



T.C.

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI

KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

AZOOSPERMİK VE ŞİDDETLİ OLİGOZOOSPERMİK HASTALARDA Y KROMOZOMU

MİKRODELESYON TESTİNİN KLİNİK ÖNEMİ

ELİF ERARSLAN TOKEL

DANIŞMAN

PROF. DR. İBRAHİM ÇEVİK

İSTANBUL-2019

T.C.

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans
Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 27/06/2019

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İbrahim Çevik

Okan Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İrez

Biruni Üniversitesi

Doç. Dr. Meriç Karacan

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

1.BEYAN.....	II
2.TEŞEKKÜR.....	III
3.ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
4.TABLolar LİSTESİ.....	V
5.SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	VI
6.ÖZET	VII
7.ABSTRACT.....	IX
8.GİRİŞ.....	1
9.MATERYAL VE METOD.....	15
10.İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	19
11.BULGULAR.....	19
12.TARTIŞMA.....	21
13.SONUÇ.....	24

BEYAN

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Azoospermik ve Şiddetli Oligozoospermik Hastalarda Y Kromozomu Mikrodelesyon Testinin Klinik Önemi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof.Dr.İbrahim Çevik’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca benimle ilgilenen, tez çalışmamda değerli bilgi ve görüşlerini paylaşan danışmanım Sayın **Prof.Dr.İbrahim Çevik'e**, tezimde kullanmak üzere başkanı olduğu Şişli Memorial Hastanesi Tüp Bebek Bölümü'ne ait dataları paylaşan, ekibine dahil olduğum için gurur duyduğum Sayın **Prof.Dr.Semra Kahraman'a** , çalışmamda yardımını esirgemeyen Sayın **Doç. Dr. Tayyar Alp Özkan'a** teşekkürlerimi borç bilirim.

Yaşamım boyunca maddi-manevi desteklerini esirgemeyen aileme, yüksek lisans öğrenimim süresince bana güç veren sevgili eşime, meslek hayatımda kazandığım tüm tecrübelerimde etkisi olan, özel hayatıma ışık tutan manevi annem Sayın **Prof.Dr.Nilgün Alptekin Demirkol'a** sonsuz teşekkür ederim.

ŞEKİLLER LİSTESİ

1.Y Kromozomunun yapısı ve gen bölgeleri

2. Y Kromozomunun şematik yapısı

3. Y Kromozomu AZf c bölgesi haritası

4.Testisten sperm eldesi

5. Y kromozom mikrodelyasyon sonuç grafiği

TABLÖLAR LİSTESİ

1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre Semen Parametreleri referans değerler

2. Y kromozomu mikrodelsyon analizinde her bölgeye ait bakılan AZF bölgesi ve bant uzunlukları

3. İstatistiksel bulgular

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AZF : Azoospermia Factor (Azoospermi Faktörü)

FSH : Follicle stimulating hormone, (Folikül Uyarıcı Hormon)

ICSI : Intracytoplasmic Sperm Injection (İnter stoplazmik sperm enjeksiyonu)

LH : Lüteinizan hormon (Lüteinleştirici Hormon)

NOA : Non Obstructive Azoospermia (Non obstrüktif Azoospermi)

T : Testosteron

Mic-TESE : Mikro Testicular Sperm Extraction (Mikro Testiküler Sperm Ekstraksiyonu)

WHO : World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

PARs : Y kromomun psödotozomal bölgeleri

ÖZET

Azoospermik ve Şiddetli Oligozoospermik Hastalarda Y Kromozom Mikrodelesyon Testinin Klinik Önemi

Amaç:Spermatogenezprimordiyalgerm hücrelerinin çeşitli aşamalardan geçerek sperm üretilme sürecidir.Bu süreçte hem kromozomal seviyede meydana gelen sayısal ve yapısal bozukluklar hem de gen düzeyinde oluşan mutasyonlar infertiliteye neden olabilir. Y kromozomu, erkek germ hücrelerinin gelişimi ve devamlılığından sorumlu olduğundan infertilitede temel rol oynar. Bu çalışmada infertil erkeğin değerlendirilmesinde, semen analizi doğrultusunda Y kromozom mikrodelesyon testinin klinik açısından önemi araştırılmıştır.

Materyal-Metod: Bu retrospektif çalışmada 2011-2018 yılları arasında özel bir merkeze başvuran toplam 1606 hastanın (NOA, oligozoospermik ve kriptozoospermik) Y kromozomu mikrodelesyon sonuçları incelenmiştir.Bu çalışmada incelenen sonuçlar PCR ve elektroforez yöntemiyle elde edilmiştir.Y kromozomu mikrodelesyonu için “GML Y ChromosomeMicrodeletion Kit” kullanılmıştır. Y kromozom mikrodelesyon testi çalışılmış hastalar aynı zamanda FSH,LH, Testosteron, hasta yaşı, infertilite tipi , microTESE de sperm eldesi yönünden değerlendirilmiştir.

Bulgular:Dataları incelenen infertil erkekler Y kromozom mikrodelesyonu bulunan hastalar ve Y kromozom mikrodelesyonu bulunmayan hastalar olarak iki grupta değerlendirilmiştir.Y kromozomu mikrodelesyonu bulunan hastalarda mikro TESE

operasyonu yapılan hasta sayısı 26(%46,43); mikroTESE operasyonu sonucunda sperm elde edilemeyen hasta sayısı 13(%21,3) tür.Y kromozom mikrolelesyonu bulunmayan hastalarda mikroTESE operasyonu yapılan hasta sayısı 568(%38,4) ; mikroTESE operasyonu sonucunda sperm elde edilemeyen hasta sayısı 291 dir. İki grup arasında mikroTESE operasyon sonucu sperm elde edilmeme oranları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir(p:0,628). Y kromozom mikrolelesyon tespit edilen 61 hastanın 3'ünde (%4,91) AZFa delesyonu, 2'sinde (%3,27) AZFb delesyonu , 56'sında(%91,8) ise AZFc delesyonu tespit edildi.

Sonuç: İnfertil erkek olguların Y kromozom durumlarının bilinmesi, genetik defekt açısından gereksiz medikal veya cerrahi tedavilerin yapılmasını önleme açısından da aydınlatıcı olacaktır.

ABSTRACT

Clinical Importance of Y Chromosome Microdeletion Test in Azoospermic and Severe Oligozoospermic Patients

Aim: Spermatogenesis is the process of producing sperm through various stages of primordial germ cells. In this process, chromosomal level of numerical and structural disorders or mutations at gene level may cause of infertility. Among them, the Y chromosome is essential because it is responsible for the change and continuity of male germ cells. In this study, the importance of Y chromosome microdeletion test for the evaluation of infertile men was investigated.

Materials and methods: In this retrospective study, the results of the microdeletions of y chromosomes of 1606 patients who applied to a private center between 2011-2018 were examined. The results of this study were obtained by PCR and electrophoresis. "GML Y Chromosome Microdeletion Kit" was used for y chromosome microdeletions. FSH, LH, testosterone, patient age, infertility type, micro TESE were evaluated on the same patients.

Results: The infertile men whose data were analyzed were evaluated in two groups as patients with y chromosome microdeletion and patients without y chromosome microdeletion. Number of patients undergoing TESE operation who with y

chromosome microdeletion 26(46,43%); Number of patients who could not find sperm in TESE operation 13 (21,3%). Number of patients under going micro-TESE operation who without y chromosome microdeletion 568 (38,4%): Number of patients who could not find sperm in TESE operation 291.No significant difference was observed between the two groups in terms of non-sperm retention rates.

Conclusions:Knowing the Y chromosome states of infertile male cases will also be illuminating in terms of preventing unnecessary medical or surgical treatments for genetic defects.

GİRİŞ

İnfertilite; bir çiftin bir yıl boyunca korunmasız , yeterli sayıda cinsel ilişkide bulunmasına rağmen gebelik oluşmamasıdır. İnfertilite primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer infertilite çiftlerin düzenli ilişkilerine rağmen 1 yıl içerisinde hiç gebelik oluşmamasıdır. Sekonder infertilite de ise, çift ilk bebeklerine sahip olmuştur fakat ikinci bebek istekleri gerçekleşmemektedir. %15 oranında çiftlerde infertilite sorunu kendini göstermektedir.¹ Bu oranın %40-50'sini erkeğe ait nedenler oluşturmaktadır. Her iki eş aynı anda muayene edilerek infertilite sınıflandırması yapılmalıdır.

İnfertil erkek değerlendirilirken ne kadar süredir evli oldukları, korunma olmaksızın ne kadar süredir gebe kalınmadığını, öncesinde gebelik elde edilip edilmediğini, daha öncesindeki tedavi süreçleri sorgulanır. Kadının mens dönemi düzeni ,cinsel ilişki sayısı değerlendirilir. Kriptorşidizm (inmemiş testis) ve tedavisi için gerçekleştirilen orşiopeksi operasyonu, fitik ve mesane operasyonları, testisler ile ilgili geçirilmiş herhangi bir travma olup olmadığı yada geçirilmiş operasyonlar öğrenilir. Sistemik hastalıklar (Diabetes Mellitus, Multipl Skleroz) ve tedavisi ile ilgili uygulanmış prosedürler araştırılır. Testis iltihabı , ergenlik çağında geçirilen kabakulak , geçirilmiş ateşli hastalıklar, cinsel yolla edinilmiş hastalıklar, tüberküloz gibi durumlar araştırılır.

Çalıştığı iş sebebiyle kimyasallar, zehirli maddeler, radyasyon, aşırı sıcak veya aşırı soğuk ve toksik ilaçlara maruziyet olup olmadığı sorgulanır. Alkol ve sigara tüketimi spermlerin üretimi ve kalitesini etkilediği için bu konuda sorgulanmalıdır.

Ailesel öykülere bakılacak olduğunda akraba evlilikleri durumu, ailede daha önce infertilite problemi olup olmadığı gibi sorular cevaplanmalıdır.

Fizik muayenede testiste konjenital penilkrvatür, hipospadias varlığına bakılır. Testis boyutu ve kıvamı incelenir. Epididimve spermatik kord elle muayene edilmelidir.

Erkek infertilitesinde tanı koymaya yardımcı olan testler;

1. Semen Analizi (Spermiyogram):

Erkek infertilitesi açısından değerlendirmenin ilk ve en temel basamağı semen analizi testidir. Semen sıvısı, spermatozoanın, testis ve epididim salgılarının (0,1 ml), ejakulasyon sırasında prostat (0,5 ml, asidik), seminal vesiküller (1,5 ml, alkalın) ve bulboüretal bezlerin salgılarının birleşimidir. Bu salgıda spermatozoalar semen sıvısının % 5'ini oluşturur. Semen analizi makroskopik ve mikroskopik olmak üzere iki incelemeden oluşur. Spermiyogram analizi değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010) kriterleri esas alınmaktadır (Tablo-1).

1.1. Semen makroskopik incelenmesi:

Likefaksiyon, görünüm, volüm ve pH yönünden semen örneğı makroskopik olarak değerlendirilir. Semen örneğı verildikten sonra ejakülatın inkübatörde 37⁰ C5-30 dk içinde sıvılaşması beklenir.Semenin koagülasyonunu seminal vezikül, likefaksiyonunu sağlayan faktörler prostat kaynaklıdır. Semen örneğı sıvılaştıktan sonra incelemenin yapılması için uygundur. Renk, koku ve akışkanlık parametreleri

değerlendirilmelidir. Ejakülat volümü 2-8 ml arasında olmalıdır. pH'ın olması gerek aralık 7,2-8,0'dır. Hızlı gelişen bir enfeksiyon durumunda pH 8yukarisına çıkabilmektedir. pH'ın asidik oluşu durumlar semenin prostat sıvısı oranının daha çok olduğunun göstergesidir.

1.2. Semen mikroskopik incelenmesi:

Işık mikroskopuyla ve 10x20 mikroskopik birimde incelenir. Olgun bir sperm baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden ibarettir. Sperm başı uzunluğu 5-6 µm, genişliği ise 2,5-3,5 µm 'dir. Başın önemli kısmı kromatinden oluşup, kromatin yoğunlaşarak hacim olarak küçülür. Çekirdeğin ön kısmında akrozom bulunur. Akrozom; başlık şeklinde ve zar ile çevrili bir organeldir. Kaudalinde de hücre zarı ile çekirdek zarı arasında özelleşmiş postakrozom adı verilen hücre zarına yapışmış bir bant bulunur. Spermin boyun kısmı kısa bir parçadır ve bağlantıyı sağlamaya yönelik segmentli kolonlardan ve proksimal sentriyolden meydana gelir. Orta parça ise, sperm hareketini gerçekleştirmeye yönelik olan, gerekli enerjiyi sağlayan mitokondrileri içerir. Kuyruk kısmı; aksonem tabakasından oluşur. Bu tabaka da sperme diklik verip spermin hareketini sağlayan fibröz bir tabakadır.

1.3. Sperm sayımı (Konsantrasyon) :

Meni örneği sayılması için Neubauer, microcell en sıklıklada makler sayma kamarası kullanılmaktadır. Semen örneği 10 mm derinliğinde birkuyucuğa konulur. Bu kuyucuk spermin tek bir düzlemde serbest hareketini, sperm yoğunluğunun eşitdağılımını ve iki tabaka arasında sperm yoğunluk farkı oluşmamasını sağlar. Yüz

karelik bir alan içinde 10 karelik alandaki sayılan sperm sayısı bir ml'deki sperm sayısını milyon cinsinden verir. Sayımın güvenliği açısından en az dört adet 10'luk kare sayılmalıdır. 100 karelik alan içinde hiç sperm gözlenmediğinde, alan dışındaki kısımlar taranır. Alan dışı kısımlarda tarandıktan sonra hiç sperm bulunmazsa semen örneği santrifüj edilerek pellete bakılması zorunlu prosedördür. Pellete bakılıp sperm bulunmazsa buna " azospermik örnek " denir. Semen analizi yapıldıktan sonra kesin tanı için 15 gün arayla en az 2kere spermiyogram yapılması gerekir.Bu değerlendirme sonucunda sperm konsantrasyonuna göre sınıflama yapılabilir.

Hiç sperm bulunamayan örnekler" Azospermi", sperm sayısı <1milyondan'dan az örnekler "Şiddetli oligospermi", sperm sayısı 15 milyonun altında olan örnekler oligospermi ve sperm sayısı >15 milyon'dan fazla örnekler "normospermi"olarak adlandırılır. Ayrıca kişinin bazı semen örneklerinde 100 binin altında sperm gözlenirken, bazı semen örneklerinde hiç sperme rastlanmaması ise "kriptozoospermi" olarak tanımlanır.

1.4. Azospermi

Ejakülatta hiç sperm bulunmadığında kullanılan terimdir. Erkeklerin %1'inde rastlanırken bu oran infertil erkeklerde %10-15'e çıkmaktadır. Azoospermik erkeklerin değerlendirmesinde öykü alınıp ve fiziki muayeneden sonra hormonal değerlendirme yapılmalıdır. Foliküler Stimülan Hormon (FSH), Lüteinizan Hormon (LH), testosteron, prolaktin (PRL) ve östradiol bakılması gerekir. Serum FSH düzeyi seminifer tübüllerde spermatogenez bütünlüğünü yansıtır. Testiste normal

spermatogenezi olan erkekte FSH düzeyi yüksek olacaktır. FSH düzeyi iki üç kat yüksekse belirli bir düzeyde testiküler yetmezlik bulunur. Düşük FSH ve LH, azalmış serum testosteron düzeyi hipogonadotropik hipogonadizm işaretidir. Bu durumlarda prolaktin hormonu artışıda beklenir. Yapılan testler sperm üretimine dair ve hormonal abnormaliteye ait bilgiler verir.²

2. Genetik Testler;

Şiddetli erkek infertilitesi tanısı (sperm konsantrasyonunun bir mililitrede 5 milyondan düşük olması ya da azospermik olması) konmuş erkeklerin genetik açıdan incelenmesi gerekir.

3. Testis Biyopsisi

Azospermik olgularda, testislerden sperm oluşumunun yapılıp yapılmadığının saptanması için gerçekleştirilir.²

Spermiogramda anormalliklere neden olan genetik faktörleri dört grupta toplayabiliriz;

1. Y kromozomu mikrodelsiyonları
2. Sperm işlevine zarar veren genetiksel rahatsızlıklar
3. Doğumsal duktus agenezisi yapan kistik fibroz (CFTR) gen mutasyonları.
4. Kromozom anomalileri³⁻⁴

1.Y Kromozomu Mikrodelsiyonları

Spermatogenez; testisin seminifer tübüllerindeki germ hücrelerinden haploid spermatozoanın gelişim sürecidir. Bu süreçte gen mutasyonları ve kromozom seviyesinde oluşan sayı ve yapısal anomaliler infertilite sebebidir. Bu mutasyonlar içinde Y kromozomu delesyonu en önemlilerindedir. Erkek germ hücreleri gelişimi ve devamlılığı açısından son derece temel görev yapar.⁵

Y kromozomu bütün genomda %2-3'l k bir kısım teşkil eder. Uzun kol Yq, kısa kol Yp şeklinde isim alır. Y kromozomups dootozomal, heterokromatinve  kromatin bölgelerinden ibarettir. PARs (Ps dootozomal bölgeler) Yp'nin (PAR1) ve Yq'nun (PAR2) u  taraflarında yer alır. Mayotik bölünme sırasında Y kromozom PARs ve X kromozomu PARs ile rekombinasyon ile genetik çeşitlenme meydana gelir. PARs'de mevcut genler otozomal kalıtım gösterirler.⁶

Y kromozomunun büyük bir kısmı (%95) NRY şeklinde isimlendirilen rekombinasyon gerçekleşmeyen heterokromatin ve  kromatin bölgelerinden meydana gelmektedir. Heterokromatin kısım Yq'nun distalindedir. Bu bölgenin çoğunluğunu tekrar dizileri (DYZ1 ve DYZ2) oluşturur ve genetik olarak etkisiz kabul edilir.  kromatin kısım PAR1'in distalindedir. Yp ve Yq'nun PARs kısmı ile sentromer kısmını meydana getirir.^{şekil-2} Cinsiyet tespiti, gonadoblastom ve spermatogeneze ait bütün genler bu kısım da yerleşiktir.⁵ şekil-1⁹

Y kromozomu Mikrodelesyonları ve Oligo-Azospermi

Yp' de (kısa kol) bulunan gen olan SRY testis gelişim rolündedir. Yq daki (uzun kol) genlerde spermatogenezde görevlidir. Tiepolo ve Zuffardi ; 1170 infertil erkeğin karyotip incelemesinde, 6 olguda Yq'nun kayıp olduğunu belirlediler. Kayıp olan bu kısmın erkek infertilitesi açısından önem teşkil ettiğini ifade etmişlerdir.⁷ Altı vakanın ikisinde infertil erkeklerin babalarının Y kromozomlarında delesyon tespit edilmediği ve bu vakalarda delesyonların kalıtsal olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalar ışığında fertilitate gen ve gen bölgelerini azospermi faktörü (AZF) şeklinde isimlendirmişlerdir.

AZF mikrolelesyon görülme oranlarını kıyaslarsak non-obstrüktif azospermide %15, şiddetli oligospermide %5–10'dir. Azospermi faktörü genleri Yq'da AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd kısımlarında bulunur.¹⁰ AZFa, öteki bölgelerden ayrı yerleşiktir.^{Sekil-2} AZFb ve AZFc bölgelerinin dizileri Yq bölgesinde çakışmasına rağmen delesyonlarının sonucu fenotipik olarak farklıdır. Bu kısım AZF b/c şeklinde isim alır. AZFa Yq'nun 11.21 kısmında, interval 5 'te yerleşiktir ve 1–3 Mb arası uzunluktadır. AZFa bölgesinde yer alan genler spermatogenezde etkilidir. AZFa bölgesinin parsiyel delesyonları sonucu hipospermatogenez ortaya çıkar. Seminifer tübüllerde germ yapımı ve olgun hale gelmesinin baskılanmasından ise AZFa komplet delesyonları sorumludur. AZFa bölgesinin komplet delesyonlarında TESE (Testicular Sperm Extraction) operasyonu ile matür sperme ulaşılabildiğini gösteren araştırma literatürde henüz bulunmamaktadır. AZFa delesyonlu olgulardan elde edilen testis biyopsilerinde Sertoli Cell Only (SCO) sendromu görülür.¹⁰⁻¹³

Kent-First 1996'da ⁸ AZFb'nin matürasyon duraklaması, AZFb/AZFa/AZFc ve AZFa-AZFc delesyonlarında SCO ve matürasyon arresti durumlarının çocuklukla izlendiğini ifade etti.

AZFb kısmı Yq'da interval 5-interval 6 arasında bulunur. Bu kısımda az sayıda sıralı gen kopyası ile çok kopyalı gen aileleri bulunur.

AZFb kısmında bulunan genlerden bazıları RNA bağlanma motifi (RBM), Chromodomain Chromodomain Y (CDY), XK Related Y(XKRY), Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 1A (Y-linked, EIF1AY) , Ribozomal protein S4 Y isoform 2(RPS4Y2) ve Selected Mouse cDNA on the Y(SMCY) dir. RBM, SMCY ve XKRY genlerinin Yq bölgesinde pek çok kopyası vardır.¹⁴⁻¹⁵ Sayısı 30 ve yukarı olmak üzere RNA bağlanma motifi ve pseudogenleri Y kromozomda uzun ve kısa koldada bulunur ve RBM-SRGY 4 tekrar kopyasının bulunduğu germ hücre nükleer proteinleri içinde bulundurulur. RBMY1A1 (RNA bağlanma motif protein, Y-linked, family 1, member A1) erkek germ hücrelerinden eksprese olan RBM gen ailesindedir.¹⁶ Bu gen mRNA'nın saklanması, spermatogenez esnasında nükleustan taşınmasıyla alakalıdır. Aynı zamanda, bu gende meydana gelen değişimler AZFb mikrodelsyonu fenotipinde önemlidir.¹⁷ AZFb bölgesi delesyonlarına sahip hastalarda spermatogonyum ve primer spermatositin meydana gelmesi mevcuttur. Fakat mayoz öncesi spermatogenezde duraklamanın oluşması veya SCO sonucu azospermi gözlenir. Bundan dolayı AZFb delesyona sahip olgularda da TESE operasyonu önerilmez.¹⁸ AZFc bölgesindeki delesyonlar tüm AZF kısımları içinde en çok görülen delesyonlardır ve sonucu hipospermatogeneze sebep olmaktadır. AZFc kısmında

görülen delesyonlar azospermik ve şiddetli oligospermik hastalar arasında kıyaslandığında şiddetli oligospermili (konsantrasyon<5 milyon/mL) hastalarda %6 oranındayken, azospermik hastalarda ise %12'dir.¹⁹

AZFc uzun kolun distaline yerleşmiştir ve delesyonları 6C ve 6E subintervalinde oluşur. Bu bölgeye yerleşmiş 8 ayrı gen ailesi ; Deleted in azospermia (DAZ), Testise özgü temel protein Y 2 (BPY2), Testise özgü kromodomain protein Y (CDY), CSPG4LY (Kondroitin sülfat proteoglikan 4-like) chondroitin sulfat proteoglycan 4-benzeri, Y bağlantılı pseudojen 1), GOLGAZLY (Golgi otoantijeni, golgi altaile a2-like,Y bağlantılı pseudojen 1), TTY3.1 (Testise özel transkript, Y bağlantılı pseudojen 3), TTY4.1 ve TTY7.1'dir. Spermatogenezde temel rol oynayan proteinleri kodlayan genler ilk beş tanesidir.²⁰⁻²⁴ Son zamanlard a gerçekleştirilen araştırmalar Y kromozomunun intrakromozomal rekombinasyonlarının sebep olduğu ve gr/gr, b1/b3, b2/b3 şeklinde adlandırılan AZFc'nin alt delesyonlarının bulunduğu gösterilmiştir.²⁴⁻²⁶(Şekil 2)%2.1–%12.5 oranları arasında olmak üzere erkek infertil olgularında en çok gr/gr delesyon çeşidi görülmektedir. Bu delesyon tipinde DAZ (DAZ1/DAZ2) geninin dört kopyasından ikisinin ve BPY2 geninin üç kopyasından birinin kaybı gözlenmektedir. Bu da spermatojenik yetersizliğe sebep olur. B1/b3 ve b2/b3 delesyonlarında ise DAZ geninde iki kopya BPY2 geninden bir ya da iki kopya bulunur.²¹⁻²⁴

Son yıllarda AZFd bölgesi ayrı bir bölge olmak üzere, AZFb-AZFc kısımları arasındaki bölgedeyerleşiktir. AZFd delesyonlu hastalarda hafif oligospermi veya normal sperm sayısına sahip olup, fakat morfolojik bozukluklar gösterebilirler.²⁷

Y kromozomundaki mikrodelsyonların varlığını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testiyle son derece kolay bir şekilde gösterilmesine karşın bu mikrodelsyonların düzeltilmesine ait herhangi bir tedavi henüz yoktur. Y kromozom mikrodelsyonlarının tespiti infertil erkeklerde oligospermi/azospermisebeplerinin veprognozun belirlenmesine olanak sağlar. Ayrıca AZFa ve AZF b mikrodelsyonlu hastaların tespit edilmesi özellikle bu hastalarda TESE ile sperm bulunmasının mümkün olmadığını bilmesi son derece önem teşkil eder.²⁸ Açıklanan tüm sebeplerden ötürü infertil erkeklerde , özellikle sperm konsantrasyonu 5 milyondan az ve ejakülatta hiç sperm bulunmayan hastalarda Y kromozom mikrodelsyon testi yapılmalıdır.

2. Sperm Fonksiyonlarını Bozan Genetik Hastalıklar

2.1.Primer Silier Diskinezi

Silia bulunan hücrelerin mutasyonlarıyla meydana gelir. En iyi bilinen örnekleri Kartagener ve Usher sendromlarıdır. Kartagener sendromu; sinüzit, bronşektazi ve situs inversus triadı ile seyrederek. Sperm konsantrasyonu normal fakat motilite bulunmaz. Döllenme için ICSI yapılması gerekir.²⁹ Kartagener sendromu otozomal resesif geçişlidir. Dynein genindeki delesyon veya mutasyon kaynaklıdır. FISH tekniğiyle saptanır.³⁰ Usher sendromu retinal fotoreseptör ve odyovestibüler organlardaki silier defekt sebebiyle ortaya çıkar. Bu sendromda retinitis pigmentosa ve konjenital bilateral sensorinöral tipte işitme karakterizedir. Sperm motilite azalmasına bağlı olarak infertilite gözlenir.³¹

2.2.Myotonik Distrofi (MD) ve Noonan Sendromu

MD erişkin evrede katarakt , kas kayıpları ve iç salgı sistemi bozuklukları ile karakterizedir. Otozomal dominant geçişlidir. 19. kromozom üzerinde serintreonin kinaz proteinini kodlayan gende meydana gelen hastalıktır. MD'de spermin dölleme yeteğinde bozukluğa ve akrozomda defekte yol açar. Noonan sendromunda da inmemiş testis durumu ile infertiliteye yol açar.³²

2.3.Orak Hücreli Anemi

Hemoglobinopatiler arasında en tipiği ve en çok görülenidir. Kalıtımı otozomal resesiftir. 11. kromozomda yerleşik olan genin, zincirinin 6. pozisyonunda bulunan glutamin aminoasidinin yerine valin aminoasidinin gelmesi ile ortaya çıkar. Testis fonksiyon bozukluğu, hipotalamo-hipofizer bozukluk ve gonadlarda demir birikmesiyle infertilite gelişir.³³

2.4.Genetik Endokrinopatiler

Hipotalamo hipofizer aksı düzenleyen hormonal sistemle birlikte periferdeki reseptör ve buraya etkili nörotransmitterlerde oluşan genetik patolojilere bağlı olarak ortaya çıkar. İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm olarak ifade edilir.

2.4.1.Kalman Sendromu

X'e bağlı kalıtım gösteren , erkek infertilitesinde en sık rastlanan durumdur. Bununla birlikte IHH'in de sebeplerindedir. X kromozomunun uzun koluna yerleşik Kalgeninde mutasyon sonucu oluşur. Hipotalamustan Gonodotropin Salgılatıcı

hormon salınımında bozukluğa yol açar. Kalmann sendromu gecikmiş puberte gösteren azospermik hasta profilinde kendini gösterir. İnfertil hasta hormonal tedaviyle fertil hale gelebilmektedir(hCG ve FSH).³⁴

2.4.2.Prader-Willi Sendromu

Belirgin özellikleri; inmemiş testis, zeka geriliği, IHH ve inmemiş testis durumlarıdır. Babadan gelen (paternal) 15. kromozom uzun kolunda 11 ila 13 segmentler arası bölgede bulunması gereken genetik materyalin yoksunluğu ile oluşur. Aynı kromozomun anneden gelen (maternal) kopyasında Prader-Willi sendromuna neden olan genler baskılanmış olduğundan hastalık dominant geçişlidir. Tedavi FSH ve hCG'nin replasmanı ile yapılır.³⁵

2.4.3. LH ve FSH fonksiyon bozuklukları

Beyindeki hipofiz bezinden FSH ve LH salgınır. FSH sperm oluşumunu aktive eder, LH testosteron hormonunun salgınmasını sağlayarak spermin olgunlaşmasını sağlar. Mutasyon sonucu inaktif LH üretilmesi ile virilizasyon bozuklukları meydana gelir. LH reseptör mutasyonları puberte öncesi prekoksya ve pseudohermafroditizme yol açabilmektedir.

2.4.4. Androjen Sentez ve Fonksiyon Bozuklukları:

Enzimlerde oluşan mutasyon sonucu sentezlediği androjenlerde bozukluk meydana gelmesi infertiliteye neden olur. Testosteron sentezlenmesi için gerekli olan beş enzimden ilk üçünün fonksiyon bozukluğuna sebep olan mutasyonlar

konjenital adrenal hiperplaziye neden olur. LH, FSH, prolaktin ve östrodiol testleri bakılarak erkek infertilitesine sebep olan endokrinopatiler hakkında bilgi sahibi olunur.³⁶

3.Kistik Fibroz ve Duktus Agenezisi Yapan Gen Mutasyonu

CFTR (kistik fibröztransmembran regülatör geni) genindeki mutasyonlarda ortaya çıkan otozomal resesif bir hastalıktır. Bu mutasyon epididimden itibaren spermatik kordon ve seminal veziküllerin oluşumuna engel olur. Spermatik kordon agenezisi görülme oranı azospermili hastalarda %1,4'tür. Bu hastalardada %85 oranında CF gen mutasyonu saptanmıştır.³⁷ Ortaya konan çalışmalarda çok sayıda (>1000) farklı mutasyon ve pek çok farklı biçimde kistik fibrozisli ya da BVDA (bilateral vaz deferens agenezisi) olan hastalar tayin edilmiştir.³⁸ Kistik fibroziste genetik analizler DNA'nın küçük bir miktarı ile PCR tekniği ile yapılır. Kistik fibrozisli çocuğun ailesine prenatal moleküler tanı yöntemleriyle mutasyonel DNA analizleri yapılır.³⁹ Türkiye'de, bilinen 15 mutasyona ilave olarak 3172delAC, P1013L ve M1028I'dan oluşan üç yeni mutasyon saptanmıştır.³⁹ En sık rastlanan mutasyon DF508, CFTR geninde glikolizasyonun değişmesi ve yerleşimindeki hata sonucunda meydana gelir.³⁷ DF508mutasyonu kistik fibrozis hastalarının %50'sinde eşkalıtlıdır.⁴⁰

4.Kromozom Anomalileri

İnsan genomu $2n=46$ kromozom sayısına sahiptir. Bunların 22 çifti otozomal, X ile Y seks kromozomudur. Normal karyotipten herhangi bir sapma, kromozom

anormalliği olarak adlandırılır. Kromozom anomali oranı genelde %0.5; infertilite görülen erkek hastalarda ise %5.8'dir.³⁵ İnfertilite olan erkekte otozomal kromozom anomalileri cinsiyet kromozom anomalilerine göre daha fazla gözlenir. (%4.2'ye karşın %1.5).⁴¹ Kromozomlardaki anomaliler ise yapısal ve sayısal anomaliler olarak 2 şekildedir.

1.Yapısal kromozom anomalileri;

Bir kromozom segmentinin kırılma sonucunda kaybolmasıyla oluşan delesyonlar, homolog iki kromozomdan birinde çift kırık sonucunda kopan kromozom parçasının diğer kromozomda tek kırık sonucu oluşan aralığa giderek yapışması sonucunda meydana gelen duplikasyon, Bir kromozomda iki farklı noktada kırık olması ve sonrasında bu arada kalan parçanın kendi etrafında ters dönerek eski yerine yapışması olan inversiyon, kromozomdan kopan parçanın başka bir kromozoma yerleşmesi durumu translokasyonlardır.

2.Sayısal kromozomal anomalileri;

A) Anoploid:kromozomun ilavesi veya delesyonu olanlar

B) Polipoid: Multiple kopyalarını içerenler şeklinde ayrılırlar.

Sayısal kromozomal anomalileri normal popülasyona göre infertil erkeklerde 8 kat daha fazla rastlanmaktadır.⁴² İnfertil erkeklerde (normal popülasyona göre 30 kat daha fazla) Klinefelter sendromu en çok gözlenen seks kromozom anomalisidir.⁴³ 47 XXY genotipindedir. Bulguları hipogonadotropik hipogonadizm ile benzerlik gösterir. Genelde uzun boylu, göğüslerde jinekomasti denilen büyüme ve testislerin küçük kalması ile karakterizedir. Kesin tanı periferik kandaki lenfositlerden yapılan

kromozom analizi ile konmaktadır. Klinefelter rastlanan erkeklerde germ hücrelerinde aplazi olduğu bilinmektedir. Saf klinefelterlilerde ve mozaik tip periferik karyotipi olanlarda ise seminifer tübüllerde sperm üretimi olabileceği düşünülmektedir. Klinefelter görülen erkeklerde transfer öncesinde embriyoda anöploidi riski olabileceği düşünüldüğünden PGT (genetik tanı) işlemi mutlaka yapılmalıdır.⁴⁴

Mikro-TESE

Mikro-TESE, ejakülatında hiç sperm hücresi bulunmayan hastaların, mikroskop altında yapılan operasyon ile testislerinden alınan dokudan sperm elde edilmesidir. Testisin tek bir kesi ile enine kesi ile tamamen açılır ve dokuda sperm üreten tubul yapıları mikroskop ile 20 kat büyütülerek incelenir. Tubul yapıları normale yakın veya genişlemiş bölgelerden doku örneklerinin alınması şeklinde yapılmaktadır. Dolayısıyla eskiden uygulanan çoklu biyopsi yönteminden başarı şansı daha yüksektir. Daha az testis dokusu kaybı ile daha fazla sayıda sperm elde etme mümkün olmaktadır.⁴⁵(şekil-4)

Çalışmamızda erkek hastalarda önemli oranda infertilite sebebi olan Y kromozom mikrodelesyon testinin önemi , Y kromozom mikrodelesyon tespit edilen hastalarda mic-TESE operasyonu gerekliliği ve başarısı araştırılmış ve Y kromozom mikrodelesyonu bulunmayan hastalarla aynı yönden kıyaslanmıştır.

Materyal ve Metod

Bu retrospektif çalışmada 2011-2018 yılları arasında özel bir merkeze başvuran toplam 1606 infertil hastanın (NOA, oligozoospermik ve kriptozoospermik)

Y kromozomu mikrolelesyon sonuçları incelendi. Tüm vakaların semen analizi sonuçları WHO 2010 kriterlerine göre incelendi. Numune en az iki en fazla yedi günlük cinsel perhizden sonra mastürbasyonla elde edilip , ejakülat spermatozoa için toksik olmadığı doğrulanmış cam veya plastikten temiz ve geniş ağızlı bir kap içine alındı. Toplama kabına ejakülasyonun hemen ardından semen, tipik olarak yarı katı koagüle kitle şeklindeydi. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde genellikle likefiye olmaya (incelmeye) başladı. Örnek likefiye olduktan sonra hacmi ölçüldü. Numuneyi önceden tartılmış, temiz, tek kullanımlık bir kap içine alıp, kap semen ile tartılıp ve kabın ağırlığı çıkartıldı. Numunenin ağırlığından hacmi hesaplandı. Semen hacminin alt referans sınırı WHO 2010 kriterlerine göre 1,5 ml'dir. Semen pH'sı ise pH kağıdı üzerine damlatılan semeni emen bölgenin homojen olarak renklenen bölgesi kalibrasyon şeridi ile karşılaştırıldı. WHO 2010 kriterleri pH alt eşik uzlaşısı değeri 7,2 olarak belirlemiştir. Bu işlemlerden sonra sperm konsantrasyonu belirlendi. Çalışmamızda incelediğimiz semen analizi sperm konsantrasyonları belirlenirken Makler sayma kamarası kullanılmıştır. Öncelikle semen örneği pastör pipeti ile birkaç kez pipetlenerek homojenize olması sağlandı. Mikropipetle 5µl alınarak Makler sayma kamarasına yerleştirildi. Makler yuvarlak kapağı sıkıca kapatıldı. 200 büyütme faz kontrast mikroskopta sperm sayısı yoğunluğuna göre 10 adet karedeki spermler ya da tüm kareli alan, eğer kareli alandaki sperm sayısı 10'dan az ise tüm makler alanındaki spermler değerlendirildi. Bu sayı örnekte, mililitre başına milyon cinsinden sperm sayısını verir. Motilite ve progresyon değerleri için en az 100 sperm veya 5 adet 10 karedeki spermler sayılarak total motilite, progressif motilite, yavaş

progresyon, yerinde hareket ve immotil yüzdeleri hesaplandı. Sperm konsantrasyonu için en düşük referans değer 15×10^6 /ml'dir. Total sperm sayısı ise sperm konsantrasyonunun tüm ejakülat volümüyle çarpılması sonucu hesaplandı ve bunun için en düşük referans değeri 39×10^6 /ml dikkate alındı. Total hareketlilik için en düşük referans değeri %40 iken bu değer progresif hareketlilik için %32'dir. WHO 2010 kriterlerine göre sperm sayısı 15 milyon/ml'nin altında olması durumuna oligospermi , 1 milyon/ml'nin altında bulunmasına ise şiddetli oligospermi , ejakülatta hiç sperm bulunmamasına ise azospermi denmektedir. Çalışmamızda 1606 vakanın semen analizleri bu verilere göre değerlendirilip ; şiddetli oligospermi ve azospermi olarak değerlendirilen infertil erkeklerin Y kromozom mikrolelesyon sonuçları ve micro TESE sonuçları incelendi.

Bu çalışmada incelenen Y kromozom mikrolelesyon verileri GML Y Kromozom Mikrolelesyon Tespit Sistemi v.2.1 ile elde edilmiştir. Bu sistem önceden tanımlanmış ve haritalanmış dizi etiketli yerlere (Sequence-Tagged Sites (STS)) homolog olan 24 primer çiftinden oluşur. Bakılan bu STS ler AZF bölgeleri tablo-2 de gösterilmiştir. Bu sistem, aynı anda AMXY işaretleyici (Chr.X 104bp, Chr.Y 109bp; Xp22.1, Yp11.2) içeren 24'ten fazla STS'nin multipleks amplifikasyonuna ve elektroforezine izin veren otomatik DNA fragmanı analizi için beş-boya floresan sistemi kullanır. Y Kromozom Mikrolelesyon Algılama Kiti, tekrarlanabilirlik ve sağlamlık açısından kapsamlı bir şekilde test edilmiştir ve optimum performans sağlamak için kalite kontrolünden geçirilmiştir. Sistem, amplifikasyon reaktiflerinin performansını sağlamak ve genomik DNA örnekleriyle ilgili problemleri tanımlamak

için kontroller içermektedir. Amplifikasyon reaksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanım için pozitif kontrol Male Genomik DNA eklenmiştir. Pozitif kontrol reaksiyonlarında uygun amplifikasyon ürünlerinin varlığı, reaktiflerin beklendiği gibi performans gösterdiğini gösterir. GML Y Kromozom Mikrodelesyon Algılama Kiti 24 marker ile başarılı sonuçlar verir. Bunlardan 6 markörü (Sy84, Sy86, Sy127, Sy134, Sy254 ve Sy255) Avrupa Moleküler Genetik Kalite Ağı yönergeleri ile belirlenmiştir. Kalan 6 tüm bölgeler için belirteçlerdir ve bu nedenle kontrol belirteçlerine (SRY ve AMXY) ek olarak belirlenmiştir.

Bu sistemde çalışmaya ilk olarak DNA ekstraksiyonu hazırlanarak başlandı. Standart protokollere göre genomik DNA hazırlandı. Konsantrasyonu floresans ile belirlendi. Bunun için gerekli DNA miktarı 10-50 ng / µl'dir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tüpüne 10 µl DNA ile birlikte 10 µl primer mix, 10 µl PCR mix , 10 µl GML taq. Polimeraz eklenir ve reaksiyon başlatıldı. Elektroforez için 16 kapillerli ABI 3130 genetik analizörü kullanıldı. PCR ürünü formaid ve liz size standart eklenerek analizöre yüklendi. DNA konsantrasyonlarına göre markerlerde pik yapma esasına göre sonuçlar yorumlandı. Tepe noktası oluşmayan bölgelerde delesyon var demektir şeklinde yorumlandı (şekil-5).

Y kromozom mikrodelesyon testi çalışılmış hastalar aynı zamanda FSH,LH, Testosteron , hasta yaşı, infertilite tipi , mic-tese de sperm eldesi yönünden değerlendirilmiştir.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerde normal dağılımı dengelemek için Shapiro-Wilk normalite testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistiklerin ifadesinde normal dağılım durumuna göre aritmetik ortalama standart sapma (ss) veya ortanca ve çeyrekler arası açıklık (IQR) kullanıldı. Verilerin normal dağılımı karşıladığı durumlarda, sürekli değişkenler arasındaki ilişkinin istatistiksel değerlendirilmesi için 't testi', normal dağılımı karşılamadığı durumda Wilcoxon Ranksum testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin ifadesinde yüzde dağılım ve kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin istatistiksel değerlendirilmesi için 't testi', normal dağılımı karşılamadığı durumda Wilcoxon Ranksum testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin ifadesinde yüzde dağılım ve kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin istatistiksel değerlendirilmesinde Fisher's exact testi veya ki-kare testi kullanıldı. Yapılan tüm testlerde $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı kabul edildi. Tüm analizler STATA MP Parallel Edition (Statistics/Data Analysis StataCorp Texas USA) sürüm 14.2 istatistik programı ile yapıldı.

BULGULAR:

Çalışmaya dahil edilen 1606 hastanın verileri incelendi. Hastalar Y kromozom mikrodelesyonu bulunan ve Y kromozom mikrodelesyonu bulunmayanlar olarak iki gruba ayrıldı. Çalışmaya katılan tüm hastaların, %82,5'i (n=1606) primer, %16,4'ü üsesekonder infertilite hastası idi. Ortalama infertilite süreleri 5,5 yıl idi. Tüm grupta mic-TESE işlemi ile sperm elde edilememesi oranı %18,9'dur. Y kromozom

mikrodelesyon tespit edilen 61 hastanın 3'ünde (%4,91) AZFa delesyonu, 2'sinde (%3,27) AZFb delesyonu , 56'sında(%91,8) ise AZFc delesyonu tespit edildi.

Y kromozom mikrodelesyonu olan (Y delesyon grubu) hastaların yaş ortalaması 35,3±6,1 ve Y kromozom mikrodelesyonu olmayan (non-Y grubu) hastaların yaş ortalamaları 35,4±6,4 idi. Her iki grup arasında yaş ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur(p=0,91). Y delesyon grubunda primer infertil hasta sayısı 49(80.3) , sekonder infertil hasta sayısı 12(19.7) idi. Non-Y grubunda primer infertil hasta sayısı 1280(83.5) , sekonder infertil hasta sayısı 252(16.5) idi. Her iki grup arasında primer infertilite ve sekonder infertilite oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur(p=0,57). Tüm sonuçlar ve gruplar arası karşılaştırmalar ve p değerleri Tablo-4 te verilmiştir.

Y delesyon grubunda, hastaların 3'ünde (%4,91) AZFa delesyonu tespit edildiği için mic-TESE önerilmedi. Bu gruptaki hastaların %46,43 (n=26)'üne mic-TESE operasyonu yapılmıştır. mic-TESE operasyonu sonucunda sperm elde edilme oranı %50 (n=13) dir. Non Y grubunda mic-TESE operasyonu yapılan hasta oranı %38,4 (n=568) ; mic-TESE operasyonu sonucunda sperm elde edilme oranı %48,7 (n=277). İki grup arasında mic-TESE operasyon sonucu sperm elde edilme oranları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.(p=0,628). Y kromozomu mikrodelesyonu tespit edilen 61 hastanın 22 sine (%61,22) micro-TESE yapılmamış ejakülat alınmıştır.

Y delesyon grubunda total testosteron değerleri ortalaması $4,94\pm3,73$ ng/dL; Non Y delesyon grubunda total testosteron değerleri ortalaması ise $4,92\pm4,55$ ng /dL dir($p=0,59$). Y delesyon grubunda FSH ortalaması $18,69\pm10,48$ mIU/mL ve non y delesyon grubunda ise $17,41\pm14,06$ mIU/mL idi($p=0,956$). Y delesyon grubunda LH ortalaması $8,27\pm5,90$ ve non y delesyon grubunda ise $8,59\pm5,61$ mIU/mL idi ($p=0,552$). Her iki grup arasında ortalama testosteron, FSH, LH değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır.

TARTIŞMA:

İlk kez 1976 yılında Tiepolo ve Zufardi⁷ adlı araştırmacılar genetiksel sebepler ile spermatogenez eksiklikleri ile ilgili çalışma sonuçlarına ulaşmış ve Yq bölgesinde mikrolelesyona sahip 6 hasta belirleyip raporlamışlardır. Aynı araştırmacılar Yq' nun distalinde spermatogenezi kontrol eden azospermi faktörü (AZF) ifade etmişlerdir. Çeşitli çalışmalarda primer setler ile çoğaltılan bölgelerdeki Y kromozom delesyonlarının erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁴⁶⁻⁵⁰ Bu çalışmada infertil erkek hastalarda Y kromozom mikrolelesyonunun önemini araştırmak amacı ile; özel bir merkeze infertilite sebebi ile başvuran 1606 erkek hastanın Y kromozom mikrolelesyon test sonuçlarını çeşitli kriterlere göre inceledik. Y kromozom delesyonu tespit edilen ve delesyon bulunmayan grupların mic-TESE operasyonu ile sperm elde oranları değerlendirilmiştir.

1616 infertil hasta ile yapılan bir çalışmada Y kromozomu mikrolelesyon görülme sıklığı %3,3 olarak bildirilmiştir.⁵¹ Çalışmamızda Y

kromozom mikrolelesyonu %3,7 (n=61/1606) oranında saptanmıştır. Her iki çalışma arasındaki fark; olguların etnik farklılıkları, hasta seçim kriterleri, metodolojik yönler gibi bazı faktörlere bağlı olabilir.

Olgular semen analiz sonuçlarına göre incelendiğinde; sperm konsantrasyonu 5 milyon /mL'nin üstünde olan olgularda delesyon saptanmamıştır. Tanısal aşamada Y kromozom mikrolelesyon olasılığı değerlendirilirken sperm konsantrasyonuna bakmak bu veri doğrultusunda önemli bir kriter olabilir.

2002 yılında yapılan bir çalışmada⁵² azospermik erkeklerde en sık AZFc delesyonu bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda AZFb , AZFa ve AZFa+AZFb delesyonları da saptanmıştır. Ancak oligozoospermiklerde AZFa delesyonu saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer olarak azospermik hastalarda en sık AZFc delesyonu varlığı tespit edilmiştir. Azospermik hastalarda AZFa , AZFb delesyonları da tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da oligozoospermik hastalarda AZFa ve AZFb delesyonuna rastlanmamıştır.

Yapılan birçok çalışmada bugüne kadar komplet AZFa delesyonlarında sperm bulunamamıştır. Çalışmamızda parsiyel AZFa delesyonu tespit edilen 2 hastaya yapılan mic-TESE operasyonunda sperm elde edilememiştir. Parsiyel b delesyonu tespit edilen 1 hastada ise sperm elde edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada Y kromozomu delesyonu olan hastaların FSH , Total testosteron ve LH değerleri , Y kromozom mikrolelesyonu bulunmayan gruba göre anlamlı olarak daha düşük tespit edilmiştir.⁵³ Bizim çalışmamızda ise mikrolelesyon tespit edilen grubun FSH ortalaması 18,69 mIU/mL iken , mikrolelesyon bulunmayan grupta FSH ortalaması 17,41±14,06 mIU/mL olarak hesaplanmıştır. FSH

değeri delesyon tespit edilen grupta daha düşük bulunsada istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. LH ortalaması ise Y delesyon grubunda $8,27\pm 5,90$ mIU/m Liken , non Y grubunda $8,59\pm 5,61$ mIU/mL dir. LH düzeyi delesyon bulunmayan grupta daha yüksek tespit edilsede anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Total testosteron seviyesi Y delesyon grubunda $4,94\pm 3,73$ ng/dL , non y grubunda ise $4,92\pm 4,55$ ng/dL dir. Total testostere açısından iki grup değerlendirildiğinde delesyon olan grupta az da olsa yükseklik gözlensede anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. İnfertil hastalarda Y kromozom mikrolelesyonları ile bu üreme hormonlar seviyeleri arasında bir korelasyon bulunmadığı kanısına varılsa da , korelasyon niteliği açısından daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

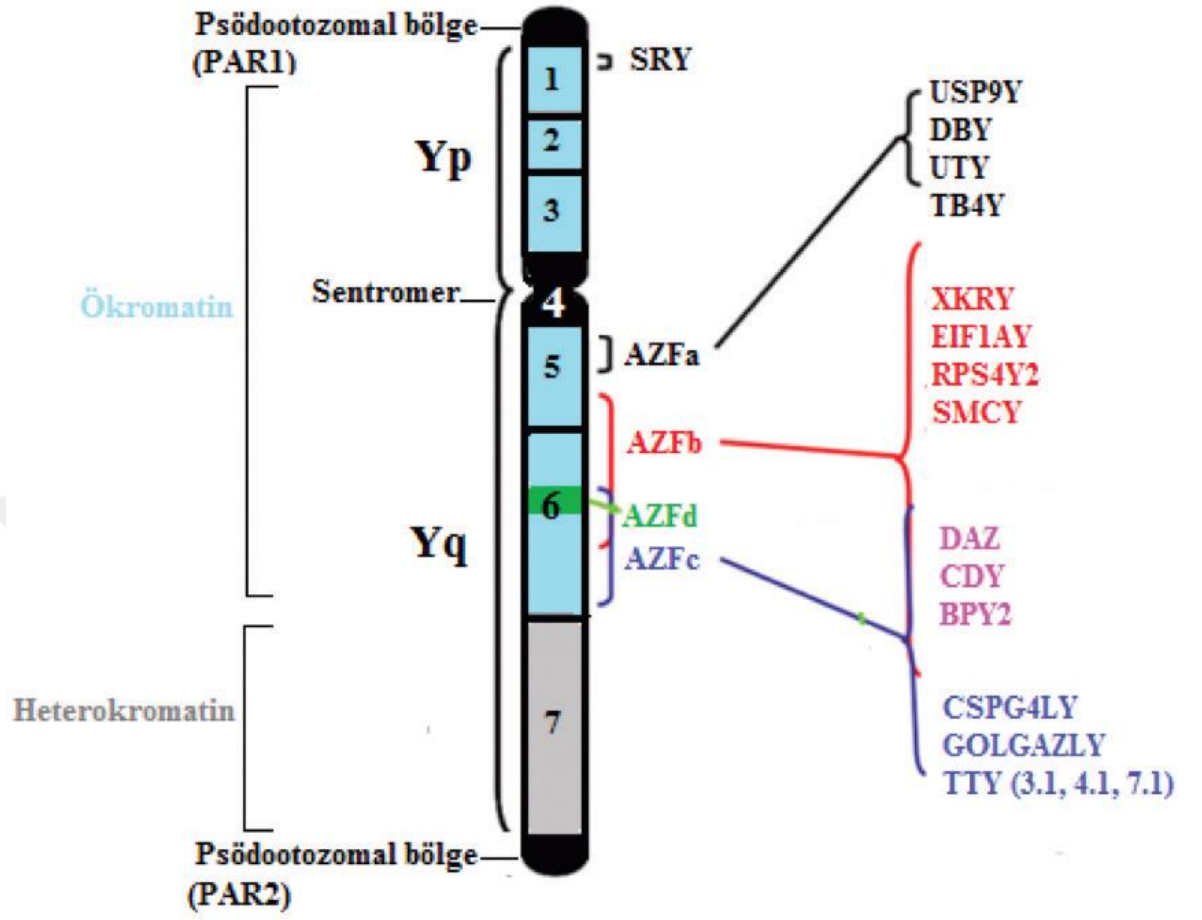
Daha önce yapılmış çalışmalarda Y kromozom mikrolelesyonu bulunan ve delesyon tespit edilmemiş hastaların yaş ortalamaları açısından yapılan bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda Y kromozom mikrolelesyon bulunan hastaların yaş ortalaması(35,4), y kromozom mikrolelesyon tespit edilmeyen hastaların yaş ortalaması(35,3) kıyaslanmış yaşın mikrolelesyon varlığı ile korelasyonu saptanmamıştır.($p=0,91$)

Hastalar mic-TESE sonucunda sperm bulunabilirlikleri açısından incelendiklerinde Y mikrolelesyon analizinde delesyon tespit edilen olgularda sperm bulunabilirlik oranı %50($n=13$) olarak hesaplanırken ; delesyon tespit edilmemiş hastalarda sperm bulunabilirlik oranı %48,7($n=277$) olarak hesaplanmıştır. İki grup arasında mic-TESE sonucu sperm elde edilme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.($p=0,628$).

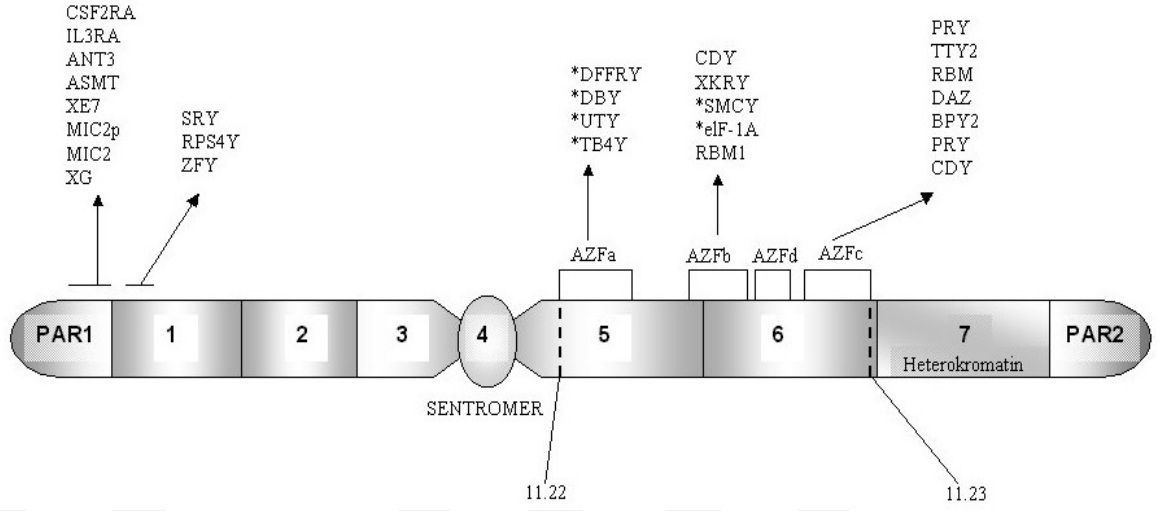
SONUÇ

Erkeklerde infertilite değerlendirilmesi yapılırken; semen analizi sonucuna göre azospermik ve Şiddetli oligozoospermik hastalarda, Y kromozomu mikrolelesyonu araştırılması gereklidir. Hastalarda, bu durum çok az oranda saptanabilmesine rağmen gereksiz gereksiz cerrahi müdahaleyi önleyecektir.

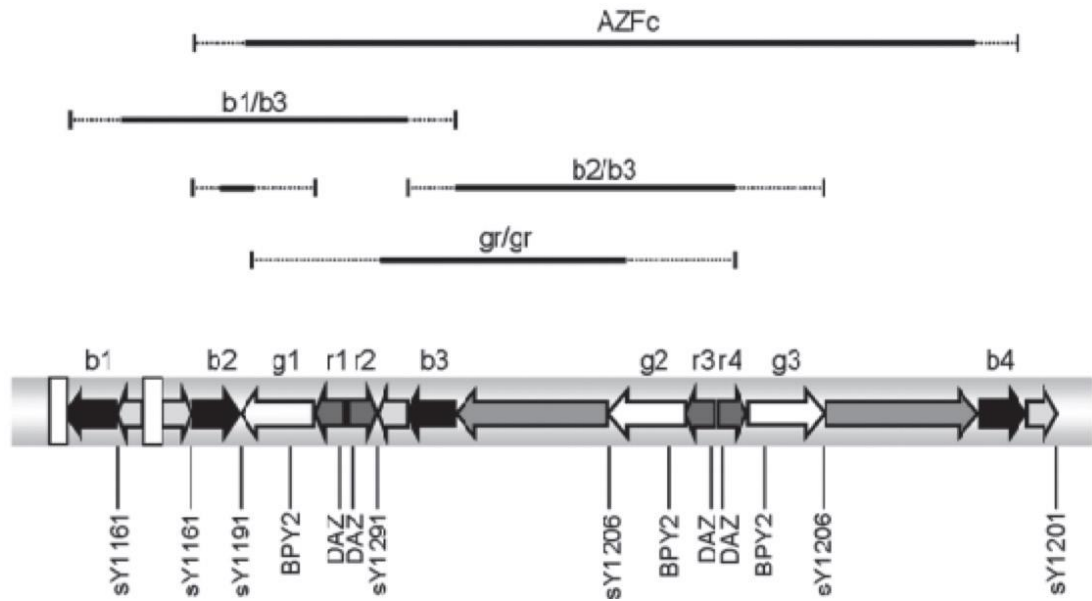
Sperm konsantrasyonu 5 milyon/mL'nin üstünde olan hastalarda delesyon bulunmadığının bilinmesi, hastalara gereksiz genetik test yapılmasını önleyecektir.



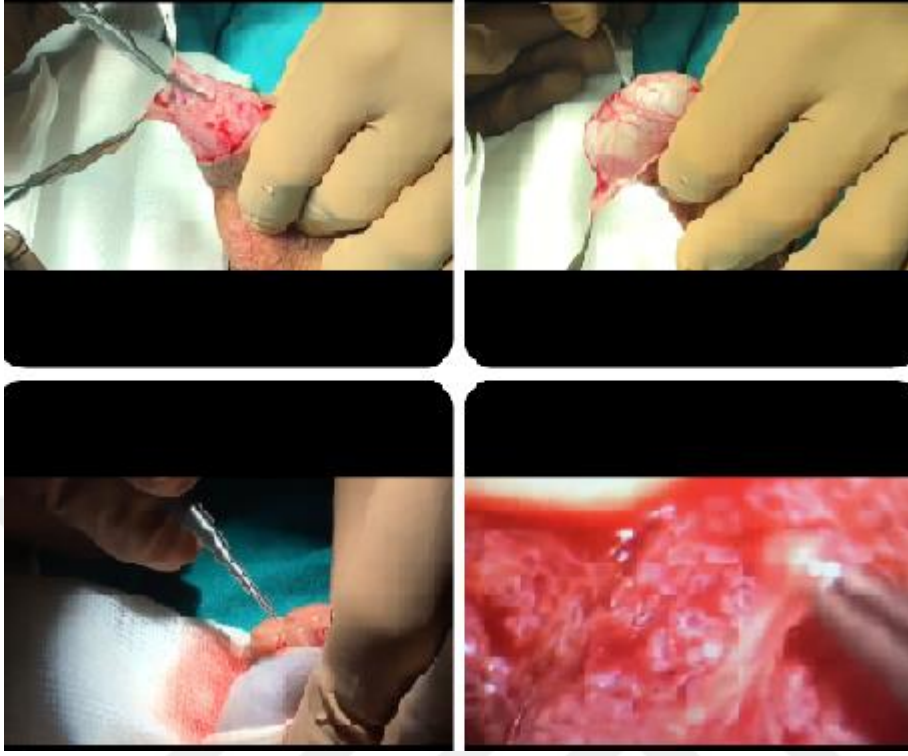
Şekil1. Y kromozomunun yapısı ve gen bölgeleri



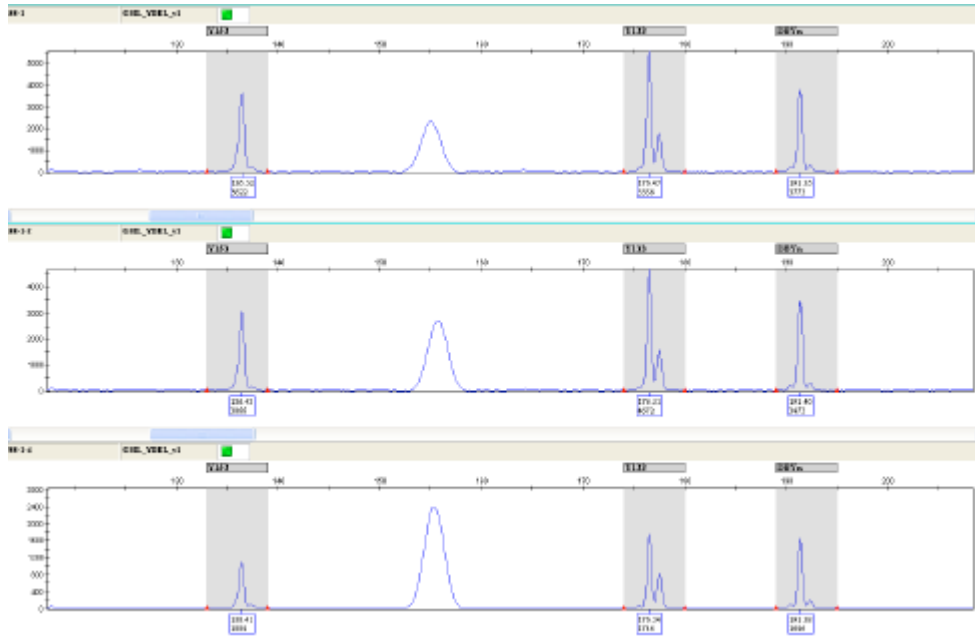
Şekil 2 .Y kromozom Şematik Yapı (*X –homolog genler: PAR1 ve PAR2: Pseudotosomal Bölgeleri göstermektedir. Karyogram incelemesinde GTG bandlamada AZF bölgesi Y11.22-Y11.23 bandları arasında yer almaktadır. Resimde Y kromozomu üzerindeki genlerin bulunukları yerler görülmektedir.⁹⁾



Şekil 3. Y kromozomu AZFc bölgesi haritası (24).



Şekil 4. Testisten sperm eldesi



Şekil 5. Y kromozom mikrolelesyon testi sonuç grafiği

Parametreler	En düşük referans değer
Semen volümü(ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (10 ⁶)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 ³⁶ /ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP.%)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm,%)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar,%)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit(10 ⁶ per ml)	<1
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozisaz (mU/ejakülat)	>20

Tablo 1:Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre Semen Parametreleri referans değerler

	İsim	Bölge	Bant uzunluğu
1	SRY(Y14)	Control	464
2	ZFY (/ZFX)	Control	490
3	AMELY	AMELY	128
4	DAZ (sy255)	DAZ	317
5	RBMV	RBMV	238
6	DBYn	DBY	191
7	AZFa	AZFa(Prox2)	217
8	Usp9y(DFFRY)	AZFa	248
9	Y81	AZFa(start)	207
10	Y121	AZFb	188
11	Y124	AZFb	109
12	Y128	AZFb	227
13	Y130	AZFb	171
14	Y133	AZFb	176
15	Y143	AZFb	315
16	Y152	AZFd	124
17	Y153	AZFd	136
18	Y157	AZFc	291
19	Y182	AZFa	123
20	Y238	Yp	356
21	Sy84	AZFa	329
22	Sy86	AZFa	317
23	Sy117	AZFb	263
24	Sy127	AZFb	271
25	Sy254	AZFc	381

Tablo 2: Y kromozomu mikrodelyasyon analizinde her bölgeye ait bakılan AZF bölgesi ve bant uzunlukları

	Y del (-) (n=1545)	Y Del(+) (n=61)	p
Yaş; mean ± SD	35.3±6.1	35.4±6.4	0.91
İnfertilite tipi n (%)			
Primer, n (%)	1280 (83.5)	49 (80.3)	
Sekonder, n (%)	252 (16.5)	12 (19.7)	0.57
İnfertilite Süresi, median (IQR)	5 (2-9)	6 (2-12)	0.386
Sperm kaynağı, n (%)			
Ejakülat	638 (43.14)	22 (39.29)	N/A
MicroTESE	568 (38.4)	26 (46.43)	N/A
TESA	91 (61.15)	0	N/A
TESA-TESE Çözme	170 (11.49)	6 (10.71)	N/A
EjakülatÇözme	12 (0.81)	2 (3.57)	N/A
Opu iptali , n(%)			
Yok	1254 (81.17)	48 (78.69)	
Var (mic-TESE de sperm yok)	291 (18.83)	13 (21.31)	0.628
Etiyoloji, n(%)			
Erkek Faktör	1016 (68.23)	40(66.67)	
Erkek+Kadın Faktör	473 (31.77)	20 (33.33)	0.798
Testosteron (ng/dL)*, ± SD	4,92±4,55	4,94±3,73	0.59
LH(mIU /mL) ± SD	8,59±5,61	8,27±5,90	0.552
FSH (mIU /mL) ± SD	17,4±14,06	18,69±10,48	0.956
Gebelik başarısı, n(%)			
Başarısız	366 (44.58)	17(54.84)	
Gebe (+)	455(55.42)	14(45.16)	0.26

Tablo 3 : İstatistikselBulgular

KAYNAKLAR

- 1- Mosher WD: Reproductive impairments in the United States, 1965-1982. Demography 22, 415-430, 1985
- 2- Kadioğlu A, ayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi, 2004;232-237.
- 3- M. M. Matzuk, D.J. Lamb, The biology of infertility: research advances and clinical challenges, Nat. Med 2008; 1197–1213.
- 4- A. Massart, W. Lissens, H. Tournaye, K. Stouffs, Genetic causes of spermatogenic failure, Asian J. Androl 2012; 14: 40–48.
- 5- Lahn BT and Page D. Functional coherence of the human Y chromosome. Science 1998; 278: 675–680.
- 6- Seda O, Liska F, Sedova L . Sex Determination. Multimedia E-textbook of Medical Biology, Genetics and Genomics. Czech Republic: Institute of Biology and Medical Genetics of the First Faculty of Medicine of Charles University and the General Teaching Hospital; 2005; 1499-1503.

- 7- Tiepolo L, Zuffardi O: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome. *Hum Genet* 34: 119-124, 1976
- 8- Kent-First M, Kol A, Muallem R: Infertility in intracytoplasmic sperm injection-derived sons. *Lancet*, 348, 332, Aug 1996
- 9- Bogan JS, Page DC: Ovary? Testis? A mammalian dilemma. *Cell*. 25; 76(4): 603-7, 1994
- 10- M. Simoni, E. Bakker, C. Krausz. EAA/EMQN best practice guidelines formolecular diagnosis of y chromosomal microdeletions. State of the art2004. *Int J Androl* 2004; 27: 240–249.
- 11- Vogt, P. H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* 1996; 5: 933–943.
- 12- Krausz, C., Quintana-Murci, L. & McElreavey, K. Prognostic value of Ydeletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosomemicrodeletion analysis? *Human Reproduction* 2000; 15: 1431–1434.
- 13- 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.
- 14- Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology:

- candidates for the azoospermia factor AZF controlling spermatogenesis. *Cell* 1993; 75: 1287–1295.
- 15- Prosser J, Inglis JD, Condie A, Ma K, Kerr S, Thakrar R, Taylor K, Cameron JM, Cooke HJ. Degeneracy in human multi-copy RBM (YRRM), a candidate spermatogenesis gene. *Mammal. Genome* 1996; 7: 835–842.
- 16- Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PT, Vogt PH, Chandley AC and Cooke H. 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: 3848–3853.
- 17- Elliott DJ. RBMY genes and AZFb deletions. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 652–658.
- 18- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M. & Tuttelmann, F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2014; 2: 5–19.
- 19- Foresta, C., Moro, E. & Ferlin, A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr. Rev* 2001; 22: 226–239.
- 20- Vogt PH. AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 319–336.
- 21- Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, Kuroda-Kawaguchi T, de Vries JW, Oates RD, Silber S et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet* 2003; 35: 247–251.

- 22- Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG et al: The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 2001; 29: 279–286.
- 23- Repping S, van Daalen S, Brown L et al: High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat Genet* 2006; 38: 463–467.
- 24- 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.
- 25- Shahid M, Dhillon VS, Khalil HS, Sexana A, Husain SA. Association of Y-chromosome subdeletion gr/gr with the prevalence of Y-chromosome haplogroups in infertile patients. *European Journal of Human Genetics* 2011; 19: 23–29.
- 26- Lu C, Zhang J, Li Y et al: The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1122–1130.
- 27- Lahn BT, Pearson NM and Jegalian K. The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 207–216.
- 28- Aittomaki K, Wennerholm UB, Bergh C, et al. Safety issues in assisted reproduction technology-Should ICSI patients have genetic testing before treatment? A practical proposition to help patient information. *Hum Reprod* 2004; 19: 472–476.

- 29- Rutland J, De long RU. Random ciliary orientation.A cause of respiratory tract disease.; N Engl J Med.1990;323: 1681-87
- 30- Ligh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW et al. Clinical genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/ Kartagener syndrom.; Genet. Med.2009 Jul;11(7):473-487.
- 31- Özdiler E, Aydos K. Klinik Androloji . Ankara,2000;71-101.
- 32- Witchel SF. Nonclassic congenitaladrenal hyperplasia.; Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2012 Jun;19(3):151-158
- 33- Jones KM, Niaz MS, Brooks CM, Roberson SI, Aguinaga MP, Hills ER, Rice VM, Bourne P, Bruce D, Archibong AE.Adverse effects of a clinically relevant dose of hydroxyurea used for the treatment of sickle cell disease on male fertility endpoints.;Int J Environ Res Public Health. 2009 Mar;6(3):1124-1144.
- 34- Bick D,Franco B, sherins RJ, Heye B,Pike L,crawford J. Brief report:intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann’s syndrome.;N Engl J Med. 1992;326:1752-53.
- 35- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempes H, Griffin DK. The genetic basisof infertility.; Reproduction. 2003;126:13-25.
- 36- Elswawi MM, Pryor Jp,Klufio G,Barnes J, Patton MA.Genital tract functionin men with Noonan syndrome.; J Med Genet.1994;31:468-472.
- 37- Bertuzzo CS, Pýnto Jr W. Molecular screening of CFTR gene in Brazilianmen with bilateral agenesis of the vas deferens.; Human Fertil. 2006;9:53-56.

- 38- Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens.; *N Engl J Med.* 1995;332:1475-80.
- 39- Onay T, Topaloğlu O, Zielenski J, et al. Analysis of the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients: identification of three novel mutations (3172delAC, P1013L and M1028I). *Hum Genet.* 1998; 102: 224-230.
- 40- Tolstoi LG, Smith CL. Human genome project and cystic fibrosis-asybiotic relationship. *J Am Diet Assoc.* 1999; 99: 1421-1427.
- 41- Stouffs K, Lissens W. X chromosomal mutations and spermatogenic failure.; *Biochim Biophys Acta.* 2012: 49-52.
- 42- Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki. Genetics of human male infertility.; *S. Singapore Med J.* 2009 Apr; 50(4): 336-347.
- 43- Düzcan F, Atmaca M, Özcan ÇG, Bağcı H. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure.; *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003; 82: 53-56.
- 44- Yamada K, Fujita K, Quan J, Sekine M, Kashima K, Yahata T, Tanaka K. Increased apoptosis of germ cells in patients with AZFc deletions.; *J Assist Reprod Genet.* 2010 Jun;27(6):293-297.
- 45- Takada S, Tsujimura A, Ueda T, Matsuoka Y, Takao T, Miyagawa Y, et al. Androgen decline in patients with nonobstructive azoospermia after microdissection testicular sperm extraction. *Urology* 2008;72:114-118.
- 46- Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W: Defining regions of the Y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth

AZF region (AZFd) by Y chromosome detection system. *Molecular Reproduction and Development*, 53; 27, 1999.

47-Kostiner DR, Turek PJ, Reijo RA: Male infertility: Analysis of the markers and genes on the Y chromosome. *Human Reproduction*, 13: 3032, 1998.

48-Pryor JL, Kent-First M, Muallem A: Prospective analysis of Y chromosome microdeletions in 200 consecutive male infertility patients. *New England Journal of Medicine*, 336; 534, 1997

49-Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetic*, 10; 383, 1995

50-Vollrath D, Foote S, Hiltin A: The human Y chromosome: A 43 interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, 258; 52, 1992.

51- *Türk J Urol* 2018; 44(5): 389-92 • DOI: 10.5152/tud.2018.73669

52-*Türk Üroloji Dergisi*: 28 (1):53-59,2002

53-Brandel RA, Mielnik A, Liotta D et al: AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction. Preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 13, 2812-2815, 1998

54- *J Reprod Infertil*. 2017 Jul-Sep; 18(3): 307–315.