşımlar insan üremesinin moleküler incelemesiyle hızla artacaktır. Bu yüzden bu moleküler bilgiye klinikte de kullanılması açısından artan bir oranda ihtiyaç vardır (44).

Varikosel veya kriptorşidizm gibi nedenlere bağlı kalmadan sperm sayısı 5×10^6 /ml altında olan tüm erkeklerde Y kromozom mikrolelesyonları için moleküler tanısal test mutlaka önerilmelidir. Spermatogenezde AZF aday genlerinin rolünün tanımlanması spermatogenez biyolojisini anlamamızda önemli gelişmeler sağlayacağı gibi, erkek germ hücre gelişimindeki potansiyel rolüyle Y kromozomu genlerinin analizi, bu kromozomun diğer önemli özelliklerini de ortaya çıkaracaktır (20).

Y kromozom mikrolelesyonu tayininde, tüm markerların taranması yerine iyi seçilmiş daha az sayıda markerın tanısal amaçlı çalışılması uygundur. Her vakada her bir AZF bölgesinden en az iki STS lokusuna bakılmalıdır. Bu STS'ler AZFa için sY84 ve sY86, AZFb için sY127 ve sY134, AZFc için ise sY254 ve sY255'dir. Eğer

herhangi birinde delesyon varsa, her bir AZF bölgesinin proximal ve distal sınırlarındaki lokuslara kadar analiz genişletilebilir. (8).

Bu çalışmada da, her bir AZF bölgesinden delesyonun en fazla gözleendiği, yukarıda belirtilen STS'ler çalışıldı. Ayrıca AZFb bölgesi için sY133 de çalışıldı. İleride hastaların delesyon tespit edilen bölgelerinin distal ve proximalindeki STS'ler de analiz edilerek delesyonun tam veya kısmi olduğu yönünde bilgi edinilmesi amaçlanmaktadır. Erkek infertilitesi etnik popülasyonlar arasında da farklılık göstermektedir. Bu yüzden araştırmacılar bunu mutlaka göz önünde bulundurmalıdır ve infertil erkekleri incelerken stratejilerini buna göre belirtmelidirler (10). Klinisyenler ise, infertil erkeklerde özellikle yardımcı üreme tekniklerine başvurmadan önce hastaları genetik incelemeye, gerekli olduğu takdirde de genetik danışmanlığa yönlendirmelidir.

İleride çalışmalar Y kromozom dışındaki fertilite genleri üzerine olacaktır. Hayvanlar üzerindeki çalışmalarla giderek daha fazla sayıda otozomik ve X'e bağlı gen ortaya konulmaktadır. Moleküler genetik ve hayvan modellerindeki bilgi birikimi, daha da önemlisi insan genom projesinden elde edilen bilgiler erkek fertilitesi alanında geniş çapta araştırmalar için mükemmel bir temel oluşturacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Barbieri RL. Female infertility. In Strauss FJ, Barbieri RL (eds), Reproductive endocrinology. Pennsylvania: Elsevier Inc., 5th ed, 2004, pp 633-668.
2. Tuarnaye H. Gamete source and manipulation. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD. Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting. Geneva: WHO, 2002, pp 83-101.
3. Mittal RD, Singh G, Srivastava A, Pradhan M, Kesari A, Makker A, Mittal B. Y chromosome micro-deletions in idiopathic infertility from Northern India. Ann Genet. 2004; 47:331-7.
4. O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. Hum Reprod. 2002 Jun;17:1565-70.
5. Özdiler E, Aydos K. Klinik Androloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 2000.
6. Bakacak ZB. Antimüllerian hormonun ıvf sikluslarında over rezervini belirlemedeki rolü. Uzmanlık Tezi. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.
7. Akın H. Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon Uygulanan İnfertil Olgularda GnRH Antagonist Ve Agonist Uzun Protokollerinin Karşılaştırması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Süleymaniye Kadın Hastalıkları Ve Doğum Eğitim Ve Araştırma Hastanesi; 2005.

8. Bienvenu T, Patrat C, Jouannet P. Molecular detection of Y chromosome microdeletions: a new approach based on the denaturing gradient gel electrophoresis. *Gynecol Obstet Fertil*. 2003;31:639-46.
9. Griffin DK, Finch KA. The genetic and cytogenetic basis of male infertility. *Hum Fertil (Camb)*. 2005;8:19-26.
10. Thangaraj K, Gupta NJ, Pavani K, Reddy AG, Subramanian S, Rani DS, et al. Y chromosome deletions in azoospermic men in India. *J Androl*. 2003;24:588-97.
11. Nagvenkar P, Desai K, Hinduja I, Zaveri K. Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia & non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res*. 2005 Jul;122:34-42.
12. Richard SM, Bianchi NO, Bianchi MS, Peltomäki P, Lothe RA, Pavicic W. Ethnic variation in the prevalence of AZF deletions in testicular cancer. *Mutat Res*. 2004;554:45-51.
13. Tanagho EA, McAninch WJ. *Smith's General Urology*. 14th ed. USA: Prentice-Hall International Inc; 1995.
14. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Yq microdeletions--azoospermia factor candidate genes and spermatogenic arrest. *J Biomol Tech*. 2004;15:176-83.
15. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. *Erkek Reprodüktif Sistem hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul: Acar Matbaacılık; 2004.
16. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are

- undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2001;76:479-84.
17. Lipshultz LI, Howards SS. Infertility In The Male. Third Edition. USA: Mosby, 1997.
18. Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1998.
19. Siffroi JP, Chantot-Bastaraud S, Ravel C. Genetic origin of spermatogenesis impairments: clinical aspects and relationships with mouse models of infertility. *Gynecol Obstet Fertil*. 2003;31:504-15.
20. García Rodríguez J, Martín Benito JL, Rodríguez Martínez JJ, Jalón Monzón A, Rodríguez Faba O, Fernández Gómez JM, Regadera Sejas J. Infertility caused by AZF microdeletions. A new case of azoospermia. *Actas Urol Esp*. 2002;26:801-3.
21. Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Yavetz H, Lifschitz-Mercer B, Schreiber L, Kleiman SE, et al. Spermatogonial proliferation patterns in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil Steril*. 2003;80:1175-80.
22. Walsh PC. Campbell's Urology. 8th ed. USA: Saunders; 2002.
23. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSM. Sperm morphological features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986; 46: 1118.
24. Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Evenson DP, Agarwal A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2002;78:319-29

25. Giannouli C, Goulis DG, Lambropoulos A, Lissens W, Tarlatzis BC, Bontis JN, Papadimas J. Idiopathic non-obstructive azoospermia or severe oligozoospermia: a cross-sectional study in 61 Greek men. *Int J Androl*. 2004;27:101-7.
26. Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Pomerol JM, Ghosh C. EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol*. 2002;42:313-22.
27. Cayan S, Lee D, Black LD, Reijo Pera RA, Turek PJ. Response to varicocelelectomy in oligospermic men with and without defined genetic infertility. *Urology*. 2001;57:530-5.
28. Schlegel PN. The Y chromosome. *Reprod Biomed Online*. 2002;5(1):22-5.
29. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001;22:226-39.
30. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, et al. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3848-53.
31. Ali S, Hasnain SE. Genomics of the human Y-chromosome. 1. Association with male infertility. *Gene*. 2003;321:25-37.
32. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod*. 1997;12:1635-41.
33. Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod*. 2005;20:191-7.

34. Ali S, Hasnain SE. Molecular dissection of the human Y-chromosome. *Gene*. 2002;283:1-10.
35. Van Golde RJ, Wetzels AM, de Graaf R, Tuerlings JH, Braat DD, Kremer JA. Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome. *Hum Reprod*. 2001;16:289-92.
36. El Awady MK, El Shater SF, Ragaa E, Atef K, Shaheen IM, Megiud NA. Molecular study on Y chromosome microdeletions in Egyptian males with idiopathic infertility. *Asian J Androl*. 2004;6:53-7.
37. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl*. 2004;27:240-9
38. Vogt PH. Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;224:1-9.
39. Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Brown G, Weiss B, Trundley A, et al. The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. *J Med Genet*. 1999;36:670-7.
40. Affara NA. The role of the Y chromosome in male infertility. *Expert Rev Mol Med*. 2001;2001:1-16.
41. Layman LC. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet*. 2002;39:153-61.

42. Chiang HS, Yeh SD, Wu CC, Huang BC, Tsai HJ, Fang CL. Clinical and pathological correlation of the microdeletion of Y chromosome for the 30 patients with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Asian J Androl*. 2004;6:369-75.
43. Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl*. 2003;26:70-5.
44. Raicu F, Popa L, Apostol P, Cimponeriu D, Dan L, Ilinca E, et al. Screening for microdeletions in human Y chromosome--AZF candidate genes and male infertility. *J Cell Mol Med*. 2003;7:43-8.
45. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet*. 2003;40:18-24.
46. Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod*. 1999;14:1710-6.
47. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003;423:825-37.
48. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet*. 2002;71:906-22.
49. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet*. 2001;29:279-86.

50. Umeno M, Shinka T, Sato Y, Yang XJ, Baba Y, Iwamoto T, Nakahori Y. A rapid and simple system of detecting deletions on the Y chromosome related with male infertility using multiplex PCR. *J Med Invest.* 2006;53:147-52.
51. Soydan H, Avcı A, Özgök Y, Orkunuoğlu F, Bedir S, İmirzalıoğlu N. Ciddi oligozoospermik ve azoospermik infertil erkeklerde Y kromozomu mikrolelesyon analiz sonuçları. *Türk Üroloji Dergisi.* 2003;29:414-423.
52. Mc Elreavey K, Krausz C. Male infertility and Y chromosome. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 928-933.
53. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, et al. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2001;7:987-94.
54. Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod.* 2002;17:2813-24
55. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod.* 1998;13:3332-7.
56. 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.* 1999;14:1717-21.
57. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod.* 2002;17:17-24.

58. Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E. Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. Initiative for international quality control. *Hum Reprod.* 1998;13:1764-8.
59. Ryu HM, Lin WW, Lamb DJ, Chuang W, Lipshultz LI, Bischoff FZ. Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology: implication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2001;76:879-83.
60. Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril.* 2003;79:212-5.
61. Quilter CR, Svennevik EC, Serhal P, Ralph D, Bahadur G, Stanhope R, et al. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening of a random group of infertile males. *Fertil Steril.* 2003;79:301-7.
62. Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility--a review. *Placenta.* 2003;24 Suppl B:S62-5.
63. Visootsak J, Graham JM. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:42
64. Bojesen A, Gravholt CH. Klinefelter syndrome in clinical practice. *Nat Clin Pract Urol.* 2007;4:192-204.
65. Conte RA, Kleyman SM, Klein V, Bialer MG, Verma RS. Characterization of a de novo t(Y;9) (q11.2;q22) by FISH technique. *Ann Genet.* 1996;39:10-5.

66. Lissitsina J, Mikelsaar R, Punab M. Cytogenetic analyses in infertile men. Arch Androl. 2006;52:91-5.
67. Akkari Y, Lawce H, Kelson S, Smith C, Davis C, Boyd L, et al. Y chromosome heterochromatin of differing lengths in two cell populations of the same individual. Prenat Diagn. 2005;25:304-6.
68. Penna Videau S, Araujo H, Ballesta F, Ballescà JL, Vanrell JA. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. Arch Androl. 2001;46:205-10.
69. Wiland E, Wojda A, Kamieniczna M, Szczygieł M, Kurpisz M. Infertility status of male individuals with abnormal spermiogram evaluated by cytogenetic analysis and in vitro sperm penetration assay. Med Sci Monit. 2002;8:394-400.
70. Luetjens CM, Gromoll J, Engelhardt M, Von Eckardstein S, Bergmann M, Nieschlag E, Simoni M. Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. Hum Reprod. 2002;17:2258-66.
71. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Müller CR, Vogt PH. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. Int J Androl. 1999;22:292-9.
72. Özdamar K. SPSS ile Biyoistatistik. Kaan Kitabevi. 2000; 5. baskı, Eskişehir.
73. Vicdan A, Vicdan K, Günalp S, Kence A, Akarsu C, Işık AZ, Sözen E. Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;117:49-54.

74. Pernice F, Mazza G, Puglisi D, Luppino MG, Frisina N. Nonrobertsonian translocation t(6;11) is associated with infertility in an oligozoospermic male. *Fertil Steril*. 2002; 78:192-194.
75. Samli H, Samli MM, Solak M, Imirzalioglu N. Genetic anomalies detected in patients with non-obstructive azoospermia and oligozoospermia. *Arch Androl*. 2006;52:263-7.
76. Choi JM, Chung P, Veeck L, Mielnik A, Palermo GD, Schlegel PN. AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2004;81:337-41.
77. Chandley AC, Cooke HJ. Human male fertility-Y-linked genes and spermatogenesis. *Hum Mol Genet*. 1994;3:1449-52.
78. Medica I, Gligorievska N, Prenc M, Peterlin B. Y microdeletions in the Istria county, Croatia. *Asian J Androl*. 2005;7:213-6.
79. Oliva R, Margarit E, Ballesca JL, Carrio A, Sanchez A, Mila M, et al. Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 70:506-510.
80. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The comparison of mitochondrial DNA and nuclear DNA in testicular sperm in obstructive azoospermic and fertile men. *Hum Rep*. 2002; 17: 1571-1577.
81. De Palma A, Burrello N, Barone N, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. Patients with abnormal sperm parameters have an increased sex chromosome aneuploidy rate in peripheral leukocytes. *Hum Reprod*. 2005;20:2153-6.

82. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev.* 1999;53:27-41.
83. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, Roberts KP. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med.* 1997;336:534-9.
84. Cooke HJ. Y chromosome and male infertility. *Rev Reprod.* 1999;4:5-10.
85. Wang LQ, Huang HF, Jin F, Qian YL, Cheng Q. High frequency of Y chromosome microdeletions in idiopathic azoospermic men with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril.* 2005;83:1050-2.
86. Kunej T, Zorn B, Peterlin B. Y chromosome microdeletions in infertile men with cryptorchidism. *Fertil Steril.* 2003 ;79:1559-65.
- 87- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5:933-43.
88. Martínez MC, Bernabé MJ, Gómez E, Ballesteros A, Landeras J, Glover G, et al. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J Androl.* 2000;21:651-5.
89. Krausz C, McElreavey K. Y chromosome microdeletions in 'fertile' males. *Hum Reprod.* 2001;16:1306-7.
90. Kostiner DR, Turek PJ, Reijo RA. Male infertility: analysis of the markers and genes on the human Y chromosome. *Hum Reprod.* 1998;13:3032-8.

91. Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod.* 2000;15:1431-4.
92. Calogero AE, Garofalo MR, Barone N, De Palma A, Vicari E, Romeo R, et al. Spontaneous regression over time of the germinal epithelium in a Y chromosome-microdeleted patient: Case report. *Hum Reprod.* 2001;16:1845-8.
93. Frydelund-Larsen L, Krausz C, Leffers H, Andersson AM, Carlsen E, Bangsboell S, et al. Inhibin B: a marker for the functional state of the seminiferous epithelium in patients with azoospermia factor C microdeletions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5618-24.
94. Foresta C, Bettella A, Moro E, Rossato M, Merico M, Garolla A, Ferlin A. Inhibin B plasma concentrations in infertile patients with DAZ gene deletions treated with FSH. *Eur J Endocrinol.* 2002;146:801-6.
95. Van Golde RJ, Wetzels AM, de Graaf R, Tuerlings JH, Braat DD, Kremer JA. Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome. *Hum Reprod.* 2001;16:289-92.

8. ÖZGEÇMİŞ

Yalova, 1969 doğumluyum. İlköğretimimi İstanbul, ortaokul ve lise eğitimimi Elazığ Anadolu Lisesi'nde aldım. 1989-1990 eğitim yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitimime başladım. 1995'de mezun oldum. Aynı yıl Elazığ SSK Hastanesi'nde göreve başladım. 2002 Eylül TUS sınavında Tıbbi Genetik uzmanlığını kazandım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. İngilizce bilmekteyim. Evli ve iki çocuk annesiyim.