

MUSTAFA EKİN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DIYARBAKIR-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**NON-OBSTRUKTİF AZOSPERMİLİ İNFERTİL ERKEKLERDE
AZFC VE TTY2 GEN AİLELERİNİN MİKRODELESYONU**

Mustafa EKİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç.Dr. Mahmut BALKAN

DİYARBAKIR- 2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**NONOBSTRUKTİF AZOSPERMİLİ İNFERTİL ERKEKLERDE
AZFC VE TTY2 GEN AİLELERİNİN MİKRODELESYONU**

Mustafa EKİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç.Dr. Mahmut BALKAN

DİYARBAKIR- 2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mustafa EKİN'nin hazırladığı "Non-Obstruktif Azospermili İnfertil Erkeklerde AZFc ve TTY2 Gen Ailelerinin Mikrodelesyonu" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 24/05/2019

Danışman Doç.Dr.Mahmut BALKAN

Jüri Üyeleri

Jüri Başkanı Prof.Dr.Fatma SILAN
Üye Doç.Dr.Mahmut BALKAN
Üye Dr.Doç.Selahattin TEKEŞ
Üye
Üye

İmza

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04.07.2019 tarih ve12/21..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

04.07.2019

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü





TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

21/05/2019

Mustafa Ekin

İmza

TEŞEKKÜR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimim süresince devamlı yardım ve ilgisini esirgemeyen, büyük bir özveride bulunarak Yüksek Lisans yöneticiliğimi üstlenen, tezimin hazırlanmasında gerekli ilgi, tenkit ve tavsiyelerle bana yol gösteren hocam Sayın Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mahmut BALKAN'a ,

Yüksek Lisans öğrenimim süresince büyük yardım ve desteklerini gördüğüm ve bilimsel katkılarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. M. Selahattin TEKEŞ, Yrd. Doç. Dr. Diclehan ORAL, Arş Gör. İlyas YÜCEL ve Arş Gör. Mahir BİNİCİ'ye, çalışmalarım da aplikasyon desteği sunan sevgili arkadaşım Kadir Sinan ASLAN'a, çalışmalarım da istatistik desteği sunan sevgili arkadaşım Hatice ORTAÇ'a, tez çalışmalarım sırasında büyük desteklerini esirgemeyen bütün çalışma arkadaşlarıma, maddi ve manevi her konuda daima beni motive eden ve destek olan, hayatım boyunca örnek aldığım ve almaya çalışacağım sevgili babama ve bu süreçte bana destek olan arkadaşlarım ve ailemin diğer fertlerine çok teşekkür ederim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.18.009 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Diyarbakır-2019

Mustafa EKİN

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	I
BEYAN.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
1. ÖZET.....	1
1.1. Türkçe Özet.....	1
1.2. İngilizce Özet (Abstract).....	3
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
3. GENEL BİLGİLER.....	10
3.1. Erkek Üreme Sistemi.....	10
3.1.1. Erkek iç üreme organları.....	10
3.1.1.1. Testisler (Orchis, Er bezleri).....	10
3.1.1.2. Epididymis (Epididim).....	11
3.1.1.3. Ductus deferens (Vas deferens sperma kanalı).....	11
3.1.1.4. Vesicula seminalis (Meni keseciği).....	11
3.1.1.5. Ductus ejaculatorius (Ejakulator kanal).....	11
3.1.1.6. Prostatae (Prostat).....	11
3.1.2. Erkek dış üreme organları.....	12
3.1.2.1. Penis.....	12
3.1.2.2. Scrotum (Testis torbası).....	12
3.2. Erkek İnfertilitenin Nedenleri.....	12
3.2.1. Hormonal nedenler.....	12
3.2.2. Hipotalamus bozuklukları.....	14
3.2.3. Kallman sendromu.....	14
3.3. Kromozomal bozukluklar.....	15
3.3.1. Klinefelter sendromu (47,XXY).....	15
3.3.2. 47,XYY erkekler.....	15
3.3.3. Y kromozom mikrodelsyonu.....	16
3.3.4. TTY2 gen ailesi mikrodelsyonları.....	18
4. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	20
4.1. Araştırma Popülasyonu.....	20
4.2. Kromozom Analiz İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	20
4.3. Kromozom Analizi için Kullanılan Solüsyonlar.....	21
4.4. Kromozom Analizi İçin Kullanılan Diğer Araç ve Gereçler.....	22

4.5. Kromozomların Elde Edilmesi.....	22
4.6. Giemsa Bantlama.....	23
4.7. Sitogenetik Değerlendirme.....	23
4.8.Kandan DNA izolasyonu.....	24
4.8.1.Prosedürün alıřma prensibi	24
4.8.2. DNA kantitasyonu.....	24
4.8.3.Gerçek zamanlı kantitatif PCR(Real time polimeraz zincir reaksiyonu)...	25
4.8.4.Real time PCR sonuçlarının değerlendirmesi.....	26
4.8.5. Sonuç ve yorumlama.....	27
4.9. İstatistiksel analiz.....	27
5.BULGULAR.....	28
5.1. Hormonal (testosteron, FSH, LH, prolaktin) Durum.....	28
5.2 .Sitogenetik Sonuç.....	29
5.3. Moleküler Genetik (PCR) Analiz Sonuçları.....	31
5.3.1 AZF gen analizi.....	32
5.3.1.1. sY254 mutasyon analizi.....	32
5.3.1.2.sY255 mutasyon analizi.....	32
5.3.2.TTY2 gen ailesi analizi.....	33
5.3.2.1 TTY2L2A gen ailesi analizi.....	33
5.3.2.2. TTY2L12A gen ailesi analizi.....	34
6. TARTIşMA.....	35
6.1. Kromozom Anomali Oranlar.....	36
6.2. Erkek İnfertilite İle Hormonal Durum Arasındaki İlişki.....	37
6.3.AZFc (sY254 vesY255) ve TTY2 Gen Ailesi (TTY2L2A ve TTY2L12A) Mikrodelesyonları.....	38
7. SONUÇLAR.....	41
8. KAYNAKÇA.....	42
9. ÖZGEçMİş.....	52
10. ETİK KURUL.....	54
10.1. Orijinal Raporu.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkek üreme sistemi.....	10
Şekil 2. Erkeklerin Hipotalamik-Hipofiz-Gonadal (HPG) eksenini ve üreme geri bildirim döngülerinin basitleştirilmiş gösterimi.....	14
Şekil 3. Klinefelter sendromu karyotipi.....	15
Şekil 4. Y kromozomu AZFc bölgesi haritası.....	17
Şekil 5. Y kromozomunun şematik gösterimi.....	18
Şekil 6. Primerlerin bağlanma eğrileri.....	26
Şekil 7. Primerlerin erime eğrileri.....	27
Şekil 8. İnfertil vakalarda yaş guruplarına göre hormonal (testosteron, FSH, LH, prolaktin) durum.....	29
Şekil 9. Kontrol ve NOA'lı vakaların genomik DNA'sında sY254 genindeki mikrodelsyonların frekansı.....	32
Şekil 10. Kontrol ve NOA'lı vakaların genomik DNA'sında sY255 genindeki mikrodelsyonların frekansı.....	33
Şekil 11. Normal ve NOA'lı vakaların genomik DNA'sında TTY2L2A genindeki mikrodelsyonların frekansı.....	33
Şekil 12. Normal ve NOA'lı vakaların genomik DNA'sında TTY2L12A genindeki mikrodelsyonların frekansı.....	34

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Sperm üretimi için ihtiyaç duyulan hormonlar ve etkileri.....	13
Tablo 2. Gerçek Zamanlı PCR içeriği.....	25
Tablo 3. Primer dizileri.....	25
Tablo 4. Gerçek Zamanlı PCR Döngü Koşulları.....	26
Tablo 5. İnfertil erkeklerdeki karyotip sonuçları.....	30
Tablo 6. Klinefelterli olgulara ait serum hormon düzeyleri.....	31
Tablo 7. NOA'lı olgulara ait, Karyotip, Sy254, Sy255, TTY2L2A ve TTY2L12A Mutasyonu verileri.....	35



SİMGELER VE KISALTMALAR

TTY2	: Testis Traskript Y 2
NOA	: Non-obstruktif Azospermi
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
AZF	: Azoospermia Factor Bölgesi (Y kromozomu üzerinde)
SRY	: Sex Region of Y
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
LH	: Lüteinizan Hormon
CFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör
CBAVD	: Konjenital Bilateral Vas Deferens Yokluğu
ICSI	: İntra-sitoplazmik spermatozoa enjeksiyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
TESE	: Testikular Sperm Extraction
IHH	: İdiopatik Hipogonadotropik Hipogonadizm
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DAZ	: Deleted In Azospermia
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
SRY	: Sex Determining Region
CF	: Kistik Fibrozis
BPY2	: Testis-specific basic protein Y 2
CDY	: Testis-specific chromodomain protein Y
RBM	: RNA bağlayıcı bölge
STS	: Sequence tagged sites
AZFa	: Azospermi faktör-a
AZFb	: Azospermi faktör-b
AZFc	: Azospermi faktör-c
AZFd	: Azospermi faktör-d
USP9Y	: Ubiquitin'e özgü proteaz 9 Y kromozomu
µl	: Mikrolitre
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon

Nonobstruktif Azospermili İnfertil Erkeklerde AZFc ve TTY2 Gen Ailelerinin Mikrodelesyonu

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Mustafa EKİN

Danışmanı: Doç.Dr. Mahmut BALKAN

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

1.1. ÖZET

Amaç: Bu çalışma en az bir yıl evli olmalarına rağmen çocuk sahibi olamamış primer infertilite ön tanılı non-obstruktif azospermili (NOA) erkek bireylerde AZFc (sY254, sY255) ve TTY2 gen ailesi (TTY2L2A ve TTY2L12A), mikrodelesyonlarının oranlarını saptamak ve karşılaştırmak için yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Laboratuvarımıza başvuran 100 infertil ve 100 fertil kontrol erkeğe öncelikle sitogenetik analiz yöntemi uygulanmış ve kromozomal anomali yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca olgulara Real Time PCR tekniği uygulanarak AZFc ve TTY2 gen ailesi mikrodelesyonlarını taşıyıp taşımadıkları araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmada hasta ve normal fertil kontrolde AZFc mikrodelesyonunun sıklığı, TTY2 gen ailesi, yani TTY2L2A ve TTY2L12A ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışma serisini oluşturan 100 olgudan 71 olgunun (%71) normal karyotipe (46,XY), 16 olgunun Klinefelter ve 13 olgunun da (%13) yapısal kromozomal anomalili karyotipe sahip olduğu görüldü.

Bu çalışmada, AZFc bölgelerinden Sy254'de hem fertil kontrol hem de NOA'lı infertil vakalarda mutasyon tespit edilmemiştir. Sy255 mikrodelesyonu fertil kontrollerde görülmezken, NAO olguların 1'inde (% 1) görülmüştür. TTY2L2A mikrodelesyonu fertil kontrollerde görülmemiştir, fakat NOA'lı olguların 1'inde (% 1) mikrodelesyon tespit edilmiştir ($p>0,05$). Ayrıca 100 NOA hastasının 11'inde (% 11) TTY2L12A mikrodelesyonu olduğu görülmüş ve normal kontrolde 5 vakada (%5) TTY2L12A mikrodelesyonu saptanmıştır ($p>0,05$).

Sonuç: Çalışmamızdaki infertil azospermili hastalarda AZFc mutasyonlarına oranla daha yüksek oranlarda görülen TTY2 gen ailesinde delesyonların, TTY2L2A ve TTY2L12A genlerinin de erkek infertilitesi için yeni bir markır olarak kullanılabileceğini, rutin olarak taranan AZF genleri kadar önemli olabileceği sonucunu doğurmaktadır.

Anahtar Kelimeler: obstrüktif olmayan azospermi; Y kromozomu mikrodelesyonu; AZFc; TTY2 genleri



The Microdeletions of AZFc and TTY2 Gene Families in Infertile Men With Non-Obstructive Azoospermia

Student's Surname and Name: EKİN Mustafa

Adviser of Thesis: Assoc.Prof. Mahmut BALKAN

Department: Medical Biology and Genetics

1.2. ABSTRACT

Aim: This study was carried out to determine and compare the ratio of AZFc (sY254, sY255) and TTY2 gene family (TTY2L2A and TTY2L12A) microdeletions in male patients with non-obstructive azoospermia (NOA) who had been married for at least one year.

Material and Method: In this study, 100 infertile and 100 fertile control men who applied to our laboratory were firstly subjected to cytogenetic analysis method and evaluated for chromosomal anomaly. In addition, the patients were evaluated by using Real Time PCR technique in order to determine whether they carry AZFc and TTY2 gene family microdeletions. In addition, the frequency of AZFc microdeletion in patients and normal fertile controls was compared with TTY2 gene family, namely TTY2A2A and TTY2A12A.

Results: Of the 100 cases that included the study series, 71 cases (71%) had normal karyotera (46, XY) and 16 Klinefelter (16%) and 13 cases (13%) had a karyotype with structural chromosomal anomaly.

In this study, no mutation was detected in both fertile control and NOA infertile cases in Sy254 from AZFc regions. Sy255 microdeletion was not seen in fertile controls, while NAO was observed in 1 (1%) cases ($p>0,05$). TTY2L2A microdeletion was not observed in fertile controls, but 1 (1%) of NOA cases had microdeletion. In addition, TTY2L12A microdeletion was observed in 11 (11%) of 100 NOA patients and TTY2L12A microdeletion was detected in 5 cases (5%) under normal control ($p>0,05$).

Conclusion: In our study, it is concluded that in TTY2 gene family, TTY2L2A and TTY2L12A genes can be used as a new marker for male infertility in routine infertile azoospermia patients compared to AZFc mutations.

Keywords: non-obstructive azoospermia; Y-chromosome microdeletion; AZFc; TTY2 genes



2. GİRİŞ VE AMAÇ

Üremek ve neslini devam ettirmek insanların doğasında mevcut olan bir olaydır. Bazen çiftler bilinen ya da bilinmeyen bir nedenle çocuk sahibi olamayabilirler. Çocuk sahibi olamama sorunu çiftlerden birini veya her ikisini de birden etkileyebilmektedir (1).

İnfertilite, Dünya Sağlık Ürgütü (WHO) tarafından çiftlerin herhangi bir korunma yöntemi kullanmaksızın en az bir yıl içerisinde düzenli cinsel ilişkisine rağmen çocuk sahibi olunamamasıdır (2). İnfertilite tüm toplumlarda değişkenlik göstermektedir. Bugün dünya genelinde çiftlerin yaklaşık yüzde %10-15'i infertilite sorunu yaşamaktadır ve bunların da % 30-40'nda erkekte problem yaşanırken, %30-40 oranında her ikisinden kaynaklanırken geriye kalan %20'lik kısmı ise nedeni bilinmeyen idiyopatik infertilitedir (3). İnfertilite vakalarının % 15'inde bu durum hem kromozomal hem de tek gen değişiklikleri dahil olmak üzere genetik bozukluklarla ilişkilidir (4). Her 6-7 çiftten birinde görülmektedir (5).

Erkek infertilitesinin en önemli nedeni idiyopatik semen bozukluklarıdır. Azospermi, oligozoospermi ve deforme olmuş spermelerin tümü, hormonal dengesizliği de etkileyen kalıtsal faktörlerle ilişkili durumlardır (6). Azospermi, WHO tarafından, art arda yapılan en az iki meni incelemesinde sperm gözlenememesi olarak tanımlanmıştır. İnfertilite nedeniyle takipli erkeklerde yapılan çalışmalarda %10-20 oranında azosperminin infertiliteden sorumlu olarak bulunmuştur (7). Genel popülasyonda ise bu oran yaklaşık % 1'dir. Detaylı anamnez, fizik muayene, hormon profillemesi ve genetik konsültasyon azosperminin klinik sınıflandırması açısından son derece önemlidir (6,8). Obstruktif azospermi, testiste üretilen sperm hücrelerinin üreme kanalının herhangi bir alanında tıkanıklık olması nedeniyle ejakülat olamamasıdır. Non-obstruktif azospermi ise testis kaynaklı sorunlar nedeniyle sperm üretiminde yaşanan sorunlar olarak tarif edilebilir. Birbirinden farklı tedavi yöntemleri olması nedeniyle hastada gözlenen azospermi nedeninin, obstruktif kaynaklı olup olmadığı araştırılmalıdır (3). Kromozomal bozukluklar sağlıklı toplumlarda %0.5 oranında gözlemlenirken, infertil erkek

bireylerdeki oran ise %5.8'e çıkmaktadır, bu nedenle semen analizinde azospermi gözlenen tüm bireylerin genetik açıdan araştırılması önerilmektedir (4).

Erkeklerde seks kromozomları ve otozomlar, spermatogenezi düzenleyen genleri barındırırlar (9). Bu genlerdeki yeniden düzenlemeler ya da sekans değişiklikleri sperm üretimine zarar vermekte ve sperm sayısının azalmasına neden olmaktadır. Günümüzde erkeklerde infertiliteye sebep olan genetik patolojiler olarak; kromozomal anomalileri, izole spermatogenez defekti yapabilen Y-kromozom mikrodelsiyonları (AZF), doğumsal duktus agenezisi yapan kistik fibroz gen mutasyonları ve sperm fonksiyonlarını bozan genetik hastalıkları sayabiliriz (10). İdiyopatik nonobstruktive azoo-oligospermia vakalarının yaklaşık %10'u Y kromozomunun uzun kolu üzerindeki AZF bölgesinin delesyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca spermatik kord agenezisi azospermik erkeklerin %1,4'ünde görülürken , kistik fibröziz gen mutasyonlardaki hastalarında %85'tir. Genlerdeki mutasyonlar ile çeşitli multifaktoriyal düzensizlikler arasındaki ilişkilerle ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bu klinisyenler için çok güçlü bir tanısal araç olabilir. Hastaların geniş kapsamlı fizyolojik ve genetik incelemeleri çok daha anlamlı genotip/fenotip kurmamıza yardımcı olur (11).

Çiftlerde doğal yoldan gebelik oluşmaması durumunda intrasitoplazmik sperm injeksiyon (İCSİ) veya İn vitro fertilizasyon (IVF) yöntemi ile sperm faktörüne bağlı olarak önemli doğum oranları gerçekleştirilmiştir (12).

Erkek fertilitelerini etkileyen faktörler sadece cinsiyet kromozomlarında ve otozomal kromozomlarda oluşan kromozomal patolojileri, AZF mikrodelsiyonları ya da duktus agenezisi yapan kistik fibroz gen mutasyonlar ile sınırlı değildir. Moleküler genetik temelinde erkek infertilitenin hakkında daha bilmediğimiz çok şey vardır. İnsanlardaki genetik rahatsızlıklar olan sperm fonksiyonunda deforme, sperm taşınmasında ya da spermatogeneziste deformeler infertiliteye yol açabilir. Erkek infertilitesinin genetik nedenlerinin ortaya konulması tedavi yaklaşımları ve onların doğacak çocuklarına taşınma risklerini ortaya koymayı sağlayacaktır (13).

Y kromozomundan mikrodelsiyonları NOA'lı erkeklerin %6-12'sinde saptanmıştır (5). 1976 yılında yapılan karyotip çalışmasında Tiepolo ve Zufardi sperm üretiminde Y kromozomun rolü olduğunu saptamışlardır (6). Tespit edilen bölge "Azospermi Faktör" (AZF) bölgesidir. Spermatogenez için gerekli olan genler

bu bölgede taşınmaktadır. Fertilite için gerekli olan ve Y kromozomunun uzun kolunda bulunan AZF bölgelerinin bir kısmı idiyopatik infertilite gösteren erkeklerin % 10-20'sinde bulunmaktadır. AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd bölgeleri olarak adlandırılan bu kısımlar sitogenetik olarak teşhis edilebilmektedir. Y kromozomunun uzun kolunun 11.23 bölgesinde AZF bölgesi bulunmaktadır (7,8-13,13-16).

Erkek infertilitesi aynı zamanda hormonal nedenler, yaşa bağlı, enfeksiyonlar, onezite, psikolojik nedenler, geçirilmiş cerrahi operasyonlar da infertiliteye neden olabilirler (17).

Spermatogenezden sorumlu Y kromozomu üzerinde 4 adet bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler; AZFa, AZFb, AZFc (DAZ) ve AZFd bölgeleridir. Spermatogenezi sağlayan bu bölgelerde çok sayıda gen yer almaktadır (18).

Y kromozomunun heterokromatin bölgesine yakın yerde yer alan AZFc bölgesi 3 Mb'lık bir alanda dağılım gösterir. AZFc bölgesi üzerinde en çok çalışılan ve çok fazla delesyona uğrayan bölgelerden birisidir. Bu bölge direkt tekrarlayan dizilimlere (amplikon) ve dizilim benzerliği gösteren ters dönmüş tekrarlayan dizilimleri (palindromik dizilimlere) oluşturan geniş alanlardan meydana gelmiştir. AZFc içerisinde tamamı testise özel 19 transkripsiyon ünitesi bulunan 7 farklı gen ailesi bulunmaktadır. AZFc bölgesi; DAZ gen ailesi ile birlikte CDY, BPY2, RBM, TTY2 ve PRY'nin kopyalarını da içermektedir. Tirozin fosfatazın kodlanması işlevini gerçekleştiren aynı gen ailesine sahip PRY, TTY2 genleri DAZ gen ailesindedir (18-21).

AZFa, AZFb ve AZFc bölgeleri için Moleküler Genetik kalite kontrol ağı 6 adet STS'nin (Sequence-Tagged Site) yeterli olduğu bildirilmiştir. Bu hedef bölgeler: AZFa bölgesi için sY84 ve sY86, AZFb bölgesi için sY127 ve sY134, AZFc ve AZFd bölgesi (DAZ) için ise sY254 ve sY255 bölgeleridir. Azospermiden sorumlu olarak en fazla delesyona maruz kalan ve üzerinde en sık çalışılan bölge AZFc (SY254 ve SY255) bölgesi olarak bildirilmiştir (22-26).

Son zamanlarda, Y kromozomunun diğer mikrodelsyonlarının da, örneğin TTY2 gen ailesi, azospermiden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. TTY2 gen ailesi, Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11) bulunan TTY2L12A ve uzun kolunda (Yq11) bulunan TTY2L2A genlerini içeren, bilinmeyen bir fonksiyonu olan bir Y bağlantılı çoklu kopya gen ailesidir. Y kromozomu üzerinde bulunduğu ve testiste

ifade edilen genlerden olduğu için muhtemelen spermatogenezde de rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada; erkek infertilite tanısı için yeni moleküler-genetik marker olarak kullanılabilir erkek infertilitesi genlerindeki mutasyonların etkisi tartışılacaktır. Bu amaçla; idyopatik azospermiye sahip infertil erkeklerde ve kontrol grubunda testis dokusunda eksprese olan ve dolayısıyla spermatogenezde rol oynayan TTY2 gen ailesi, yani TTY2L2A ve TTY2L12A genlerindeki mikrodelsiyon sıklığı, AZFc mikrodelsiyonunun sıklığı ile karşılaştırılacaktır.

Mutasyon sıklığı coğrafik bölgeler ve etnik gruplar arasında da önemli farklılıklar gösterir. Erkek infertil gruplarının üzerine yapılan mutasyon sıklığı çalışmaları, çalışılan popülasyonda bulunan mutasyonlar hakkında yeterli verilerin olmasıyla daha sağlıklı sonuçlara ulaşabileceğimizi düşünmekteyiz. Bundan dolayı yaptığımız çalışmamızın, TTY2L2A ve TTY2L12A gen mutasyonlarının Diyarbakır ve çevre illerdeki dağılım frekansının belirlenmesi yönündeki çalışmalara başlangıç teşkil etmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla TTY2L2A ve TTY2L12A'de görülen mutasyonların coğrafyamızdaki allelik frekansları ile bu allelerin homozigot ve heterozigot dağılımlarının saptanarak bu mutasyonların frekanslarının tespit edileceği amaçlanmıştır.

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesine gelen ve en az bir yıl evli olmalarına rağmen çocuk sahibi olamamış birinci dereceden infertilite ön tanımlı erkek bireylerde genetik nedenleri belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma için infertil erkeklerden uygun laboratuvar koşulları altında kan numunesi alınmıştır. İnfertil olduğu düşünülen erkek bireylerden alınan kan numune örneklerinden total testosteron, FSH, LH ve prolaktin gibi hormonların yanısıra kromozom analizi, Y kromozomu mikrodelsiyon testi gibi moleküler analizler de yapılmıştır.

Laboratuvarımıza gelen 100 infertil erkeğe hem sitogenetik analiz yöntemi uygulanarak kromozom analizi değerlendirildi hemde Rotor Gene Q 5 Flex hrm Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenen Yq kromozom mikrodelsiyonu ile TTY2L2A ve TTY2L12A, sY254 ve sY255 gen bölgelerinde inceleme yapılmıştır. SRY (Sex determining region of the Y chromosome) kontrol primerleri olarak kullanılmıştır.

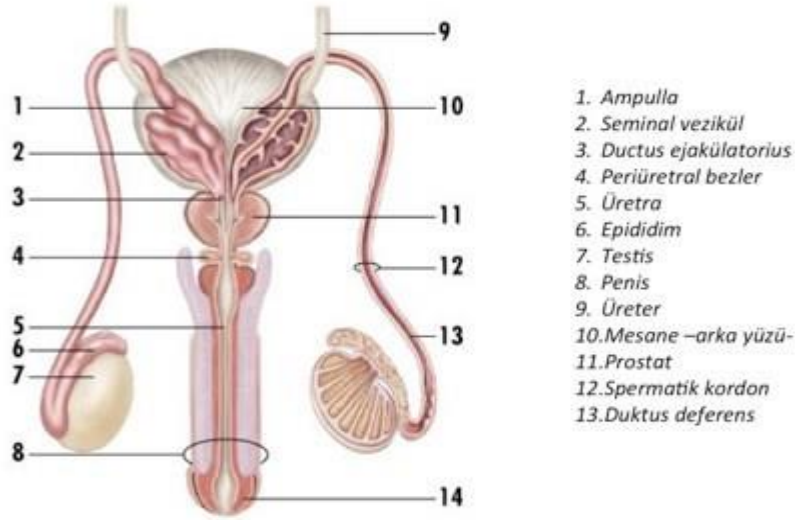
Bu analizin değerlendirmesi sonucunda Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma hastanesine gelen infertil erkeklerde, infertilitenin genetik nedenleri, infertil oranlarını ve infertil sıklığı ortaya koyup ICSI (İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu), IVF (İnvitro fertilization) ve TESE (Testikular sperm extraction) gibi yardımcı yöntemlerine başvurarak hastalara yardımcı olabilmektedir.



3. GENEL BİLGİLER

3.1. Erkek Üreme Sistemi

Üreme organları, insan neslinin soyunun devamını sağlayan, üreme fonksiyonlarını gerçekleştiren organlardır. Üreme sistemi, üreme ile ilgili cinsiyet özelliklerini belirleyen, üreme işlevlerini yerine getiren ve hormonlar salgılayan organların oluşturduğu sistemin genel adıdır. Üreme organları iç ve dış olarak iki gruba ayrılmaktadır (27).



Şekil 1. Erkek üreme sistemi

3.1.1. Erkek iç üreme organları

3.1.1.1. Testisler (Orchis, Er bezleri)

Erkek bireylerde scrotum içinde yer alan, temel üreme organlarından biri testislerdir (Şekil 1). Testisler erkek germ hücrelerini (sperm) üretirler. Ayrıca testisler erkeklik hormonunu (testosteron) da salgırlar ve işlevlerini de scrotom içinde gerçekleştirirler (27-38).

3.1.1.2. Epididymis (Epididim)

Epididim, testisin arka kısmında bulunur ve yaklaşık olarak 6-7 cm uzunluğunda bir kanal yumağıdır (Şekil 1). Epididim, spermi hem iletme hem de olgunlaştırma ve depolama yeri olarak da görev yapar (27-38).

3.1.1.3. Ductus deferens (Vas deferens, Sperma kanalı)

Ductus Deferens, testislerin içinde üretilen sperm hücrelerini epididimis kanalına taşıyan ve aynı zamanda sperm depolayabilen kas yapısında sağ ve sol iki kanal olarak isimlendirilmektedir (27-38).

3.1.1.4. Vesicula seminalis (Meni keseciği)

Vesicula Seminalis, idrar torbası ile rektum arasında olan kese şekline benzeyen bir çift bez olarak tanımlanmaktadır. Vesicula Seminalis, spermin canlılığının korunmasını sağlamaktadır. Ayrıca Vesicula Seminalis spermin hareket etmesini ve salgıladığı sıvı ile sperm hücrelerinin beslenmesini sağlayan bir salgı bezidir (Şekil 1) (27-38).

3.1.1.5. Ductus ejaculatorius (Ejakulator kanal)

Ductus Ejaculatorius, prostat bezi içerisinde yer tutan, ön tarafa ve aşağı yöne hareket ederek prostat parçasının içine yayılmış durumda bulunan bir kanaldır (Şekil 1). Ductus deferens içeriği ile vesicula seminalis salgısını karıştırarak dışarıya doğru atılmasını sağlar (27-38).

3.1.1.6. Prostatae (Prostat)

Prostatae, idrar torbasının altında bulunan, ceviz büyüklüğünde olan ve olabildiğince sıkı ve sert organ olup aynı zamanda erkek üreme organının en büyük bezi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1). Erkek bireylerde ilerleyen yaşlarda değişim

göstermektedir. Asidik olmayan prostat, sıvı salgılayarak spermilerin korumasını sağlamaktadır. Ayrıca prostattan salgılanan sıvının, spermilerin hareketini ve testosteron hormonunun salgılanmasını kontrol etme görevi bulunmaktadır. Erkek bireyler prostat salgısının yaklaşık günde 0.5-2 ml üretebilmektedir. Meni hacminin yaklaşık olarak % 20-30'nu prostat salgısı oluşturmaktadır (27-38).

3.1.2. Erkek dış üreme organları

3.1.2.1 Penis

Penis, boşaltım sisteminin en son kısmını oluşturmakta ve boşaltım görevinin dışında spermilerin dışarıya atılma işlevini de üstlenmektedir (Şekil 1). Penis radix corpus ve glans olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (27-38).

3.1.2.2 Scrotum (Testis torbası)

Scrotum, penis ve simfizis pubisinin altında olan kese olarak adlandırılmaktadır ve büyüklüğü ve şekli yaş ile birlikte değişiklik göstermektedir. Yetişkin erkek bireylerde yumuşak ve hareketli olup, deri ve elastik liflerden yapılmıştır (Şekil 1). Testis, epididim ve spermatik kordonun bir kısmı, kese şeklindeki scrotumun içerisinde yer almaktadır. Scrotumlar sıcak ve soğuğa karşı duyarlılık göstermekte ve içerisinde bulunan elastik lifler sayesinde ısı ayarlamasını da yapabilmektedirler (27-38).

3.2. Erkek İnfertilitenin Nedenleri

3.2.1. Hormonal nedenler

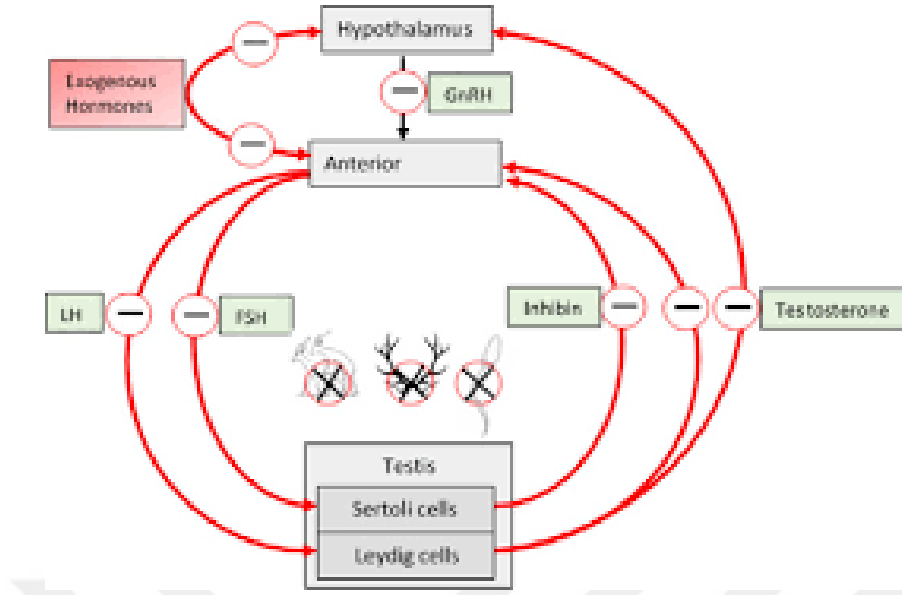
LH ve FSH hormonları hipofiz bezinden salınır (Şekil 2). Testis eksikliği olan erkeklerde hipergonadotrofik hipogonadizm genellikle yüksek düzeyde folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) ve bazen de düşük testosteron seviyelerinde bulunur. Genel olarak, FSH seviyeleri, spermatogonia sayısı ile

ilişkilidir: spermatogonia bulunmadığında veya belirgin şekilde azaldığında, FSH değerleri genellikle yükselir; Spermatogonia sayısı normal ancak spermatocyte veya spermatid seviyesinde olgunlaşma durması mevcutsa, FSH değerleri normal sınırlar içindedir (39-40).

Sperm üretimi için ihtiyaç duyulan erkek seks hormonları tablo 1'de gösterilmiştir.

Hormon	Etkisi
GnRH	FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını sağlar. Beyinde hipotalamustan salgılanır.
FSH	Testisteki sertoli hücrelerini uyararak sperm üretimini sağlar. Hipofiz bezinden salgılanır.
LH	Leydig hücrelerinde testosteron sentezlenmesini ve sperm üretiminin devamlılığını sağlar. Hipofiz bezinden salgılanır.
Prolaktin	LH'nin Leydig hücreleri üzerindeki etkisini artırır. Hipofiz bezinden salgılanır.
Testosteron	Sperm üretiminin devamlılığını sağlar. Testisteki Leydig hücrelerinden salgılanır.
Estradiol	LH sentezini kontrol eder. Karaciğer, kas ve yağ dokusunda testosteronun metabolize edilmesi ile oluşur. %20-25'i Leydig hücrelerinden salgılanır.
İnhibin	FSH salınımını engeller. Sertoli hücrelerinden salgılanır.
Aktivin	FSH salınımını artırır. Leydig hücrelerinden salgılanır

Tablo 1. Sperm üretimi için ihtiyaç duyulan hormonlar ve etkileri



Şekil 2. Erkeklerin Hipotalamik-Hipofiz-Gonadal (HPG) eksenini ve üreme geri bildirim döngülerinin basitleştirilmiş gösterimi (41).

3.2.2. Hipotalamus bozuklukları:

Hipotalamus bozukluklarından dolayı, hipotalamusdan salgılanan GnRH hormonu eksik olduğu durumlarda hipofizden salgılanan FSH ve LH düzeyleri de azalır ve testis fonksiyonları bozulmaktadır. Hipotalamus patolojileri genelde doğumsal anomaliler ile birlikte göstermekte olduğu bildirilmiştir (40).

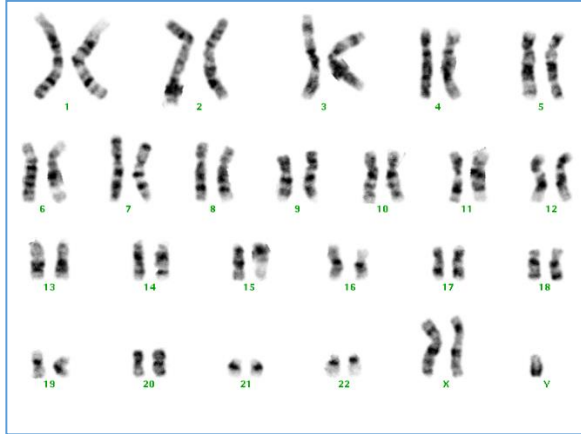
3.2.3. Kallman Sendromu

Kallman sendromu, X'e bağlı kalıtım gösteren erkek infertilitesinde en fazla rastlanılan bir bozukluk olarak bildirilmiştir. Ayrıca idiopatik hipogonadotropik hipogonadizmin nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. X kromozomunun p lokusunda bulunan Kal (Xp22.3) geninde meydana gelen mutasyon hipotalamustan GnRH sekresyonunda bozulmaya neden olmaktadır. Kallman sendromu görülen bireyler uzun boylu ve azospermik olup pubertal gecikme göstermektedirler. Bu sendromlu bireylerde konjenital sağırılık, kraniyum ve yüz asimetrisi, yarı damak, serebellar disfonksiyon, kriptorşidizm ve renal anomalilere de sahip olabildikleri bildirilmiştir (42,43).

3.3. Kromozomal Bozukluklar

3.3.1. Klinefelter sendromu (47, XXY)

Klinefelter sendromu erkek bireylerde 1/1000 oranında tüm sperm hücrelerinde “komplet trizomi” olarak görülen veya “mozaik” formunda gözlenen 47,XXY karyotipli bir sendromu olarak bildirilmiştir (Şekil 3). Klinefelter sendromlu erkek bireylerde görülen mozaik form göstermediği durumlarda 46,XY / 47,XXY kromozom yapısı görülür iken mozaik erkeklerde artan kromozom hatalarına yol açmaktadır. Bu yüzden üreyebilen Klinefelter sendromlu erkeklerin aneuploid yavrulara sahip olma olasılıklarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (44,45). Klinefelter sendromu, X ve Y'nin mayoz I sırasında rekombinasyon yapamaması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (46).



Şekil 3. Klinefelter sendromu karyotipi

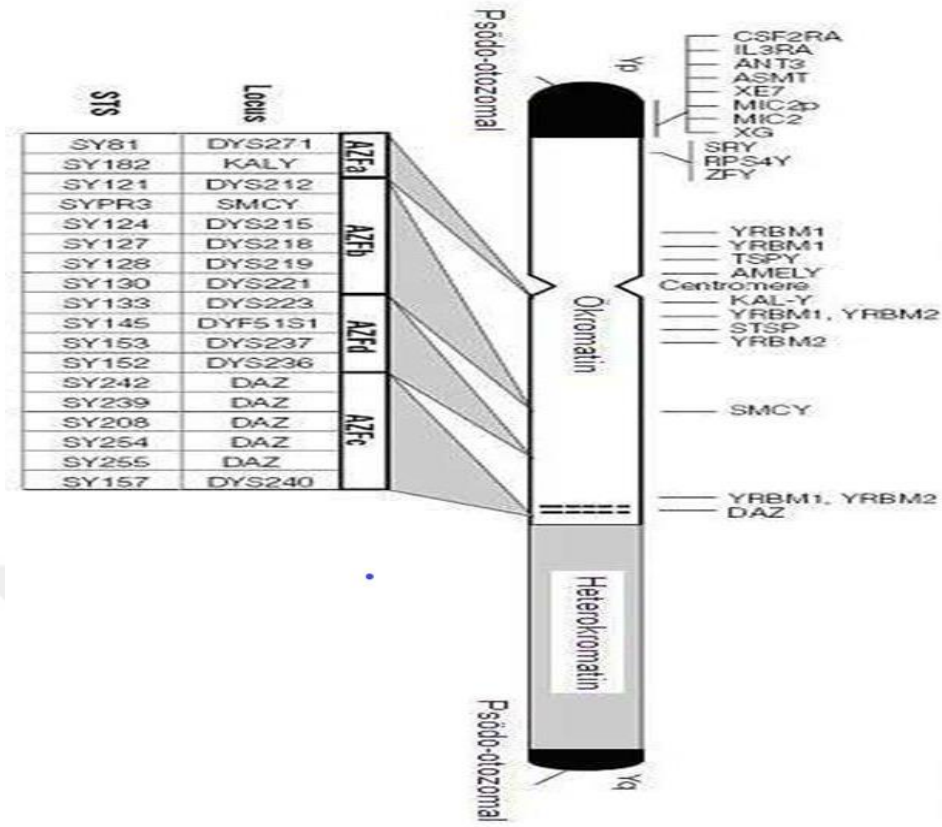
3.3.2. 47, XYY erkekler

47, XYY Anomalisi, 1000 erkek doğumundan birinde bulunan 47,XYY, paternal mayotik II evresinde Y kromozomu ayrışmamasıyla oluşmaktadır. Bu durum, gonadal ortamında anormal bir hormonal dengeye neden olmaktadır (47). Bu erkeklerin büyük bir kısmı fenotipik olarak normal özellik gösterirler. Ancak infertilite, kanser, nörolojik hastalıklar riskinde artma bildirilmiştir (48).

3.3.3. Y kromozom mikrolelesyonu

Erkek infertilitesinin en sık saptanan moleküler genetik nedenlerinden biridir. Y kromozomun uzun kolunda bulunan AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd bölgelerindeki mikrolelesyonlardan kaynaklanmaktadır (Şekil 4). AZF bölgesi içindeki delesyonlar, farklı derecelerde spermatogenik yetmezliğe ve dolayısıyla infertiliteye neden olurlar (49). AZF bölgesindeki mikrolelesyonlar oligospermili erkeklerin yaklaşık % 4'ünde; şiddetli oligospermili erkeklerin % 14'ünde; ve obstrüktif olmayan azospermi erkeklerin de % 18'inde görülür (50).

Mikrolelesyonların büyük çoğunluğu de novo oluşumlu olup germ hücre döngüsü düzenlemesinde ve mayozda kritik rol oynadığına inanılmaktadır (51,52). En yaygın Yq mikrolelesyonları, AZFa bölgesinde meydana gelir ve rapor edilen mikrolelesyonların yaklaşık %60'ını oluşturur (53). Bu vakalardan, bireylerin yaklaşık üçte ikisi azospermiktir; bu vakaların yaklaşık % 50'sinde ICSI'de testiküler sperm ekstraksiyonu ile sperm elde edilebilmektedir (54). AZFc mikrolelesyon vakaları sıklıkla ciddi oligozoospermi ile ortaya çıkar. Sertoli cell-only sendromu ile sıklıkla başvuran vakalarda en sık AZFa bölgesindeki delesyonlar görülmektedir (55). Sertoli cell-only sendromundan hipospermatogeneze kadar değişen vakalarda AZFb mikrolelesyonları bildirilmiştir (56). Bununla birlikte, AZFb vakalarında, en sık görülen gözlem primer spermatosit aşamasında germ hücre durmasıdır (57). Mikrolelesyonlar birden fazla bölgeyi kapsadığında, genotip-fenotip korelasyonları bildirilen geniş çaptaki spermatogenik fenotiplerle şaşırtıcı derecede daha karmaşıktır (58). En sık bildirilen, AZFc bölgesinin yaklaşık yarısının delesyonuna neden olan gr/gr delesyonlardır. Gr/gr mutasyonunun fenotipik etkisi, sperm konsantrasyonu üzerinde çok az veya hiç etkisi olmadığı, ancak infertilite ile bir ilişki olduğunu bildiren bazı çalışmalar bulunmaktadır (59) diğerleri ise gr / gr mutasyonu ile oligo veya azospermi arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir (60).



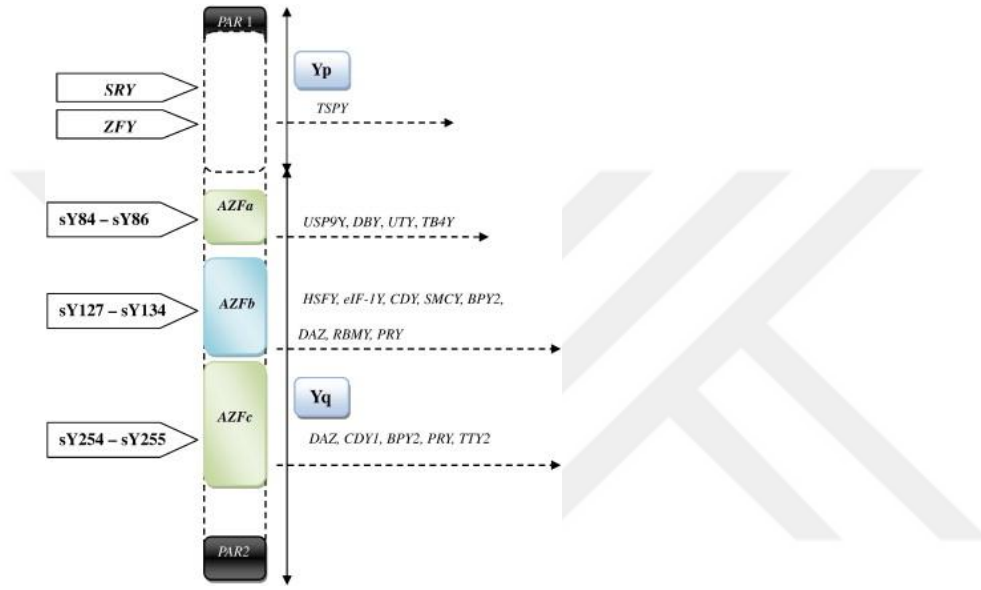
Şekil 4. Y kromozomu AZF bölgesi haritası (61).

USP9Y gibi AZF bölgesindeki gen mutasyonlarının da spermatogenez yetmezlik ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (62). Bununla birlikte, raporlar bu mutasyonların oldukça değişken bir fenotip ile ilişkili olma eğiliminde olduklarını göstermektedir ve bu nedenle şu anda bu mutasyonlara yönelik taramaların klinik ortamda rutin olarak uygulanmaması gerektiği ileri sürülmektedir (63). Çok sayıda kopya sayısı varyantı içeren Y kromozomunun olağandışı genomik peyzajı da dikkate değerdir (64). Son zamanlarda, bu kopya sayısı değişkenlerinin erkek kısırlığı ile ilişkili olabileceği gün ışığına çıkmıştır.

Yq mikrodelsiyonlu bireylerinde ICSI için sperm mevcut olduğunda, çiftlerin Yq mikrodelsiyonu kaçınılmaz olarak tüm erkek yavruların kısırlığına sahip olacağı anlamına gelecek şekilde tüm erkek yavrularına geçirileceği için uygun genetik danışmanlık sağlaması önemlidir (65,66).

3.3.4. TTY2 gen ailesi mikrolelesyonları

AZFc de ilk tanımlanan aday gen DAZ (Deleted in azoospermi)dır, DAZ geniyle birlikte 7 tane aday gen tanımlanmıştır. Bu genler; CDY1 (chromodomain Y1), BPY1, BPY2 (Basic protein Y), PRY (PTA BL related Y), TTY1 ve TTY2 (testis traskript 2) genleri haritalanmıştır (şekil 5) (67).



Şekil 5. Y kromozomunun şematik gösterimi

Son zamanlarda, Y kromozomunun diğer mikrolelesyonlarının, örneğin, TTY2 (testis-specific transcript, Y-linked 2) gen ailesinin, erkek infertilitesine neden olabileceği bildirilmektedir. TTY2 gen ailesi, sırasıyla Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11) ve uzun kolunda (Yq11) bulunan TTY2L12A ve TTY2L2A'yı içeren bilinmeyen fonksiyonlu bir Y bağlantılı multicopy gen ailesidir. TTY2 gen ailesinin tirozin fosfatazın kodlanmasından sorumlu olduğu ve testiste ifade edilen genlerden olduğu için muhtemelen spermatogenezde de rol oynadığı ileri sürülmektedir (68-70).

Aynı zamanda, X veya diğer otozom kromozomları üzerinde de benzer sekansların olmadığı gösterilmiştir. Y kromozomunda bulunan ve testiste eksprese edilen TTY2 gen ailesi gen ailesinin spermatogenezde rol oynamasının muhtemel olduğu bildirilmektedir.

Bilindiđi gibi sperm DNA hasarı, erkek infertilitesi ve anormal spermatogenez ile açıkça ilişkilidir. DNA hasarı, hücresel sistemde genom kararsızlığının başlıca nedenidir. Özellikle DAZ genlerinde Y kromozomunun azospermi faktörü (AZF) bölgesinde genomik instabilite, daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir. Spermatogenezde yer alan genlerde görülen mikrodelsyonların de novo kökenli olduğu ve embriyogenez sırasında genom instabilitesine neden olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında NOA hastalarında TTY2 gen ailesinde ve AZFc bölgesinde mikrodelsyon sıklığını karşılaştırmalı olarak değerlendirmiştir (71-78).



4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Araştırma Populasyonu

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Tanı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışma materyali Haziran 2018- Haziran 2019 tarihleri arasında en az bir yıl evlenmiş olmalarına rağmen çocuk sahibi olamamış non-obstruktif azospermili 100 infertil erkek ve 100 kontrol grubu bireylerden oluşturulmuştur. İlk olarak çalışma kapsamındaki her çiftin aile bilgilerini içeren pedigrileri oluşturuldu. Pedigiri analizinde bireylerin yaş, cinsiyet, akraba evliliği, sigara, alkol ve ilaç kullanımı kriterler ele alınır. Ayrıca çalışma gruplarına dahil edilen olguların ailelerindeki infertilite öyküleri, testis morfolojisi, spermiyogram ve bazal hormonal (FSH, LH, Testosteron, Prolaktin) gibi radyoterapiye maruz kalıp kalmadıkları hakkında bilgi formu dolduruldu.

Gelen infertil çiftlere herhangi bir otozomal veya gonozomal kromozom anomalisi taşıyıp taşımadıklarının anlaşılması için sitogenetik yöntemlerle kromozom analizi yapıldı. Bayanların hepsi 46,XX karyotipi saptandı.

Y kromozom mikrodelsyon analizi için 100 infertil ve 100 sağlıklı erkek bireyden oluşan bir çalışma grubu oluşturuldu. Çalışma grubundaki tüm bireylerden alınan genomik DNA, moleküler Real Time PCR yöntemi ile Y kromozom mikrodelsyonlarını taşıyıp taşımadıkları araştırılmıştır.

4.2. Kromozom Analizi İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1- Nutrient Mixture F-10 Ham
- 2- Fetal Calf Serum
- 3- Phytohemagglutinin M
- 4- Colcemid. 10 mikrogram/ ml
- 5- Penisilin-Streptomisin
- 6- L-Glutamine 10 mikrogram/ml
- 7- KCL- Potassium chloride

- 8- Glacial Acedic Acid
- 9- Methano
- 10- 10-Xylol
- 11- Giemsa Lösung
- 12- Heparin
- 13- Ethyl alcohol
- 14- Serum fizyolojik
- 15- TrypsinCertifield 25gr 1:250
- 16- Pancreatin 25 gr
- 17- Na₂HPO₄
- 18- KH₂PO₄
- 19- Biebrich scarlet
- 20- Distile water

4.3.Kromozom Analizi İçin Kullanılan Solüsyonlar

- 1- Phytohaemaglutinin solüsyonu: 5 mg phytohaemaglutinin M + 5 ml bidistile su
- 2- Hipotonik solüsyonu : 100 ml distile su + 5,6 gr KCL (0.075 M KCL)
- 3- Cornoy fikstatif : 3 birim methanol + 1 birim acetic acid glacial
- 4- Periferik kanda kromozom analizi için kullanılan kültür ortamı içeriği:
 - a- Nütrient Mixture F-10 Ham 100 ml
 - b- Phytohaemaglutinin M solüsyonu 1.5 ml
 - c- L- Glutamine 1 ml
 - d- Penisilin- Streptomisin 1 ml
 - e- Fetal Calf Serum 20 ml
- 5- Trypsin solüsyonu: 50-100 mg Trypsin + 100 ml serum fizyolojik (37 °C)
- 6- Boya solüsyonları:
 - a- G Bantlama için: 95 ml Sransan tamponu + 5 ml Giemsa Gsing
 - b- Düz boya için: 5 ml Giemsa Lsing + 95 ml distile su
- 7- Pancreatin solüsyonu: 100-50 mg pancreatin solüsyonu + 100 ml serum fizyolojik (37 °C)
- 8- Sransan tamponu :

a- 9.08gr. KH_2PO_4 + 1000 ml distile su (A)

b- 1.88gr. KH_2PO_4 + 1000 ml distile su (B)

A ve B solüsyonları karıştırılarak PP: 6.8'e ayarlanır.

4.4. Kromozom Analizi İçin Kullanılan Diğer Araç ve Gereçler

- 1- Etüv
- 2- Mikroskop
- 3- Görüntüleme sistemi
- 4- Zaman ayarlı etüv
- 5- Kuru hava sterilizatör (köttermen)
- 6- Bunsen bek
- 7- Enjektör
- 8- Pipet
- 9- Elektronik duyarlı terazi
- 10- Mezürler
- 11- Vorteks
- 12- Lam
- 13- Buzdolabı
- 14- Şaleler
- 15- 15 ml'lik konik santrifüj tüpleri
- 16- Laboratuvar saati
- 17- Plastik eldiven
- 18- Lanset

4.5. Kromozomların Elde Edilmesi

Bu çalışma lenfosit kültür yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmanın uygulama aşamaları da aşağıdaki gibidir;

- 1- Hasta kişiden heparinli steril enjektör ile 5 ml kan alınır
- 2- Laboratuvar ortamına gelen kan, heparinli steril tüplere konulmadan önce hasta kişinin adı ve soyadı tüpün üstüne yazılır.

- 3- Steril koşullarda hazırlanmış ve buzdolabında korunmuş olan kültür solüsyonu çıkarılır ve her bir kültür tüpüne steril ortamda 5 ml aktarılır.
- 4- Heparinli steril enjektör ile hastadan alınan kan kültür tüplerine 5-6 damla kan eklenir ve tüpün ağızı kontaminasyona karşı alevden geçirilir ardından 72 saatlik inkübasyon için etüve konulur.
- 5- 71.15 saat sonra inkübasyona konulan kültüre iki damla colcemid eklenir ve tekrar etüve bırakılır.
- 6- 72 saat sonra etüvden çıkarılan kültür vortekslenildikten sonra 10 dakikada 1200 rpm'de santrifüj edilir.
- 7- Santrifüjden sonra üstündeki süpernatant atılır alta kalan pelet vortekle karıştırılıp üzerine 10 ml hipotonik solüsyonu eklenip 10 dakika etüve bırakılır.
- 8- 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar üstündeki süpernatant atılır ve vortekslenirken bu defa üstüne pastör pipetle 10 ml fiksatif eklenir.
- 9- Fiksatif ile yıkama 3-4 defa tekrarlanır.
- 10- Son santrifüj işleminden sonra tüplerde 0.5-1 cc pelet bırakıldı.
- 11- En altta kalan materyal pipet ile karıştırıp alkolde temizlenmiş lamlara 25-30 cm yükseklikten damla damla damlatılarak yayıldı.
- 12- Kurumaya bırakılmış preparat 3 gün etüvde yaşlanmaya bırakılır.

4.6. Giemsa Bantlama

- a- Yaşlandırılmış preparatlar 25-60 saniye arasında pankreatin çözeltisinde tutuldu.
- b- Preparatlar distile su ile 2 defa yıkandı
- c- Giemsa çözeltisinde (PH: 6.8) 4-5 dakika boyanır.
- d- İki defa distile sudan geçirilip kurutuldu.

4.7. Sitogenetik Değerlendirme

Mikroskop ışığı altında incelenen preparatlar önce küçük büyütmele objektifle başlanır. Analize uygun metafaz (100x) objektife alınır ve incelemeye başlanır. en az 20 metafaz analiz edildikten sonra istenilen sonuca ulaşıldığında karyotiplenir ve arşivlenir.

4.8.Kandan DNA İzolasyonu

Hastaların EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden Genomik DNA, EZ1 Blood mini kiti (Qiagen, Germany) kullanılarak, otomatik izolasyon cihazı (Qiagen EZ1 İzolasyon Cihazı) çalışma talimatlarına göre izole edildi. (Qiagen, Germany).

4.8.1.Prosedürün çalışma prensibi

Çekirdeğe sahip olan kan hücrelerinin çekirdeğindeki DNA'ya ulaşmak için hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Sistemde hücre duvarını parçalamak amacı ile Lysis buffer kullanılır. Proteinase K ile proteinleri DNA dan ayırarak homojen bir karışım oluşturur. Magnetic bead yüzeyine negatif yüklü DNA bağlanması sağlanarak bead-DNA kompleksi total karışımdan ayrılır. Hücresel artıkları uzaklaştırmak amacı ile wash solüsyonu ile yıkama yapılır. Son olarak yüksek ısı ve elution buffer ile Magnetic bead- DNA kompleksi birbirinden ayrılarak saf DNA elde edilir.

4.8.2 DNA kantitasyonu

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların konsantrasyonu Qubit dsDNA HS Assay Kit ve Qubit 2.0 Fluorometer yardımıyla ölçüldü. Ölçüm için 2 standart hazırlandı. Her standart ve örnek için çalışma solüsyonu; total hacim 200 µl olmak üzere, Qubit® dsDNA HS Reagent'ın Qubit® dsDNA HS Buffer içinde 1:200 seyreltilmesiyle hazırlandı. Bu işlemin ardından hazırlanan solüsyondan 190 µl ve kit içerisinde bulunan standart #1'den 10 µl olmak üzere 0,5 ml'lik tüplere konuldu. Karışım vortekslelendikten sonra 1 dakika inkübasyonun ardından standart ölçümü yapıldı. Aynı işlem standart #2 için de gerçekleştirildi. Cihaz bu ölçümleri kullanarak standart bir eğri çizdi. Ardından örneklerin ölçümüne geçildi. Hazırlanan çalışma solüsyonundan 199 µl ve izole edilen DNA'lardan 1 µl 0,5'lik tüplere konuldu. Vortekslelendikten sonra 1 dakika inkübe edilen örneklerin ölçümü gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçları not edildi.

4.8.3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

DNA örnekleri 20 nanogram/mikrolitre olacak şekilde seyreltildi. Tüm örneklerde TTY2L2A, TTY2L12A, sY254 ve sY255 primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi. Kullanılan PCR içeriği tablo 4'te gösterilmiştir. Kullanılan primerlerin dizileri tablo 5'te, PCR döngü koşulları tablo 3'te gösterilmiştir.

dH ₂ O	RT2 SyberGreen Master Mix(Qiagen, Hilden)	Forward Primer	Reverse Primer	Template
6 µl	10 µl	1 µl	1 µl	2 µl
Toplam Hacim 20 µl				

Tablo 2. Gerçek zamanlı PCR içeriği

<i>SRY</i>	Forward: 5'-GAATATTCCCGCTCTCCGGA-3'
	Reverse: 5'-GCTGGTGCTCCATTCTTGAG-3'
<i>TTY2L2A</i>	Forward: 5'-CCTATCTGAGCAGGTA CTTTAC-3'
	Reverse: 5'-GTGTCATCTGTCTTTCTCAGTG-3'
<i>TTY2L12A</i>	Forward: 5'-CAGACTGTGAGTTGGTTCTG-3'
	Reverse: 5'-TATGTGAGAGAGACCCTGTG-3'
<i>sY254</i>	Forward: 5'-GGGGTTACCAGAAGGCAA-3'
	Reverse: 5'-GAACCGTATCTACCAAAGCAGC-3'
<i>sY255</i>	Forward: 5'-GTTACAGGATTCGGCGTGAT-3'
	Reverse: 5'-CTCGTCATGTGCAGCCAC-3'

Tablo 3. Primer diziler

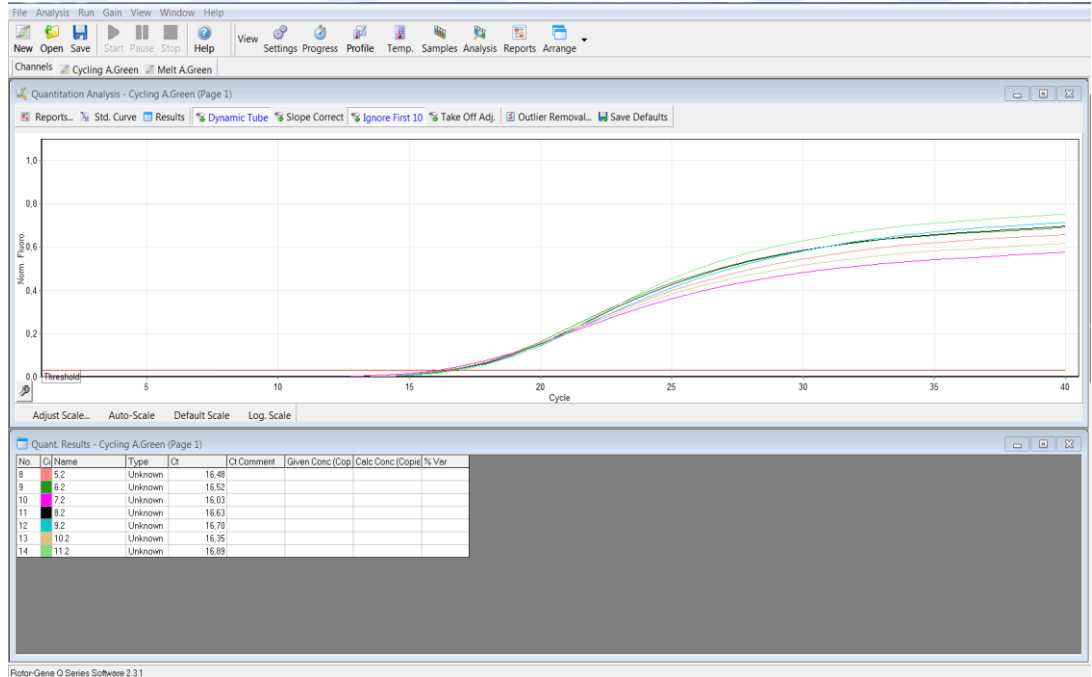
Evre	Süre ve Sıcaklık	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	10 dakika 95°C	1
Denatürasyon	15 saniye 95°C	40
Primerlerin Bağlanması ve Okuma	1 dakika 55 °C	40
Uzama	40 saniye 72°C	40

* Tüm primerler için aynı döngü koşulları uygulanmıştır

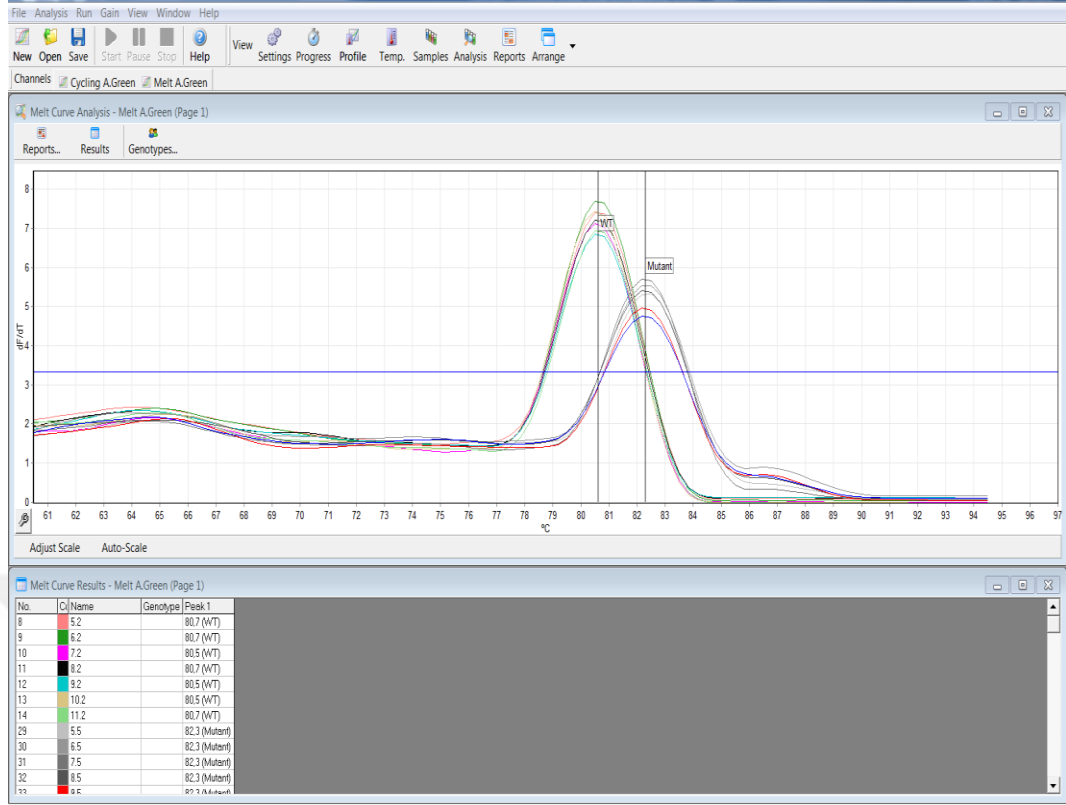
Tablo 4. Gerçek zamanlı PCR döngü koşulları*

4.8.4. Real time PCR sonuçların değerlendirilmesi

Herbir hasta ve kontrol DNA'ları yapılan Gerçek Zamanlı PCR sonunda bağlanma eğrileri kontrol edildi. Bağlanmış olan primerlerin ışımalarına göre amplifiye olan örneklerin erime eğrilerine göre değerlendirme yapıldı.



Şekil 6. Primerlerin bağlanma eğrileri



Şekil 7. Primerlerin erime eğrileri

4.8.5. Sonuç ve yorumlama

Herbir primerin erime eğrisi tablo 5’te gösterilmiştir. Buna göre Y kromozomu üzerinde gerçekleşen mutasyonları Wild Tip veya Mutant Tip olarak değerlendirildi.

4.9. İstatistiksel Analiz

Yapmış olduğumuz çalışmanın istatistiksel analizleri için SPSS 24.0 for Windows paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde; sayısal değişkenler için normal dağılım parametrelerini sağlayan verilerde ortalama±standart sapma değerleri verilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan iki farklı örneklem grubunun ortalamalarını kıyaslayıp aralarında anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek için İki Bağımsız Örneklem t-testi (Independent Samples t-test) uygulanmıştır.

5. BULGULAR

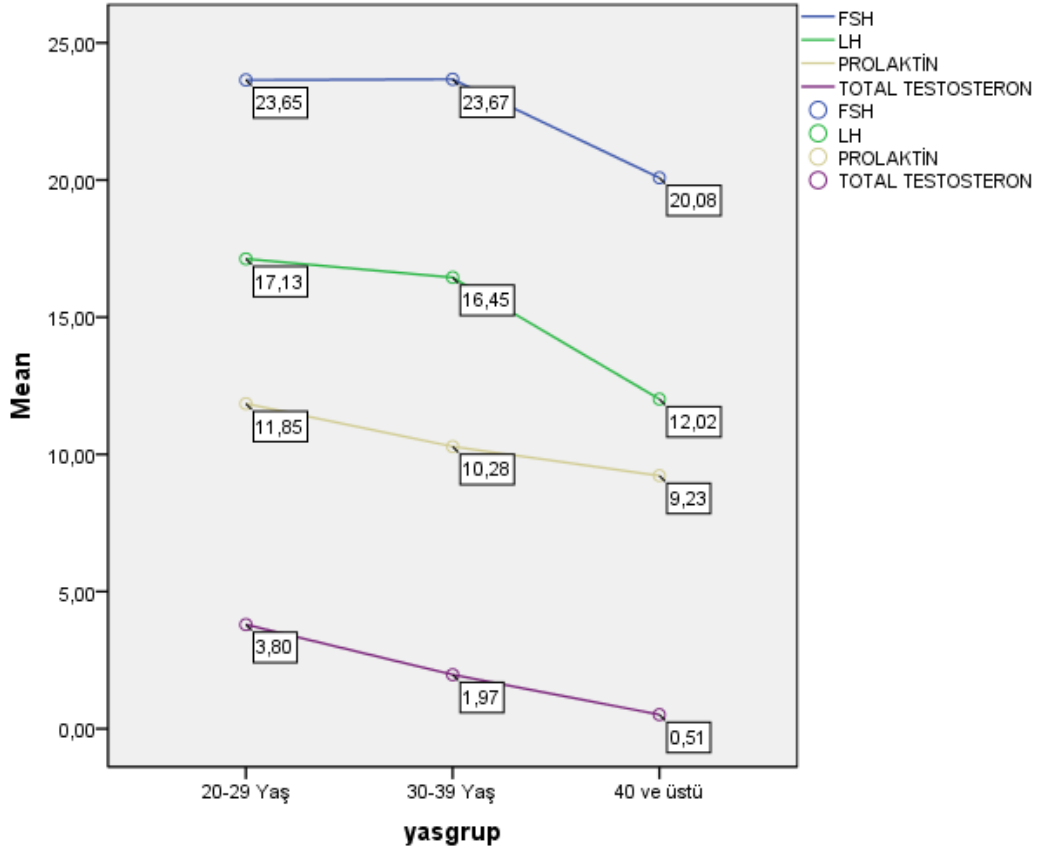
Bu çalışma Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Genetik Tanı Laboratuvarına gönderilen non-obstruktif azospermi tanılı 100 infertil ve 100 kontrol fertil erkeği kapsamaktadır.

Bu çalışma gurubunu oluşturan 100 infertil erkek bireye önce sitogenetik analiz yöntemi uygulanmıştır. Bunun için bulgulara periferik kanda lenfosit kültürü yöntemi ile karyotip analizi yapılarak sonuçları analiz edildi.

100 infertil ve 100 kontrol fertil erkeğe AZF ve TTY2 gen mikrolelesyon analizi için ise DNA izolasyonu yapılmış ve hedef primerler ile Real Time PCR yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

5.1. Hormonal (testosteron, FSH, LH, prolaktin) Durum

Çalışmaya dahil edilen 100 infertil vakanın yaş dağılımına göre hormon düzeyleri şekil 8'de verilmiştir. Yaştaki artışla birlikte hormon düzeylerinde azalma görülmektedir. Yaş grupları ve hormon düzeyleri karşılaştırıldığında FSH, LH ve Prolaktinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilmemiştir. Buna karşın total testosteronda yaş grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 8. İnfertil vakalarda yaş guruplarına göre hormonal (testosteron, FSH, LH, prolaktin) durum

5.2. Sitogenetik Sonuç

100 infertil erkek gurubunda yapılan sitogenetik analizde 15 olgunun (%15) Klinefelter sendromu (47,XXY) karyotipine sahip olduğu görüldü. Ayrıca 1 olguda 47,XXY, 9qh+ (%1); 1 olguda 46,XY, inv9 (p13;q12) (%1); 6 olguda 46,XY, 9qh+ (%6); 1 olguda 46,XY,15ps+; 1 olguda 46,XY, 21ps+ (%1); 2 olguda 46,XY, 22ps+ (%2); 1 olguda da 46,XY, 1qh+ (%1) ve 1 olguda 46,XY,1qh+,9qh+ (%1) kromozom kuruluşu saptanmıştır. Farklı kromozom kuruluşuna sahip tüm olgular (tablo 6) da gösterilmiştir.

Olgu sayısı	Karyotip
71	46,XY
15	47,XXY
1	47,XXY, 9qh+
1	46,XY, inv9 (p13;q12)
6	46,XY, 9qh+
1	46,XY,15ps+
1	46,XY, 21ps+
2	46,XY, 22ps+
1	46,XY, 1qh+
1	46,XY,1qh+,9qh+

Tablo 5. İnfertil erkeklerdeki karyotip sonuçları.

Kromozom anomalisine sahip olgular FSH (Folikül uyarıcı hormon), LH (Lüteinize edici hormon), Total Testosteron ve Prolaktin sonuçlarına göre değerlendirilmiş ve Tablo 4’de gösterilmiştir. WHO kriterlerine göre FSH referans aralığı 1.5-12 mIU/ml, LH referans aralığı ise 1.7-8.6 mIU/ml, Total Testosteron 2.18-9.05 ng/ml, Prolaktin ise 4,04-15,02 ng/ml referans aralığında değişmektedir. Klinefelter sendromlu olan 16 olguda hem FSH hem de LH yüksek oranda bulunurken, Total Testosteron ise 8 olguda normal olurken, 8 olguda ise düşük seviyede görülmüştür. Prolaktin ise 3 Klinefelterli olguda normal seviyede görülürken 13 olguda ise yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Karyotip	FSH (1,5-12,4) mIU/ml	LH (1,7-8,6) mIU/ml	Total Testosteron (2,18-9,05) ng/ml	Prolaktin 4,04-15,02 ng/ml	Yaş
47,XXY	32,43	16,72	10,86	3,38	24
47,XXY	41,94	20,35	8,05	2,98	26
47,XXY	35,9	24,37	18,96	0,89	30
47,XXY	33,64	23,72	12,66	1,07	39
47,XXY	33,95	19,89	6,6	1,33	35
47,XXY	36,35	16,4	11,4	6,92	40
47,XXY	32,58	25,07	15,46	1,42	29
47,XXY	26,87	11,64	18,92	3,14	25
47,XXY	21,45	11,83	9,5	5,15	28
47,XXY	35,48	19,48	17,98	1,68	29
47,XXY	44,04	31,08	3,81	1,45	27
47,XXY	23,74	16,89	2,38	3,28	32
47,XXY	36,03	21,06	18,47	1,02	40
47,XXY	50,07	27,11	5,93	2,63	28
47,XXY	73,75	35,07	9,8	1,61	32
47,XXY	31,32	29,63	12,39	3,48	26

Tablo 6. Klinefelterli olgulara ait serum hormon düzeyleri

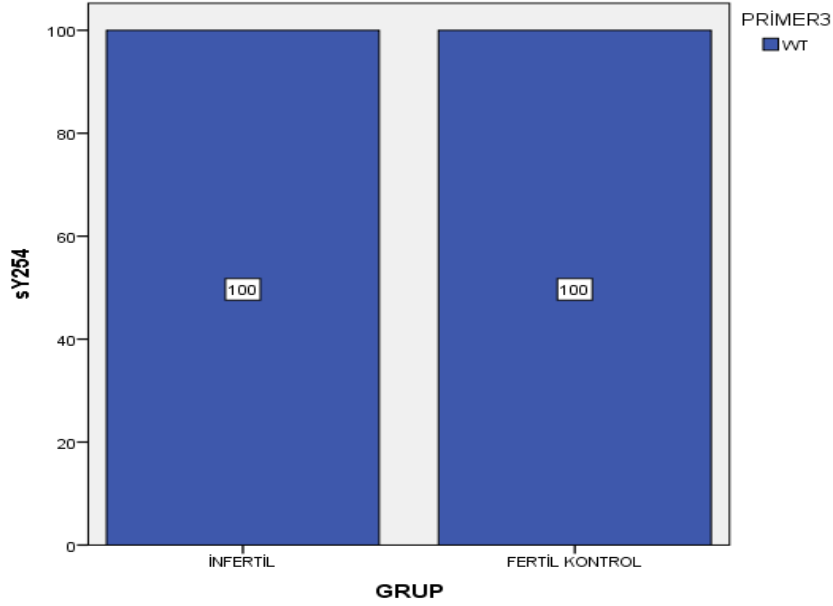
5.3.Moleküler Genetik (PCR) Analiz Sonuçları

Yapılan bu çalışmada 100 infertil erkek ve kontrol amaçlı 100 fertil erkeğin aynı bölgesinde bulunan hedef genlerin (TTY2L2A, TTY2L12A, Sy254, sY255) 4 farklı gen bölgesine 4 farklı primerleri kullanarak hedef genlerde bir mutasyon olup olmadığını araştırılmıştır. SRY (Sex determining region of the Y chromosome) kontrol primerleri olarak kullanılmıştır.

5.3.1. AZF gen analizi

5.3.1.1. sY254 mutasyon analizi

sY254 primerin uygulandığı 100 infertil ve 100 kontrol erkek bireylerin hişbirinde mutasyon saptanamamıştır [t=-1,750, p=0,083 (p>0,05) WT: Wild Tip.

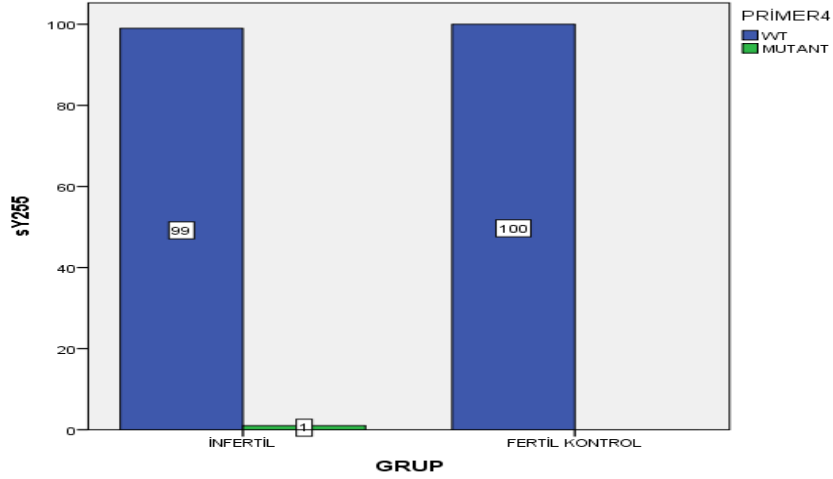


şekil 9. Kontrol ve NOA'lı infertil vakaların genomik DNA'sında sY254 genindeki mikrodelsyonların yüzdesi. (t=-1,750, p=0,083 (p>0,05), WT: Wild Tip.

5.3.1.2. sY255 mutasyon analizi

sY255 primerin uygulandığı 100 fertil kontrolde sY255 mutasyonu saptanamazken, 100 infertil erkek bireyin 1'inde (% 1) mutasyon saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir fark olmadığı görölmüştür [t=1,000, p=0,320 (p>0,05)].

sY255 mutasyonlu infertil vakaların 1'inde aynı zamanda 46,XY,inv9 (p13;q12) kromozom kuruluşuna rastlanmıştır.

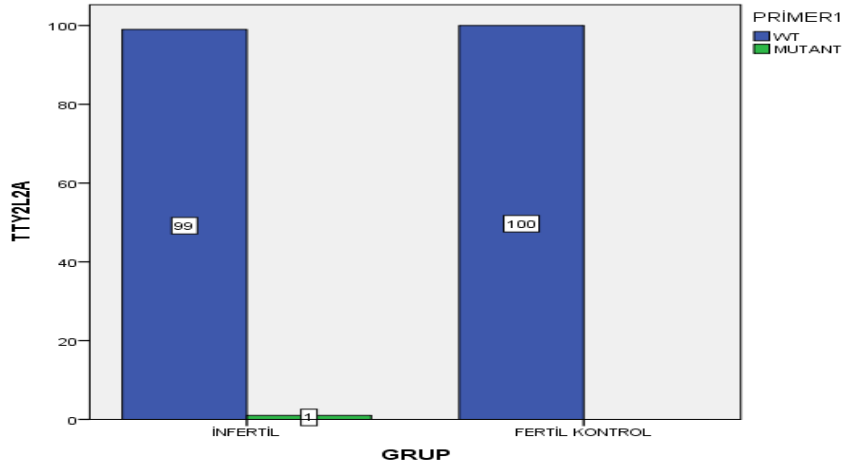


Şekil 10. Kontrol ve NOA'lı infertil vakaların genomik DNA'sında **sY255** genindeki mikrolelesyonların yüzdesi. [t=1,000, p=0,320 (p>0,05)], WT: Wild Tip).

5.3.2. TTY2 gen ailesi analizi

5.3.2.1 TTY2L2A gen ailesi mutasyon analizi

Primerin uygulandığı 100 fertil kontrol bireylerinde TTY2L2A mutasyonu saptanamazken, ve 100 infertil erkeğin 1'inde (% 1) mutasyon saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür [t=1,000, p=0,320 (p>0,05)].

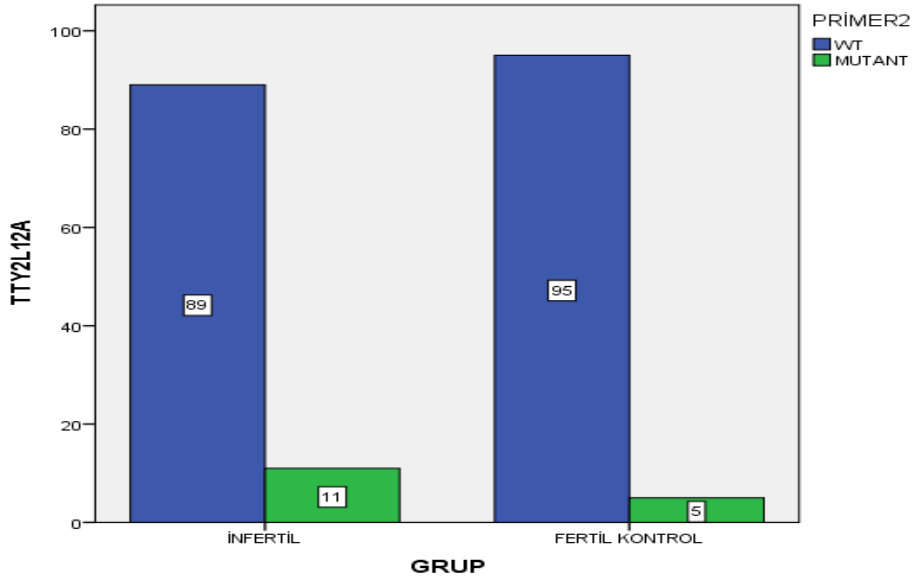


Şekil 11. Normal ve NOA'lı vakaların genomik DNA'sında TTY2L2A genindeki mikrolelesyonların yüzdesi. [t=1,000, p=0,320 (p>0,05)], WT: Wild Tip .

5.3.2.2 TTY2L12A gen ailesi mutasyon analizi

Primerin uygulandığı 100 infertil vakanın 11'inde (% 11) ve 100 fertil erkek bireylerin sonucunda 5'inde (% 5) mutasyon saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür [$t=1,56$, $p=0,119$ ($p>0,05$)]

TTY2L12A mutasyonlu infertil vakaların 1'inde hem 46,XY,inv9 (p13;q12) kromozom kuruluşu hem de sY255 mikrodelsiyon birlikteliği saptanmıştır. Ayrıca infertil vakaların 1'inde 46,XY,21ps+, 1'inde 47,XXY, 1'inde 46,XY,21ps+, 1'inde 46,XY,inv9 (p13;q12) kromozom kuruluşuna rastlanmamıştır.



Şekil 12. Normal ve NOA'lı vakaların genomik DNA'sında TTY2L12A genindeki mikrodelsiyonların yüzdesi. [$t=1,56$, $p=0,119$ ($p>0,05$)], WT: Wild Tip .

6. TARTIŞMA

İnfertilitenin %30-50 oranında erkek faktörüne bağlı olduğu bildirilmiştir (79). Erkek infertilitesinin yaklaşık % 90'ında bozulmuş spermatogenez vardır. Bu tip vakalardaki genetik analizler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerle yapılmaktadır (80).

Olgu	Karyotip	Sy254 Mutasyonu	Sy255 Mutasyonu	TTY2L2A Mutasyonu	TTY2L12A Mutasyonu	Yaş
1	47,XXY					27
2	46,XY					29
4	46,XY,inv9(p13;q12)		+		+	35
9	47,XY,9qh+					40
13	46,XY,9qh+					34
15	46,XY,9qh+					26
18	46,XY,9qh+					29
19	46,XY			+		39
22	46,XY,9qh+					35
23	46,XY,1qh+,9qh+					28
25	46,XY				+	32
26	46,XY				+	38
33	46,XY,21ps+				+	35
40	46,XY,9qh+					30
41	46,XY,15ps+					28
45	46,XY,9qh+					37
51	46,XY,22ps+					24
54	46,XY				+	32
55	47,XXY				+	28
60	46,XY,22ps+					25
62	46,XY				+	38
64	46,XY,1qh+					31
83	46,XY				+	32
84	46,XY				+	25
94	46,XY				+	28
95	46,XY,21ps+				+	35

Tablo 7. NOA'lı olgulara ait, Karyotip, sY254, sY255, TTY2L2A ve TTY2L12A Mutasyonu verileri

6.1. Kromozom Anomali Oranları

Erkek infertilitesinin %40'nın nedeni bilinmemektedir, bu nedenler arasında kromozomal düzensizlik şeklinde olan genetik faktörler önemli bir yer tutmakta olduğu belirtilmiştir (81). Sebebi bilinmeyen oligozoospermik ve azospermik olgularda, sayısal ve yapısal kromozomal düzensizliklerine sık rastlanıldığı bulunmuştur (82). Azospermik ve Oligozoospermik olgularda kromozomal düzensizlik oranı ile ilgili yapılan birçok çalışmada bu oranın % 2,1-10,3 arasında olduğu bildirilmiştir (83).

İnfertil azospermik erkeklerde genellikle seks kromozom anomalileri ile birlikte, translokasyon, dublikasyon ve delesyon gibi yapısal kromozom anomalilerine de rastlanılmaktadır (84). Bu kromozomal anomalilerinin oranı erkek infertilitesinde %2 ile %8 arasında değişmektedir. Klinefelter sendromu, infertil erkeklerde en fazla görülen kromozom anomalisi olarak bildirilmiştir. Klinefelter sendromunun görülme sıklığı şiddetli oligospermik olgularda % 5 ve azospermik olgularda % 10-15 civarında olduğu bildirilmiştir. Klinefelter sendromuna sahip mozaik olmayan olguların % 90'dan fazlasının azospermi olduğu kabul edilmektedir. Klinefelter sendromuna sahip mozaik olan olgularda değişik sayılarda sperm üretimi olduğu bilinmektedir (85). Bizim çalışmamızda NOA'lı bireylerdeki Klinefelter sendromlu oranı literatürle uyumlu olarak %16 olduğu tespit edilmiştir.

Klinefelter Sendromlu erkeklerin steril olmasına rağmen, mozaik ya da mozaik olmayan Klinefelter Sendromuna sahip erkeklerden sperm üretilmediği ve dolayısıyla fertilitate gösterip baba olabildiği nadir olgularda bilinmektedir (86-88). Yeni yardımcı üreme teknikleri bu tür vakaların bazıları için fertilizasyon ve babalık için bir şans olarak görülmektedir (86-88). İnfertil erkeklerde, cinsiyet kromozomu anomalilerinin dışında, Robertsian translokasyonlar, dengeli translokasyonlar, inversiyonlar (perisentrik ya da parasentrik), marker kromozomları, qh+ ve Ps+ gibi yapısal anomaliler de görülebilmektedir (89). Çalışmamızda görülen infertil erkeklerdeki yapısal kromozom anomalileri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Erkek infertil bireylerde 9. kromozom, en fazla varyasyon gözlenen kromozom olarak bildirilmiştir. 9. kromozomun perisentrik bölgesinde 12 heteromorfik kalıp olarak Starke ve ark. tarafından belirlenmiştir. Bu 9. kromozom

bölgenin tekrarlayan dizilerden oluştuğunu ve bu tekrarlayan dizilerin bulunduğu sentromerik bölgede mayoz sırasında meydana gelen değiş tokuşlar sırasında polimorfizmlerin ortaya çıktığını ileri süren çalışmalar ile ilgili bir mekanizmanın bu şekilde açıklanabileceğini bildirmişlerdir (90). İnfertil erkek olgularda kromozom varyantlarının sayısında artış bulunduğu, ancak heterokromatin artışının çoğunlukla raporlarda belirtilmeye gerek duyulmayacak kadar önemsiz olduğu bildirilmiştir (91). Heterokromatin polimorfizmi bulunan erkek hastalarda sperm FISH yöntemi ile anöploidi oranlarında artış saptanmış, bu olgularda yardımcı üreme tekniklerinin uygulanması sırasında daha yüksek başarısızlık ve daha düşük gebelik ve implantasyon oranları bulunduğu bildirilmiştir (91). Heterokromatinin sperm üretiminde hangi mekanizmayı değiştirerek etkili olduğu henüz bilinmemekle birlikte normal varyant olarak değerlendirilen değişikliklerin detaylı olarak araştırmaları ile sperm üretiminde rol oynayan genler ile nasıl etkileştikleri açıklığa kavuşacağı düşünülmektedir. Çalışmamızda görülen 9. Kromozom inversiyon ve qh⁺’ları tablo 3’de gösterilmiştir.

Satellit artışları ps⁺ şeklinde akrosentrik kromozomların kısa kolunda bulunduğu rapor edilmiştir (92). 18S ve 28S rRNA ve ribozomal proteinleri kodlayan ve nukleolar organize edici bölgeyi (NOR) oluşturan genler akrosentrik kromozomların kısa kolunda bulunmuştur (93). Satellit artışlarının, sperm üretiminde hangi mekanizmayı değiştirerek etkili gösterdiği henüz bilinmemekle birlikte normal varyant olarak değerlendirilen değişikliklerin ayrıntılı olarak araştırmaları yapılarak sperm üretiminde rol oynayan genler ile nasıl etkileştikleri açıklanmaya çalışılmıştır (93).

6.2. Erkek İnfertilitesi ile Hormonal Durum Arasındaki İlişkisi

Literatürde infertil erkeklerin sperm sonuçları ile hormonal düzeylerin karşılaştırılmasında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da FSH ve LH’ın kromozom anomalilerinde yüksek olduğu saptanmıştır. 16 Klinefelter olgunun tamamında hem FSH hem de LH yüksek oranda tespit edilirken, Total Testosteron ise sadece 8 Klinefelter olguda düşük seviyede bulunmuştur, prolaktin seviyesinin ise 13 Klinefelter olguda yüksek olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda, özellikle 40'lı yaşlarda, erkeklerde total testosteron düzeylerinde düşme eğilimi olduğu, ileri yaşlarda bu düşüşün daha belirgin hale geldiği bildirilmektedir (17). Düşüklük izlenen hastalarda ayrıca LH, FSH ve prolaktin seviyelerinde de azalma olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda da LH, FSH ve prolaktin seviyeleri yaşa bağlı olarak düşüş göstermişse de yaş gurupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Buna karşın yaşın ilerlemesi ile bağlantılı olarak testosteron düzeyindeki düşüşün yaş gurupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu tespit edilmiştir.

6.3. AZFc (sY254 ve sY255) ve TTY2 Gen Ailesi (TTY2L2A ve TTY2L12A), Mikrodelesyonları

İnfertil erkeklerin tanısal çalışmasında, genellikle AZF bölgesinde Y kromozom mikrodelesyonunun taranması temel olarak kan lökositlerinde PCR kullanımı ile yapılır. Bu lokusların delesyonu spermatogenik yetmezliğe yol açabileceğine ve bu nedenle azospermi ve oligozoospermi ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (94-95). AZF genleri arasında AZFc (sY254, sY255), azospermili veya ağır oligozoospermili erkeklerde en sık delesyona uğrayan bölgedir ve mutasyon sıklığı % 10-15 olarak bildirilmektedir (96,97). Yapılan son çalışmalarda AZFc bölgesinde, özellikle DAZ geninde, yüksek oranda mikrodelesyonların ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (98,99). Çalışmamızdaki hem infertil hem de fertil kontrol guruplarındaki olguların hiç birinde sY254 mutasyonu saptanmazken, infertil valaların 1'inde (% 1) sY255 mutasyonu saptanmıştır.

Zonozi ve ark. yaptıkları çalışmada fertil kontrol ve NAO hastalarında AZFc mikrodelesyonu görülmezken, fertil kontrolde bir TTY2L2A mikrodelesyonu (% 3.3) ve NOA'da 4 (% 13.3) gözlemişlerdir (100). Bizim çalışmamızda ise TTY2L2A mikrodelesyonu fertil kontrollerde görülmezken, 5 (%5) fertil kontrolde TTY2L12A mikrodelesyonu saptanmıştır. Fertil kontrollerde görülen TTY2L12A gen mikrodelesyonlarının nedeni anlaşılmamıştır, ancak çevresel etkenlere maruz kalma nedeniyle oluşabilecek bir de novo mutasyondan kaynaklanmış olabileceği ileri sürülebilir. Benzer bir gözlem daha önce yüksek radyasyonuna maruz kalan normal popülasyonda DAZ'ın delesyonları için de rapor edilmiştir (100).

Ayrıca 30 NOA hastasının 6'sında (% 20) TTY2L12A mikrodelesyonu olduğunu gösterirlerken normal kontrolde gözlenen mikrodelesyon olmadığını göstermişlerdir. Oligozoospermili ve azospermili Yunan vakalardan oluşan başka bir çalışmada benzer şekilde erkek infertilitesi ile TTY2L2A ve TTY2L12A genlerinin mikrodelesyonları arasında bir ilişki tespit edilmiştir (101). Bu çalışmanın yazarları ayrıca bu genlerin spermatogenezde yer aldığı sonucuna da varmışlardır.

Azoospermi hastalarında yapılan bir başka çalışmada, AZFc mikrodelesyonu olmadığı halde, hem TTY2L2A hem de TTY2L12A genleri için yaklaşık % 2.2 mikrodelesyon bildirmişlerdir (102).

Bizim çalışmamızda da ise AZFc bölgelerinden Sy254'de hem fertil kontrol hem de NOA'lı infertil vakalarda mutasyon tespit edilmemiştir. Sy255 mikrodelesyonu fertil kontrollerde görülmezken, NAO olguların 1'inde (% 1) görülmüştür. TTY2L2A mikrodelesyonu fertil kontrollerde görülmemiştir, fakat NOA'lı olguların 1'inde (% 1) mikrodelesyon tespit edilmiştir. Ayrıca 100 NOA hastasının 11'inde (% 11) TTY2L12A mikrodelesyonu olduğu görülmüş ve normal kontrolde 5 vakada (%5) TTY2L12A mikrodelesyonu saptanmıştır. Çalışmamızdaki infertil azospermili hastalarda TTY2 gen ailesinde görülen delesyonların, TTY2'ye benzer transkriptlerin karmaşık spermatogenez sürecinde önemli bir rol oynayabileceğini ve spermatogenez başarısızlığına yol açarak erkek infertilitesine neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, TTY2L2A ve TTY2L12A genlerinin de erkek infertilitesi için yeni bir markır olarak kullanılabileceğini, rutin olarak taranan AZF genleri kadar önemli olabileceği sonucunu doğurmaktadır.

AZFc ve TTY2 gen aileleri için literatürde bildirilen mikrodelesyonların sıklığı, sonuçlarımızla farklı olmuştur. Literatürde belirtilen Yq delesyon oranlarında %0.6 ile % 55 arasında değişen büyük varyasyonlar görülmektedir (103). Bu durumun etnik farklılıklar, hasta seçim kriterleri ve metodolojik özelliklerin farklılığından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (104). Delesyon sıklığını etkileyen bir diğer etmen kullanılan primerlerin uygunluğu ve sayısıdır (105,106). Şimdiye kadar yapılan çalışmaların her birinde infertil erkek bireyde Yq'daki mikrodelesyonları belirlemek için uygulanan PCR tekniğinde farklı sayıda aday genlerdeki delesyonu saptamak için farklı sayıda primer kullanılmıştır. Kan hücreleri (lenfositler) mezodermden ve gametler endodermden ve deri hücreleri ektoderm gibi

farklı embriyonik dokulardan geliştikleri ve farklı genetik lezyonlar içerebildikleri için, delesyon sıklığını etkileyebilmektedirler (107). Kleiman ve ark. (1999) azospermik ve oligospermik olgularda hem lenfosit DNA, hem semen ve hem de yanak hücre DNA'sındaki Y kromozom delesyonlarını çalışmışlardır. Farklı dokuların DNA'sında mikrolelesyon sıklıklarının da farklı olduğunu gözlemişlerdir (108).

Bununla birlikte, literatürde TTY2 gen ailesini erkek infertilitesiyle ilişkilendiren sınırlı sayıda rapor vardır. Bu genler için bildirilen farklı mikrolelesyon sıklıklarının olası nedenleri AZF için olanlarla aynı olmakla birlikte, bu genlerin diğer Y mikrolelesyonları ile birlikte bir markır olarak test edilebilmesi için, daha önce farklı etnik köken ve coğrafi dağılımları olan farklı popülasyonlardan daha fazla araştırmaya ve daha fazla veriye ihtiyaç vardır. Böylece, TTY2 gen ailesinin klinik kullanımı için bir mikrolelesyon aralığını sağlamak üzere farklı raporlardan bir meta-analiz yapılabilir.

7.SONUÇLAR

Sonuç olarak, AZFc mikrodelsyonu düşük oranda görülen non-obstrüktif azospermi hastalarından oluşan çalışmamızda görülen yüksek orandaki TTY2 mikrodelsyonları, TTY2 genlerinin spermatogenez yetersizliği ve erkek infertilitesinde rol oynamış olabileceğini ileri sürmektedir. Ayrıca kromozom anomalisi özellikle Klinefelter Sendromunun yüksek oranda görülmesi infertil vakalarda karyotip analizinin gerekliliğini de ortaya çıkarmıştır.



8. KAYNAKÇA

1. Uluğ M., Süsleyici DB., Arvas U A., Çamlıbel T. Testiküler Azospermili Erkeklerde Y Kromozomunda Azospermi Faktör Mikrodelesyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Belirlenmesi. Cerrahpafla Tıp Dergisi 2006; 37:126 – 130.
2. Kavasoglu Z. Erkek İnfertilitesinde Deleted İn Azoospermia Like (*Dazl*), 5-Metilentetrahidrofolat Redüktaz (*Mthfr*) Ve Follikül Uyarıcı Hormon Reseptör (*Fshr*) Genlerinin Polimorfizmlerinin Araştırılması. B.Ü. Sağlık Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2018, Ankara (Danışman: Prof. Dr. Feride İffet Şahin).
3. Balkan M. İnfertil Erkeklerde Genetik Araştırma. D.Ü. Sağlık Bilimler Enstitüsü,Doktora Tezi, 2006, Diyarbakır (Danışman : Yard. Doç. Dr. Selahaddin Tekeş) .
4. Krausz, C., A.R. Escamilla, and C. Chianese, *Genetics of male infertility: from research to clinic*. Reproduction, 2015. **150**(5): p. R159-74.
5. Verim L. Erkek İnfertilitenin Genetik Temeli Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, Üsküdar, İstanbul.
6. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet 1976; 34: 119-124.
7. Chandley AC, Gosden JR, Hargreave TB, et al. Deleted Yq in the sterile son of a man with a satellited Y chromosome. J Med Genet 1989; 26: 145-153.
8. Hartung M, Devictor M, Codaccioni JL, et al. Yq deletion and failure of spermatogenesis. Ann Genet 1988; 31: 21-26.
9. Balkan M1, Tekes S, Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. J Assist Reprod Genet. 2008 Nov-Dec;25(11-12):559-65.
10. Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, Tolun A. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. J Med Genet. 2014 Apr;51(4):239-44.

11. Balkan M, Atar M, Erdal ME, Rustemoğlu A, Yıldız I, Gunesacar R, Hatipoğlu NK, Bodakçı MN, Ay OI, Çevik K. Possible association of FAS and FASLG polymorphisms with the risk of idiopathic azoospermia in southeast Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014 Jun;18(6):383-8.
12. Balkan M1, Tekes S, Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Nov-Dec;25(11-12):559-65.
13. Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, Tolun A. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J Med Genet*. 2014 Apr;51(4):239-44.
14. Andersson M, Page DC, Pettay D, et al. Autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45 X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet* 1988; 79: 2-7.
15. Bardoni B, Zuffardi O, Guioli S, et al. A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics* 1991; 11: 443-451.
16. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, et al. Towards the molecular localization of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 29-33.
17. Özpak L, Pazarbaşı A. Erkek İnfertilitesinin Sitogenetiği, *ARŞİV* 2011; 20: 23.
18. 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: 240–249.
19. Vogt, P. Edelmann H., Kirsch A., Henegariu S., Hirschmann O., Kiesewetter P., F. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* 1996; 5: 933–943.
20. Krausz, C., Quintana-Murci, L. & McElreavey, K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Human Reproduction* 2000; 15: 1431– 1434.
21. Kamp, C., Huellen, K., Fernandes, S., Sousa, M., Schlegel, P. N., Mielnik, A. et al. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7: 987–994.

22. Chandley AC, Gosden JR, Hargreave TB, et al. Deleted Yq in the sterile son of a man with a satellited Y chromosome. *J Med Genet* 1989; 26: 145-153. 9.
23. Hartung M, Devictor M, Codaccioni JL, et al. Yq deletion and failure of spermatogenesis. *Ann Genet* 1988; 31: 21-26. 10.
24. Andersson M, Page DC, Pettay D, et al. Autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45 X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet* 1988; 79: 2-7.
25. Bardoni B, Zuffardi O, Guioli S, et al. A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics* 1991; 11: 443-451.
26. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, et al. Towards the molecular localization of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 29-33.
27. Akyol D. A., Üriner Sistem Hastalıklarında Bakım, Meta Basım, İzmir, 2005.
28. Arıncı K, Elhan Al, Anatomi, İstanbul, 1997.
29. Başaran A, Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı, Nobel Kitabevi, İstanbul, 1999.
30. Hatipoğlu T., Anatomi, Hatipoğlu Yayın ve Basımevi, Ankara, 2001.
31. Kandemir V., Anatomi, Devlet Kitapları, Semih Ofset, Ankara, 2006.
32. Noyan A., Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, Ankara, 2004.
33. Özden M., Fizyoloji, Somgür Yayıncılık, Ankara, 1999.
34. Rende L, Kuzu S., Şankazan Ş, Anatomi Fizyoloji, Semih Ofset, Ankara, 2006.
35. Solomon E. P, Çeviren: Ertuğrul L., İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş, Akademi Basın ve Yayıncılık, İstanbul, 2008.
36. Vural F, Özkuş K, Aakın S. M., Ertem A. D., Tanyeli E, Vural E. Z., Anatomi Atlası, Birol AŞ, İstanbul, 2001.
37. Yakar K., Fizyoloji, Devlet Kitapları, İhsan Gazetecilik A.Ş, İstanbul, 2006.
38. Yıldırım M., İnsan Anatomisi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2000.
39. Hauser R, et al. Fertility in cases of hypergonadotropic azoospermia. *Fertil Steril* 1995 63(3): p. 631-6.
40. Martin-du-Pan RC, et al. Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum Reprod* 1995 10(8): p. 1940-5.

41. Rosenfield DA, Pizzutobraz CS. Wildlife population control – reproductive physiology under the influence of contraceptive methods in mammalian wildlife, with emphasis on immunocontraception: the best choice? A literature review *J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 1-16, 2018.
42. Bick D, Franco B, Sherins RJ, Heye B, Pike L, Crawford J. Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmans syndrome. *N Engl J Med*, 1992;326: 1752-53.
43. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempes H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction*, 2003;126:13-25.
44. Mroz K, Carrel L and Hunt PA (1999) Germ cell development in the XXY mouse: evidence that X chromosome reactivation is independent of sexual differentiation *Developmental Biology* 207 229–238).
45. Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC and Jacobs PA (1991) XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region *American Journal of Human Genetics* 49 253–260.
46. Attanasio A, Blank B, Rager K and Gupta D (1982) Effect of human chorionic gonadotropin on the plasma levels of testosterone, estradiol, sex hormone binding globuline and free testosterone in Klinefelter syndrome *Endokrinologie* 80 129–134.
47. Skakkebaek NE, Hulten M, Jacobsen P and Mikkelsen M (1973) Quantification of human seminiferous epithelium. II. Histological studies in eight 47 XYY men *Journal of Reproductive Fertility* 32 391.
48. Melnyk J, Thompson H, Rucci AJ, Vanasek F and Hayes S (1969) Failure of transmission of the extra chromosome in subjects with 47XYY karyotype *Lancet* 797–798).
49. Simoni M. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control. *Hum Reprod*. 2001;16:402–9.
50. 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.

51. Navarro-Costa P, Goncalves J, Plancha CE. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2010;16:525–4.
52. Tyler-Smith C, Krausz C. The will-o'-the-wisp of genetics—hunting for the azoospermia factor gene. *N Engl J Med*. 2009;360:925–7.
53. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet*. 1996.
54. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod*. 2003;18:1660–5.
55. 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.
56. Brandell RA, Mielnik A, Liotta D, Ye Y, Veeck LL, et al. *AZFb* deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod*. 1998;13.
57. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod*. 2003;18:1660–5.
58. 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.
59. Stahl PJ, Masson P, Mielnik A, Marean MB, Schlegel PN, et al. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril*. 2010;94:1753–6.
60. Lynch M, Cram DS, Reilly A, O'Bryan MK, Baker HW, et al. The Y chromosome *gr/gr* subdeletion is associated with male infertility. *Mol Hum Reprod*. 2005;11.
61. Lynch M, Cram DS, Reilly A, et al. The Y chromosome *gr/gr* subdeletion is associated with male infertility. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 507–512.

62. Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, et al. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet.* 2008;124:399–410.
63. McLachlan RI, O'Bryan MK. Clinical review: state of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1013–24.
64. Tyler-Smith C, Krausz C. The Will-o'-the-Wisp of genetics—hunting for the azoospermia factor gene. *N Engl J Med.* 2009;369:925–27.
65. Krausz C, Chianese C, Giachini C, Guarducci E, Laface I, et al. The Y chromosome-linked copy number variations and male fertility. *J Endocrinol Invest.* 2011;35:376–82.
66. Jobling MA. Copy number variation on the human Y chromosome. *Cytogenet Genome Res.* 2008;123:253–62.
67. Ghorbian S. Routine diagnostic testing of Y chromosome deletions in male infertile and subfertile, *Gene*, Volume 503, Issue 1, 15 July 2012, Pages 160-164.
68. Makrinou E, Fox M, Lovett M, et al. (2001) TTY2: A Multicopy Y-Linked Gene Family. *Genome Res* 11: 935-945.
69. Yapijakis C, Serefoglou Z, Papadimitriou K, et al. (2015) High frequency of TTTY2-like gene-related deletions in patients with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *Andrologia* 47: 536-544.
70. Shaveisi-Zadeh F, Alibakhshi R, Asgari R, et al. (2017) TTY2 genes deletions as genetic risk factor of male infertility. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 63: 57-61.
71. Yapijakis C, Serefoglou Z, Papadimitriou K, et al. (2015) High frequency of TTTY2-like gene-related deletions in patients with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *Andrologia* 47: 536-544.
72. Shaveisi-Zadeh F, Alibakhshi R, Asgari R, et al. (2017) TTY2 genes deletions as genetic risk factor of male infertility. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 63: 57-61.
73. Nili HA, Mozdarani H, Aleyasin A (2009) Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod BioMed Online* 18: 479-485.
74. Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, et al. (1997) Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 67: 542-547.

75. Nili HA, Mozdarani H, Pellestor F (2011) Impact of DNA damage on the frequency of sperm chromosomal aneuploidy in normal and subfertile men. *Iran Biomed J* 15: 122-129.
76. Premi S, Srivastava J, Chandy SP, et al. (2007) AZFc somatic microdeletions and copy number polymorphism of the DAZ genes in human males exposed to natural background radiation. *Hum Genet* 121: 337-346.
77. Arruda JT (2009) Occurrence of mutations in loci linked to Y chromosome in the offspring born to individuals exposed to ionizing radiation. *Genet Mol Res* 8: 938.
78. Moghbeli-Nejad S, Mozdarani H, Behmanesh M, et al. (2012) Genome instability in AZFc region on Y chromosome in leukocytes of fertile and infertile individuals following exposure to gamma radiation. *J Assist Reprod Genet* 29: 53-61.
79. Kaya I , Turan G. A. , Gür E. B., Eskicioğlu F. , Uğuz B. , Sözer I. Adakan Ş. , Saraçoğlu M. İnfertil Erkeklerde Kromozomal Anomali Ve Polimorfizm Sonuçları: Retrospektif Bir Çalışma, İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi, 2015; 19(1): 33-40.
80. Kretser DM. Male infertility. *Lancet*, 1997; 349:787-90.
81. Chandley A. Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as casual factors in male infertility. *Hum. Reprod*, 1998; 13, 45-50.
82. Koulischer L, Schoysman R. Chromosomes and human infertility. I. Mitotic and meiotic chromosome studies in 202 consecutive male patients. *Clin. Genet*, 1974; 5:116-26.
83. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology* 2006; 22(2).
84. Vann Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, et al. Cytogenetics of infertile men . In: Steirteghem AV, Devroey P, and Liebaers I, editors. *Genetics and Assisted Human Conception*. *Hum Reprod*, 1996; (11) 4:1-24.
85. Drugkar AZ, Gangane SD, More RM, Drugkar SA. Cytogenetic study in male infertility. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* 2013; 5(2): 5-11.
86. Glander HJ 2005: Infertility in the Klinefelter syndrome, *MMW Fortschr Med*. 10;147(45):39-41. 96.

87. Okada H, Goda K, Muto S, Maruyama O, Koshida M, Horie S 2005: Four pregnancies in nonmosaic Klinefelter's syndrome using cryopreserved-thawed testicular spermatozoa. *Fertil Steril.* 84(5):1508-97.
88. Chioka K, Utsunomiya N, Kohei N, Ueda N, Inoue K, Terai A 2006: Adult onset of declining spermatogenesis in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril.* 2006;85(5):1511.e1-2.
89. Veld PA, Halley DJ, van Hemel JO, Niermeijer MF, Dohle G, Weber RF. 1997: Genetic counselling before intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.* 16;350(9076):490.
90. Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sanding KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, Heller A, Claussen U, Liehr T. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 790-800.
91. Yakın K, Balaban B, Urman B. Is there possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int J Urol* 2005; 12: 984-989.
92. Shaffer L, Tommerup N. *ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature.* Basel: S Karger; 2005.
93. Shaffer L, Tommerup N. *ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature.* Basel: S Karger; 2005.
94. Qureshi SJ, Ross AR, Ma K, et al. (1996) Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: A first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 2: 775-779.
95. Zhou-Cun A, Yang Y, Zhang SZ, et al. (2006) Chromosomal abnormality and Y chromosome microdeletion in Chinese patients with azoospermia or severe oligozoospermia. *Acta Genet Sinica* 33: 111-116.
96. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, et al. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825-837.
97. Teng YN, Lin YH, Tsai YC, et al. (2007) A simplified gene-specific screen for Y chromosome deletions in infertile men. *Fertil Steril* 87: 1291-1300.

98. Mozdarani H, Ghoraieian P, Mozdarani S, et al. (2017) High frequency of de novo *DAZ* microdeletion in sperm nuclei of subfertile patients: possible involvement of genome instability in idiopathic male infertility. *Hum Fertil* in press.
99. Mozdarani H, Mozdarani S (2016) De novo cytogenetic alterations in spermatozoa of subfertile males might be due to genome instability associated with idiopathic male infertility: Experimental evidences and review of the literature. *AIMS Genet* 3: 219-238.
100. Zonozi F, Mozdarani H, Salimi M, Mozdarani S, Fallahi P, Mozdarani S, Heidari Z. High frequency of microdeletion in TTY2 gene family in peripheral blood leukocytes of non-obstructive azoospermia patients. *AIMS Genetics*, 2017, 4(4): 202-212.
101. Yapijakis C, Serefoglou Z, Papadimitriou K, et al. (2015) High frequency of TTTY2-like gene-related deletions in patients with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *Andrologia* 47: 536-544.
102. Shaveisi-Zadeh F, Alibakhshi R, Asgari R, et al. (2017) TTY2 genes deletions as genetic risk factor of male infertility. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 63: 57-61.
103. Singh AR, Vrtel R, Vodicka R, Dhaifalah I, Konvalinka D, and Santavy J 2006: A Comparative Study of AZF Deletions and TSPY Gene Variation in Czech and Indian Infertile Men, *Int J Hum Genet*, 6(3): 209-21.
104. Osterlund C, Segersteen E, Arver S, Pousette A 2000: Low number of Y-chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish andrology centre. *Int J Androl.* 23(4):225-9.
105. Okutman-Emonts Ö. 2001: _nfertil Erkeklerde AZF Bölgelerini Kapsayan Y Kromozom Mikrodelesyon Taraması. Y.1. Tezi, Ege Üni. Fen Bil. Enst.
106. Le Bourhis C, Siffroi JP, McElreavey K and Dadoune JP 2000: Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males *Molecular Human Reproduction*, 6(8), 688-693.
107. Katagiri Y, Neri QV, Takeuchi T, Schlegel PN, Megid WA, Kent-First M, Rosenwaks Z Palermo GD 2004: Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children. *Reprod Biomed Online.* 8(3):307-18.

108. Kleiman, S.E., Yogev, L., Gamzu, R., Hauser, R., Botchan, A., Lessing, J.B., Paz, G., Yavetz, H. 1999: Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod* 14: 33-38.





TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÖZGEÇMİŞ

Adı	Mustafa	Soyadı	EKİN
Doğum Yeri	Hani	Doğum Tarihi	04.11.1991
Uyruğu	T.C	Tel
E-posta	mstfekin21@gmail.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans		
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	Malatya İnönü Üniversitesi	2010-2014
Lise	Adana Atatürk Anadolu lisesi	2006-2010

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı		
(Diğer) Puanı			

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
**DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR
NONINTERVENTIONAL STUDIES**

42

KARAR

Doç. Dr. Mahmut BALKAN, Mustafa EKİN, Prof. Dr. Abdullah GEDİK, Yrd. Doç. Dr. İsmail YILDIZ isimli araştırmacılar tarafından planlanan "Non-obstruktif azospermili infertil erkeklerde AZFc ve TTY2 gen ailelerinin mikrolelesyonu" başlıklı araştırmaya *Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u* tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir.

Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.

DECISION

The project titled as "The microdeletions of AZFc ve TTY2 gene families in infertil male with non-obstructive" planned by Mahmut BALKAN, Mustafa EKİN, Abdullah GEDİK, İsmail YILDIZ has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.

Oturum No (Meeting number) : Tarih (Date): 25.01.2018 Saat (Hour): 14:00-15:00

KURUL BAŞKANI (CHIEF) Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM

KURUL ÜYELERİ / MEMBERS

	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA
1	Prof. Dr.	Hüseyin BÜYÜKBAYRAM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Patoloji	
2	Prof. Dr.	Levent ERDİNÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya	
3	Doç. Dr.	Aziz KARABULUT	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Kardiyoloji	
4	Doç. Dr.	İlker KELE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
5	Doç. Dr.	Haktan KARAMAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	
6	Doç. Dr.	Zülfükar YILMAZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları	
7	Doç. Dr.	M. Veysi BAHADIR	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
8	Doç. Dr.	Ezeli AZARKAN	Dicle Üniversitesi Hukuk Fakültesi	Öğretim Üyesi	
9	Yrd. Doç. Dr.	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyostatistik	
10	Yrd. Doç. Dr.	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji	

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüs/DIYARBAKIR
Telefon:+90.412 . 248 80 01-16/4631 Faks:+90.412. 248 84 40 kuruletikdiyar@gmail.com

NONOBSTRUKTİF AZOSPERMİLİ İNFERTİL ERKEKLERDE AZFC VE TTY2 GEN AİLELERİNİN MİKRODELESYONU

ORIJINALLIK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**5**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**7**

YAYINLAR

%**3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
