

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ISPARTA VE YÖRESİNDEKİ İNFERTİL ERKEK VAKALARDA
KROMOZOM ANOMALİLERİNİN SİTOGENETİK
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE BULGULARIN FISH
TEKNİĞİ İLE DOĞRULANMASI**

PINAR ASLAN KOŞAR

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
907-D-04 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No:

2008-İSPARTA

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

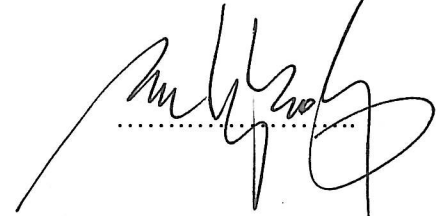
Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 09.05.2008

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Nurten ÖZÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta



Üye : Prof.Dr. Necat İMİRZALIOĞLU
Kocatepe Üniversitesi, Afyon



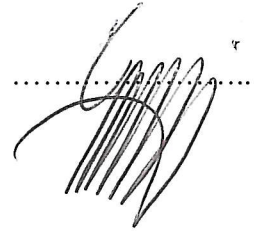
Üye : Doç.Dr. H.Ramazan YILMAZ
Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta



Üye : Yrd.Doç.Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta



Üye : Yrd.Doç.Dr. Mehmet GÜNEY
Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta



ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteği ve yönlendirmeleri ile yanımda olan değerli danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK' e,

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU' na,

Çalışmam sırasında, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulmasında, hastalar ile iletişimin sağlanmasında ayrıca bilimsel yardımları ve yönlendirmeleri ile tezime büyük emek veren, maddi ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan eşim Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Alim KOŞAR' a ve Üroloji Kliniği çalışanlarına,

Araştırmalarım sırasında laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Ankara Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi Doktorları Doç. Dr. Serdar- Dr. Gülay CEYLANER' e ve Uzman Biyolog İpek KESKİN' e,

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Tahsin YAKUT'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve önerileri ile tezime katkıda bulunan Tıbbi Biyoloji Anabilim Öğretim Üyelerine, Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU' na ve asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Mustafa SOYÖZ' e, Arş. Gör. Esin SAKALLI ÇETİN' e, Arş. Gör. Ayşe ALTUNBAŞAK' a ve Arş. Gör. Barış YAŞAR' a,

Çalışmaya mali destek veren Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine (907-D-04) ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Eğitim ve öğretim hayatımda maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen sevgili anne ve babama, hafta sonu çalışmalarım sırasında bana eşlik ve yardım eden kızım Beliz KOŞAR' a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek İnfertilitesi Hakkında Genel Bilgiler.....	3
2.1.1. Azospermi	3
2.1.1.1. Nonobstruktif Azospermi	4
2.1.1.2. Obstruktif Azospermi	4
2.1.2. Gonad Farklılaşması	5
2.1.3. İnsan Eşey Kromozomlarının Tarihçesi.....	5
2.2. Erkek İnfertilitesi İle İlgili Genetik Faktörler.....	6
2.2.1. İzole Spermatogenez Defekti Yapabilen Y-Kromozom Mikrodelesyonları	6
2.2.1.1. İnsan Y Kromozomu ve Yapısı	6
2.2.1.2. Pseudotozomal Bölgeler (PABY1, PABY2)	9
2.2.1.3. İnsan Y Kromozomu Üzerindeki Genler ve Erkek İnfertilitesi	10
2.2.1.4. Testis Belirleyici Faktör (SRY) Bölgesi ve Geni.....	11
2.2.1.5. Azospermi Faktör (AZF) Bölgesi ve Genleri	12
2.2.1.6. DAZ (Deleted in Azoospermia) Gen Grupları	14
2.2.1.7. RBM (RNA Bağlayıcı Motif) Gen Ailesi.....	15
2.2.1.8. Y Kromozomu ile İlgili Anomaliler	15
2.2.1.8.1. XY Gonadal Disgenezi (Swyer Sendromu)	16
2.2.1.8.2. XYY Erkekler.....	16
2.2.1.8.3. Rekürren Spontan Abortus (RSA)	17
2.2.1.8.4. Yqh bölgesi.....	18
2.2.1.8.5. Turner Sendromu (TS)	18
2.2.1.8.6. Aday Turner Sendromu Genleri.....	19

2.2.2. Konjenital Vaz Deferens Agenezi (Yokluğu) Olan Kistik Fibrozis Gen Mutasyonları	20
2.2.2.1. Ekstra Testiküler Duktal ve Ejakülatör Sistem Anomalileri	20
2.2.2.1.1. Kistik Fibrozis	20
2.2.2.1.2. Persistan Müllerian Kanal Sendromu ve Young Sendromu..	21
2.2.3. Testis Fonksiyonlarını Bozan Kromozom Anomalileri	22
2.2.3.1. Kromozom Yapısı Mutasyonları	23
2.2.3.1.1. Delesyon	23
2.2.3.1.2. İnversiyon (Ters Dönme)	23
2.2.3.1.3. Duplikasyon	23
2.2.3.1.4. Translokasyon	24
2.2.3.1.5. Yüzük (Ring) Kromozom	24
2.2.3.2. Kromozom Sayısı Mutasyonları	24
2.2.3.2.1. Öploidi	24
2.2.3.2.2. Anöploidi	24
2.2.3.3. Kromozom Yapı Bozuklukları	25
2.2.3.4. Kromozom Sayı Bozuklukları	25
2.2.3.5. Kromozomal Bozukluklar İçin Test	28
2.2.4. Sperm Fonsiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar .	28
2.2.4.1. Primer Silier Diskinezi (PCD)	28
2.2.4.2. Noonan Sendromu	29
2.2.4.3. Miyotonik Distrofi	29
2.2.4.4. Orak Hücre Anemisi	29
2.2.4.5. Genetik Endokrinopatiler	30
2.2.4.5.1. Gonadotropinler (GnRH)'in Üretim veya Sekresyon Bozuklukları	30
2.2.4.5.2. Kallman Sendromu	30
2.2.4.5.3. Prader-Willi Sendromu	31
3. MATERYAL ve METOD	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Çalışma Grubu	32
3.2. Metod	32

3.2.1. Semen Analizi	32
3.2.2. Hormonal Değerlendirmeler	33
3.2.3. Sitogenetik Değerlendirme	33
3.2.3.1. Kültürlerin Kurulması	33
3.2.3.1.1. Periferik Kan Hücre Kültürü	34
3.2.3.1.1.1. Zenginleştirilmiş Besiyerinin Hazırlanması	34
3.2.3.1.1.2. Ekim İşlemleri	34
3.2.4. Kromozom Eldesi	35
3.2.4.1. Kullanılan Solüsyonlar	35
3.2.4.2. Hücrelerin Elde Edilmesi	35
3.2.5. Giemsa Bantlama Tekniği	36
3.2.5.1. Kullanılan Solüsyonlar	36
3.2.5.2. Preparatların Boyama İşlemleri	37
3.2.6. Dijital Görüntülerin Elde Edilmesi	38
3.2.7. Floresan In-Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi	38
3.2.7.1. Kullanılan Solüsyonlar	38
3.2.7.2. Kullanılan FISH Probenin İçeriği (Cytocell)	39
3.2.7.3. FISH Tekniğinin Uygulanması	39
3.2.8. İstatistiksel Analizler	42
4. BULGULAR	44
4.1. Klinik Bulgular	45
4.2. Hormon Analizi	46
4.3. Sitogenetik Analiz	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	57
6. ÖZET	64
7. SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66

KISALTMALAR

ICSI	: İntrasitoplasmik sperm injeksiyonu
CF	: Kistik fibrozis
CBAVD	: Vaz deferensin konjenital bilateral yokluğu
UVY	: Vaz deferensin konjenital unilateral yokluğu
SRY	: Y kromozomunun seks belirleyicisi bölgesi
AZF	: Azospermi faktörü
RBM	: RNA bağlayıcı motif
TDF	: Testis belirleyici faktör
RSA	: Rekürren spontan abortus
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran taşıma regülatörü
AMH	: Antimüllerian hormonu
FSH	: Folikül stümüle edici hormon
LH	: Luteinize edici hormon
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon analizi
IHH	: İdiopatik hipogonadotropik hipogonadizm
PBS	: Phosphate buffer saline

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnsan Y kromozomu ve haritalanması tamamlanmış olan genlerin lokalizasyonu (Klinik Androloji, E. Özdiler, K. Aydos, 2000).....	8
Şekil 2. Y Kromozomunun yüksek rezolüsyon bandlanması ve haritalanması. En solda Y kromozomunun yüksek rezolüsyon GTG bantlama ile ortaya çıkan görüntüsü yer almaktadır. Ortadaki resimde ise Vergnaud'un 1986'da Southern-blotting yöntemi ile yedi intervale böler.....	9
Şekil 3. Swyer Sendromunun Oluş Mekanizması	17
Şekil 4. A- Klinefelter sendromlu 47,XXY erkek erişkin fenotipi. Kol ve bacak uzunluğu, küçük genitelya, Jinekomasti. B- Germ hücresi içermeyen seminifer tübüllerin görüldüğü testis biopsisi. (Thompson&Thompson, Tıbbi Genetik, 6. baskı, 2005).	27
Şekil 5. 46, XX/ 47, XXY bir olgunun FISH görüntüsü	49
Şekil 6. 46, XX/47, XXY kromozom kuruluşunda infertil olgu	49
Şekil 7. 46, XX/47, XXY mozaik Klinifelter Sendromlu bir nolu vakanın FISH görüntüsü	50
Şekil 8. 46, XX erkeğin FISH fotoğrafları	50
Şekil 9. 46, XX erkeğin FISH fotoğrafları	51
Şekil 10. 46, XX/46, XY/47, XXY/45, X mozaik karyotipinde üç nolu infertil erkek olgunun karyotip örneği	52
Şekil 11. 46, XX/46, XY/47, XXY/45, X mozaik karyotipinde üç nolu infertil erkek olgunun FISH görüntüsü.....	52
Şekil 12. 46,XY/47,XXY infertil olgunun interfaz nukleuslarının FISH görünümü	53
Şekil 13. 46, XY/47, XXY kromozom kuruluşunda infertil olgunun metafaz nukleuslarında uygulanan FISH görüntüsü	54
Şekil 14. 46, XY/47, XXY kromozom kuruluşuna sahip infertil olgunun FISH görünümü	55
Şekil 15. 46, XY normal karyotipli infertil vaka	55
Şekil 16. 46, XY kromozom kuruluşunda infertil erkek karyotipi	56
Şekil 17. 46, XY normal kromozom kuruluşuna sahip infertil erkek hastanın karyotipi.....	56

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Azospermik ve Şiddetli Oligospermik İnfertil Erkeklerdeki Kromozomal.....	22
Tablo 2. Hasta Gruplarının ve Kontrol Grubu Hastalarının Yaş Dağılımları, İnfertilite	44
Tablo 3. Hastaların Sperm Bulgularına Göre Meslek Dağılımları	45
Tablo 4. Hasta Gruplarının Genital Sistemle İlgili Geçirilmiş Hastalık Hikayeleri	45
Tablo 5. Hasta gruplarının ve kontrol grubunun sigara, alkol kullanma sıklıkları.....	46
Tablo 6. Hasta Gruplarının FSH, LH, Testesteron ve Prolaktin Düzeyleri	47

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertiliteye yol açan nedenlerin bir kısmı sonradan oluştuğu halde bir kısmı da genetik bir temele dayanır. Cinsiyet kromozomları (X ve Y) ve otozomal kromozomların her ikisinde de normal cinsiyet karakterlerini belirleyen genetik yapılar bulunmaktadır (1). Bu genlerin lokalizasyonlarında ve yapılarında ortaya çıkan değişiklikler (genetik mutasyonlar) seksüel farklılaşma bozuklukları şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bazı gen mutasyonlarının spermatozoa eksikliği ve azospermiye neden olduğu, bir kısım genetik değişikliklerinde spermatogenez bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir (2). Yapılan bir araştırmada azospermik hastaların %15'inde, oligospermik hastaların %5'inde, normal erkeklerin ise %1'inden daha azında kromozom anormalliği bulunduğu, sperm sayısı arttıkça bu oranın azaldığı ve 20 milyon/ml üzerindeki sayılarda ortalama %1'e düştüğü tespit edilmiştir (3). Azoospermik ve şiddetli oligospermik erkeklerin %10-15'inde aynı zamanda Y kromozom mikroadesyonlarına da rastlandığı bildirilmiştir (3). 2372 infertil erkeğin kromozom analizlerinde, 33'ü cinsiyet kromozomunda, 18'i otozomlarda olmak üzere toplam 51 vakada (%2.1) kromozom düzensizliği bulunmuştur. Bunların yaklaşık yarısını Klinifelter sendromlu vakaların oluşturduğu görülmüştür (4). Bu nedenle azospermisi ya da şiddetli oligospermisi olan erkeklerin, kromozom anomalisi ve Y kromozom mikroadesyonları taşıyabilecekleri konusunda bilgilendirilmeleri gerekir. Bu erkeklerin spermleri intra sitoplazmik sperm injeksiyon (ICSI) tekniğinde kullanılmadan önce karyotip analizi ve Y kromozom mikroadesyonu testleri istenmelidir.

Cinsiyet kromozomunda yer alan gonad belirleyici yapılar gonadların testis ve ovaryum şeklinde gelişmesine yol açmakta, daha sonra salgılanan gonad hormonları genital ve duktal farklılaşmayı sağlamaktadır. Y kromozomunda mayoz bölünme sırasında oluşan defektler cinsiyet kromozomu sayısında anormalliklere, spermatogenez ve fertilité üzerinde belirgin bozukluklara neden olmaktadır (3,4).

Androjen hormonu erkek fenotipik karakterlerinin oluşması ve spermatogenez için kritik öneme sahiptir. Androjen sentezi ve biyolojik etkisi ile

ilişkili çeşitli spesifik gen defektleri ortaya konmuştur. Bazı erkek infertilite vakalarında androjen reseptör genleri ile ilişkili reseptör defektlerinin rol oynadığı ileri sürülmektedir. Ayrıca birçok genetik sendromun, üreme fonksiyonlarını önemli derecede etkilediği bilinmektedir (3,4).

İnfertilite vakalarının en azından yarısında erkek üreme yetmezliği ya da disfonksiyonu tam veya kısmen rol oynamaktadır. Özellikle azospermik hastaların tanısı yapılırken mutlaka genetik hasar açısından değerlendirilmeleri gerekmektedir. Hamileliğin doğal olarak başarılamayacağı çiftlerde günümüzde gelişen intra sitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) gibi yeni teknikler ile sperm faktörüne dayanan infertilitenin üstesinden gelinmektedir. ICSI'den önce her çiftte, mevcut olan genetik hasarın, mevcut infertilitenin ve diğer değişen fenotipik belirtilerin çocuğa geçme riski için bilgi verilmelidir.

Bu çalışmada amacımız, Isparta ve yöresinde yaşayan ve infertilite nedeni ile infertilite polikliniğine başvurmuş azospermik ve şiddetli oligospermik erkeklerin ve aynı yörede yaşayan fertil sağlıklı bireylerin periferik kan lenfositlerinde kromozomal anomali sıklığını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek İnfertilitesi Hakkında Genel Bilgiler

Eşlerin istemelerine ve herhangi bir gebeliği önleyici yöntem kullanmamalarına rağmen en az 1 yıl içerisinde çocuk sahibi olamamalarına primer infertilite denir. Evli çiftlerin yaklaşık %15'i bir yıl beklemlerine rağmen çocuk sahibi olamamaktadırlar (5). Fertilite erkek ve kadın üreme sistemlerinin anatomik ve fonksiyonel olarak normal çalışmalarına bağlıdır. Hem kadında hem erkekte üreme sistemlerini bozan edinsel ve konjenital faktörlere rastlanabilir. Ya kadında ya erkekte, ya da her ikisinde bu faktörlerden biri veya daha fazlası mevcut olabilir. İnfertil olguların %20'sinde erkek tek başına sorumlu iken, %30-40'ında kadın faktörüne eşlik eden bir patoloji bulunmaktadır (5). Erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bozulma ile ortaya çıkar. Normal fertil bir erkekte sperm sayısının mililitrede 20 milyondan fazla olması gerekir. Oligospermi sperm yoğunluğunun 20 milyon/ml'den az olması durumudur. Sperm sayısının 5 milyon/ml'den az olması şiddetli oligospermi olarak adlandırılır. Ejekülatta hiç sperm bulunmamasına azospermi denir.

2.1.1. Azospermi

Semen örneği incelendiğinde sperm içermiyorsa, azospermik olduğu düşünülür; buna rağmen, sperm içermeyen ejakülat mutlaka santrifüj edilmelidir. Seminal sıvı volümü azosperminin etiyolojisini belirlemede önemli bir kriterdir. Total ejakülat sıvısının, yaklaşık %70'ini seminal veziküller, %10'unu vas deferens ve %20'sini prostat oluşturur. Normal semen volümüne sahip azospermili erkeklerde (>1 mL, pH>7.5) en olası etiyoloji spermatogenetik yetmezlik ya da vazal epididimal tıkanmadır. Seminal veziküller normal, ejakülatör kanallar açık ve sağlam ise vazal aplazi patofizyolojisi düşünülmelidir. Semen volümü <1mL ve pH<7.5 ise, ya seminal veziküller ejakülata katılamıyordur ya da yoktur veya hipoplazik ya da tam olarak tıkanmıştır. Bu durum bilateral ejakülatör kanal obstrüksiyonu olarak tanımlanır. Azosperminin ayırıcı tanısı semen volümü ve pH'ya dayanır (6).

Azospermik hastalar iki geniş kategoride sınıflandırılabilir:

- 1- Spermatogenetik yetmezliğe sahip hastalar (nonobstruktif azospermi)
- 2- Bir obstrakte duktal sisteme sahip ama normal spermatogeneze sahip hastalar (obstruktif azospermi) (6).

2.1.1.1. Nonobstruktif Azospermi

Nonobstruktif azospermi, testisteki spermatogenetik potansiyelin spermatozoanın ejakülatta bulunup bulunamayacağını belirleyen belirli bir eşiğin altına düştüğü zaman oluşur. Nonobstruktif azospermili erkeklerin yaklaşık %50'si, testiküler parankima içerisinde bulunan birkaç sperme sahip olabilir. Bu erkeklerin spermatogenezis düzeyleri, ejakülatlarında belirlenebilen sperm üretmeye yetmeyecek kadar düşüktür. Fakat bu spermatogenezis düzeyi ile testis içinde sperm bulunabilir ve bu sperm testis dokusundan çeşitli yöntemler ile toplanabilir. Testis parankiminde bulunan spermlerin izolasyonu ile fertiliteye sahip olamayan erkeklerin ICSI ile çocuk sahibi olabilmeleri başarılabılır. Bir organizmanın yaşamı ve üreme yeteneğinin optimizasyonu evrimsel bir gerçektir ve spermatogenezis sıkı şekilde kontrol edilen kompleks bir olaydır. Üreme yetmezliğine herhangi bir çevresel faktör sebep olmamışsa, böyle vakaların çoğunda üreme yetmezliği genetik bir temelden kaynaklanır (6).

2.1.1.2. Obstruktif Azospermi

Vazal Aplazi Sendromu, azospermiye neden olan en yaygın genetik durumdur. Bilateral ya da unilateral vazal aplaziye neden olan en az 3 ayrı klinik sendrom vardır. Bunlar, kistik fibrozis (CF), vas deferensin konjenital bilateral yokluğu (CBAVD) ve vaz deferensin konjenital unilateral yokluğudur (UVY). Erken embriyogeneziste, primitif ürogenital trakt hem erkeklerde hem kadınlarda benzerdir. Hamileliğin yaklaşık 7. haftasında farklılaşmalar (diferansiyasyon) yani mezonefrik (wolfian) farklılaşırken, paramesonefrik (müllerian) kanalları kaybolmaya başlar. Yedinci haftadan önce mesonefrik kanalı oluşturan hareketler renal sistemin morfogenezi kadar reproduktif kanal sistemini de etkiler, daha sonra oluşan yeni hareketler yalnız bir sistemi etkilerken diğerini etkilemez (6).

2.1.2. Gonad Farklılaşması

İnsanda bulunan 23 çift kromozomun bir çifti cinsiyet kromozomudur (erkekte XY, dişilerde XX). Y kromozomun kısa kolunda (Yp) testis gelişimini sağlayan genler (Y kromozomunun seks belirleyicisi bölgesi; SRY) bulunmaktadır (7). Gonad gelişimi gebeliğin 5.-6. haftalarında gerçekleşir. Bu haftalarda SRY bölgesi normal bir Y kromozomu varlığında primitif gonadın korteks bölgesi geriler, medulla gelişimine devam ederek primitif testis halini alır. Y kromozomu yoksa medulla kısmı gerileyip korteks gelişmesini sürdürerek overler oluşur (1). Yp eksik olan kişilerde dişi yönünde farklılaşma ortaya çıkmaktadır. Ancak SRY'nin lokalizasyonu değişiklikler gösterebilmektedir (7,8,9,10). Testis gelişimi için Y kromozomundaki genlere ilave olarak X kromozomu ve otozomal kromozomlarda ki yapılara da ihtiyaç duyulmaktadır (1). X kromozomunun önemi X'e bağlı XY gonad disgenezilerinde ortaya çıkmaktadır. Otozomal faktörler hem erkek hem de kadında germ hücrelerinde hipoplaziye neden olmaktadır. Farelerde yapılan deneysel araştırmalarda otozomal genlerin testis farklılaşmasında diğer faktörleri bütünleyici bir rol aldığı kesin olarak gösterilmiştir (1).

2.1.3. İnsan Eşey Kromozomlarının Tarihçesi

İnsan eşey kromozomlarının memelilerde ortaya çıkmadan evvel sürüngenlerden 300 milyon yıl önce özdeş bir kromozom çiftinden oluştuğu düşünülür. Bu kromozomlar üzerindeki genler bugün hala bazı sürüngenlerde çevresel uyarılara maruz bırakıldıklarında seks belirleyici olarak görülür (11). Memelilerde seks kromozomları muhtemelen memeli X kromozomu üzerinde de yapısal homoloğu olan SOX3' den SRY geninin farklılaşması ile ortaya çıkar. SRY ve SOX3 bir progenitor genden oluşur. Gelişmiş SRY geni ise erkek belirleyici fonksiyon kazanır (11,12). Memeli X ve Y kromozomunun ayrılması sırasında X kromozomu üzerinde minör değişiklikler oluşurken Y kromozomunda hızlı dejenerasyon oluşmaktadır. İlave olarak Y kromozomunun geniş bir bölümünün ters çevrilmesini (inversiyon) takip eden mutasyonlar X ve daha küçük olan Y kromozomları arasında non-rekombinasyona neden olur. Rekombinasyon yokluğunun Y bağlantılı genlerin parçalanmasından sorumlu

olabileceği düşünülür (11,13). Yq üzerinde P1'den P5'e kadar olan bölgede yer alan palindromik dizilerde meydana gelen delesyonların spermatogenetik yetmezliğe sebep olduğu bulunmuştur. P5/proksimal P1 delesyonları 6.2 Mb dizi ve 32 gen ile transkriptinden fazlasını kapsarken P5/distal P1 delesyonları 7.7 Mb'lık dizi, 42 gen ve transkriptinden fazlasını içermektedir (14,15,16). Bu palindromik dizilerin analizi ile AZFb ve AZFc bölgelerinin birbirinden bağımsız olmayıp hatta **overlap** yaptığı gösterilmiştir. Fakat 0.8 Mb'lık dizi uzunluğundaki AZFa bölgesi AZFb ve AZFc' den bağımsızdır.

2.2. Erkek İnfertilitesi İle İlgili Genetik Faktörler

Erkek infertilitesi ile birlikte görülen genetik bozukluklar, sperm yapımını bozarak ya da sperm taşımasını engelleyerek erkekte infertiliteye neden olurlar. Bu hastalarda ya azospermi ya da şiddetli oligospermi mevcuttur. Erkek infertilitesi ile ilgili dört genetik faktör bilinmektedir:

1--İzole spermatogenez defekti yapabilen Y-kromozom mikrolelesyonları

2-Konjenital vaz deferens agenezi (yokluğu) olan kistik fibrozis gen mutasyonları

3-Testis fonksiyonlarını bozan kromozom anomalileri

4 Sperm fonksiyonlarını direkt olarak etkileyen genetik sendromlar

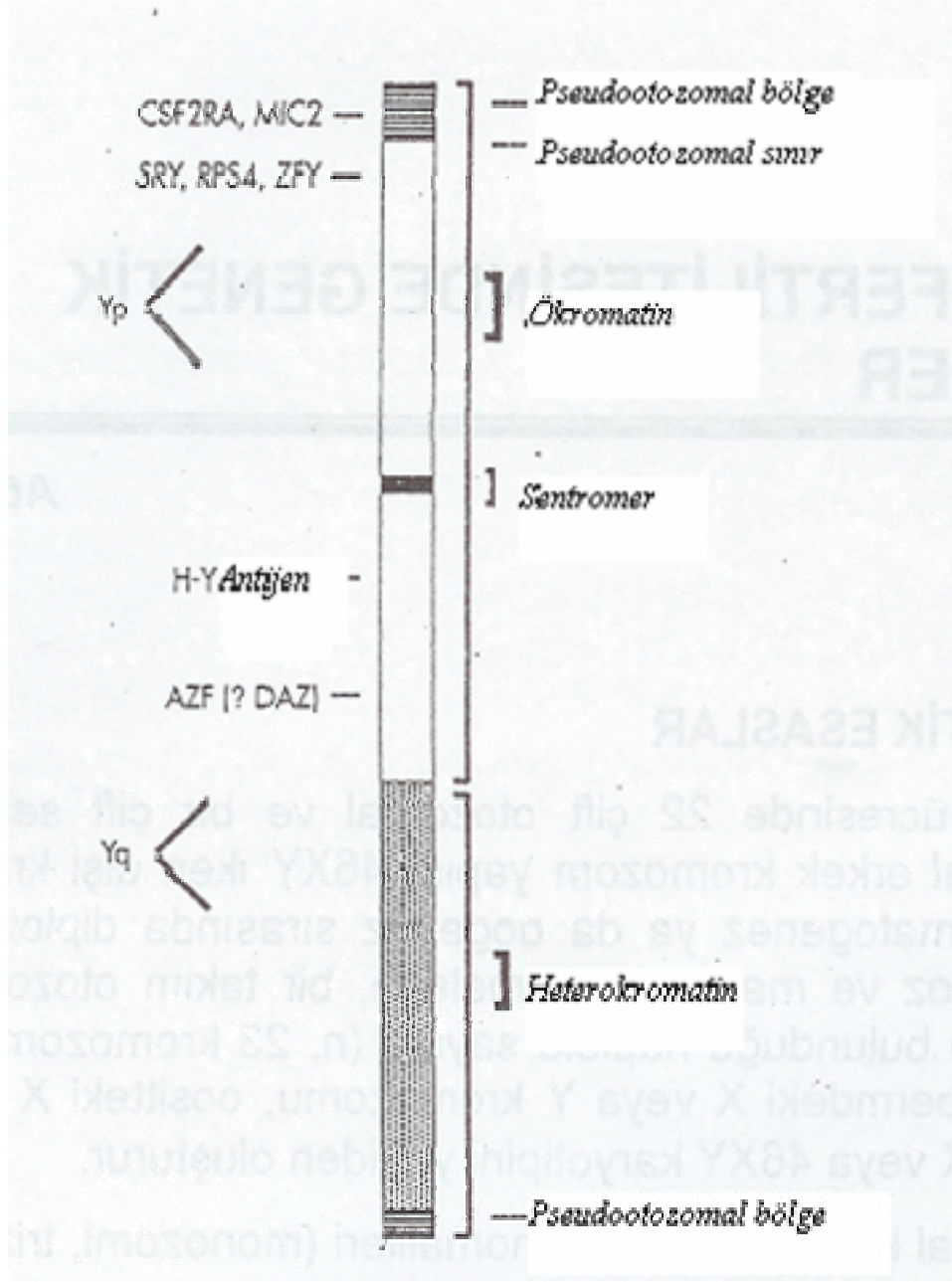
2.2.1. İzole Spermatogenez Defekti Yapabilen Y-Kromozom Mikrolelesyonları

2.2.1.1. İnsan Y Kromozomu ve Yapısı

Y kromozomu testiste gonadal farklılaşma ve spermatogenez için gerekli genleri taşıyan yaklaşık altmış milyon baz çifti içeren, sentromeri uca yakın yani akrosentrik bir kromozomdur. Pek çok ilginç biyolojik özelliğe sahiptir. Erkek karakterinin özelliklerinin genetik belirleyicisi olan Y kromozomu fonksiyonel genlerin yanı sıra yüksek oranda tekrar elementleri içerir. Y kromozomu Yq ve Yp kolları üzerinde iki tane pseudotosomal bölge (PABY1 ve PABY2) içerir (8). Boyanma özelliğine göre ökromatik ve heterokromatik olmak üzere iki bölümde

incelenebilir. Ökromatik bölgenin boyutu hemen her zaman sabit olup otuz milyon baz çifti uzunluğundayken heterokromatik bölgenin boyutu çok değişkendir. Ökromatik bölge kromozomun kısa kolunu (Yp), sentromerik bölgeyi ve uzun kolun (Yq) proksimalini kapsar (Şekil 1).

Ökromatik bölge içeriğinin en azından %25'i X kromozomu ile homologtur. Aynı zamanda mitoz ve mayoz sırasında X-Y eşleşmesi ve crossing-over bu bölgede gerçekleşmektedir. Uç kısımlarda pseudotozomal (PABYI ve PABYII) bölgeler bulunmaktadır ve eşleşme sırasında X kromozomu ile tutunma bu bölgelerde gerçekleşmektedir. Yp'nin 2.7 milyon baz çifti uzunluğundaki pseudotozomal bölümünde haritalandırılmış birçok gen bulunur. Bunlar arasında MIC2 (monoklonal antikolar tarafından belirlenen antijen) geni ve CSF2RA (koloni stimüle edici faktör) genini sayabiliriz ki bu genler Xp üzerindeki genlerle benzerlik gösterirler. Pseudotozomal bölgenin hemen proksimalindeki 280-kb'lık bölgede de üç gen gösterilmiştir. Bu genler SRY (Y kromozomunun seks belirleyicisi bölgesi), ZFY (çinko parmak gen) ve RPS4Y (ribozomal protein geni) genleridir. Ökromatik Yq bölgesinde AZF geni, H-Y antijen geni, vücut yapısı ve diş boyutunu belirlemeye yardım eden genler ve X homolog bölgeler bulunmaktadır. Heterokromatik bölge ise replike olan fakat transkribe olmayan çeşitli uzunluktaki DNA'yı içerir ve uzunluğu bireyler arasında çok farklılık gösterir. Spermatogenezi ve testisi belirleyen genler Y kromozomuna özgüdür. Y kromozomunun uzun kolunun spermatogenez için gerekli olduğunun ortaya konduğu yetmişli yıllardan sonra Y kromozomundaki yapısal değişikliklerin erkek infertilitesinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (9.10).

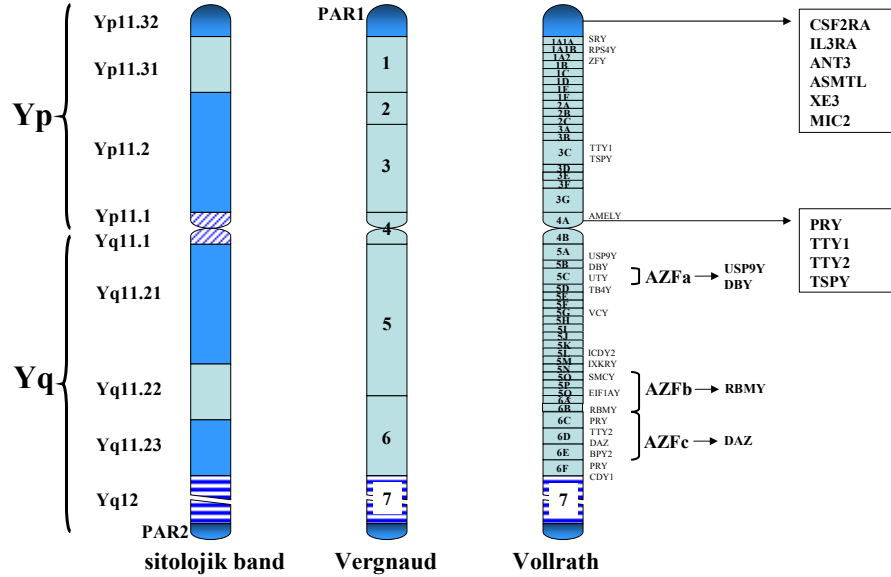


Şekil 1. İnsan Y kromozomu ve haritalanması tamamlanmış olan genlerin lokalizasyonu (Klinik Androloji, E. Özdiler, K. Aydos, 2000).

1994'den beri Yq mikrodelsiyonlarının azospermik ve oligospermik erkeklerde oranlarını tespit etmek ve infertil fenotip ile delesyonun boyut ve pozisyonunu ilişkilendirmek için klinik ve moleküler çalışmalar birlikte yürütülmektedir. Bu bilgilerin edinilmesi, özellikle "sertoli cell-only" sendromlu veya ağır spermatogenez bozukluk gösteren hastaların ICSI yöntemi ile çocuk

sahibi olabilmeleri ve bu genetik hasarı erkek çocuklara geçirme riski açısından önem taşımaktadır.

Y kromozom sitolojik bandları



Şekil 2. Y Kromozomunun yüksek rezolüsyon bandlanması ve haritalanması. En solda Y kromozomunun yüksek rezolüsyon GTG bantlama ile ortaya çıkan görüntüsü yer almaktadır. Ortadaki resimde ise Vergnaud'un 1986'da Southern-blotting yöntemi ile yedi intervale böler

2.2.1.2. Pseudootozomal Bölgeler (PABY1, PABY2)

Pseudootozomal (PABYI ve PABYII) bölgeler Y kromozomunun uç kısımlarında bulunmaktadır ve eşleşme sırasında X kromozomu ile tutunma bu bölgelerde gerçekleşmektedir (Şekil 1). Haritalandırılmış birçok gen, Yp'nin 2.7 milyon baz çifti uzunluğundaki pseudootozomal bölümünde bulunur. PABY1 (pseudootozomal boundry region on Y chromosome) ve PABY2 bölgelerinin X kromozomu üzerinde aynı sırada homologları mevcuttur. Y kromozomu üzerinde sadece bu iki bölge mayotik bölünmeye katılır. Mayotik bölünmeye katılmayan bölge Y kromozomunun %95'ini oluşturur. Bu bölgeler erkeğe spesifik özellikleri belirleyen bölge (MSY) ismini alır. Bu bölgeler üç farklı ökromatik (X transposed, X degeneratif ve amflikonik sekanslar) ve heterokromatik bölgeden oluşur. Pseudootozomal bölgeler toplam 156

transkripsiyon üniti ve 78 proteini kodlayan bir bölgedir. Günümüze kadar bu bölgelerle ilgili 27 ayrı protein tanımlanmıştır (17,18).

2.2.1.3. İnsan Y Kromozomu Üzerindeki Genler ve Erkek İnfertilitesi

Y kromozomu üzerindeki toplam 107 gen sembolü, sitogenetik harita pozisyonu, ilave isimleri ve pek çok karakterize özellikleri ile 2002 yılı aralık ayında listelenmiştir. Ama devam eden çalışmalar bu veri bankasına yeni bilgiler ilave etmeye devam etmektedir. Y kromozomu üzerinde erkek spesifik bölge olarak tarif edilen MSY bölgesi, Y kromozomunun non- rekombine bölgesinin (NRY) %95'ini oluşturur. En az 156 transkripsiyon ünitesini barındırmaktadır. Bu ünitelerin yarısının 78 adet protein kodladığı düşünülür. MSY bölgesinde 27 ayrı protein ya da protein ailesi belirlenmiştir. Bunların 12 adedi her zaman bulunur ve 11 tanesi sadece testiste salınmaktadır (19). İnsan Y kromozomu üzerindeki testis spesifik genlerin çoğunluğu ilginç bir şekilde birden (*TGIF2LY=TGFB* linked Y), ikiye (*VCK, XKRY, HSFY, PRY*), üçe (*BPY2*), dörde (*CDY= chromodomain region on Y chromosome, DAZ= deleted on Y chromosome*), altıya (*RBMY= RNA binding motif protein on Y chromosome*) hatta otuzbeşe (*TSPY= testis spesifik protein, Y- linked*) kadar değişen pek çok kopyaya sahiptir. Bu genler AZF faktörleri kuşatan proksimal ve distal palindromik komplekslere yerleşmiştir ve spermatogenetik yetmezliğe neden olan silinme gösterirler (19). Toplam 23 testis spesifik transkripti (*TTY1-23*) tanımlanmıştır. Bunlardan 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 14 nolu palindromik komplekslerin silinmesi spermatogenetik yetmezlikli hastalarda tanımlanmıştır. Ancak yeni çalışmalar, *TTY4*'ün testis ve prostattan, *TTY10*' nun testis, prostat ve fetal beyinden salgılandığını, *TTY1, 2, 6, 7, 8, 18, 19, 21, 22* nolu transkriptlerinin ise noncoding olduğunu bildirmektedir (19,14). Görüldüğü gibi testis spesifik olduğu düşünülen transkriptlerin bazıları fertilitenin regülasyonundan başka, daha geniş biyolojik aktivite göstererek diğer somatik dokularda da kopya edilirken diğerlerinin görünen biyolojik bir aktivitesi yoktur. Bu genlerden özellikle erkek infertilitesi ile ilişkili olanları burada sırayla araştırılmıştır.

2.2.1.4. Testis Belirleyici Faktör (SRY) Bölgesi ve Geni

Testis gelişimini belirleyen faktör ya da faktörlerin araştırılması sırasında birçok gen incelenmiştir. Bunlar arasında H-Y antijeni ve ZFY geni de vardır. Ancak bugün için bu faktörlerin testis belirlenmesinde rolleri olmadığı kabul edilmiştir. Bipotansiyel gonadın testis yönüne farklılaşması için gerekli gen, “Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesindeki SRY genidir (10,20) (Resim 1). Bu gen farklılaşma için gerekli olmakla beraber yeterli değildir.

Yp 11.3 bandında tanımlanan ve intronsuz olan SRY'nin tek ekzonunun oluşturduğu 1.1 kb boyutundaki transkriplerin ürettiği proteinler, 204 aminoasit uzunluğundadır. HMG-BOX (High mobility group) homolog dizi içerir. HMG-BOX ileri düzeyde korunan 79 aminoasitlik DNA bağlayıcı bir motiftir. DNA'nın kıvrılmasına yardımcı olarak, hedef genin aktivasyonu veya baskılanmasını ve gendeki transkripsiyonun hızlanması veya yavaşlamasını sağlar.

46, XY kadınlarda yapılan çalışmalarda X kromozomunun kısa kolu üzerinde (xp21.2 – p22.11) SRVX (X – linked sex reversed locus: cinsiyet dönüştürücü gen) adlı bir gen haritalanmıştır. Ogata ve Matsuo SRY geni ile SRVX ve testis oluşturan otozomal genlerin ilişkisi hakkında bir hipotez öne sürmüşlerdir. Buna göre SRY, SRVX'i baskılamak üzere işlev görmekte, SRVX ise otozomal genlerin baskılanmasında rol oynamaktadır. 46 XY dişilere seks reserved dişiler denir ve bu dişilerde yetersiz SRY veya SRY yokluğu bulunmaktadır (21). XY seks reserved dişilerde SRVX duplikasyonundan bahsedilmektedir (22).

Normal 46, XY erkekler ve bir kısım 47, XXY Klinefelter erkeklerde SRY geni, SRVX'in aktif tek kopyasını baskılayabilir. Böylece serbest kalan otozomal lokus testis formasyonunu gerçekleştirebilir. 46, XX dişilerde SRVX aktiftir ve otozomal genleri baskılayarak, bipotansiyel gonadın over yönünde farklılaşmasını sağlar. Eğer SRVX iki kopya halinde ise ve aktif durumdaysa SRY geni SRVX'in fonksiyonlarını yeterince azaltmayacak ve testis oluşumu engellenecektir. Bu model gonadal farklılaşmada X ve Y kromozomları ile otozomal genlerin birlikte çalıştığını açıklamaktadır.

2.2.1.5. Azospermi Faktör (AZF) Bölgesi ve Genleri

DNA hibridizasyon yöntemi ile Y kromozomunun bir delesyon haritası çıkarılmıştır. Bu haritada pseudotozomal bölgeler hariç olmak üzere birden dörde kadar olan bölgeler kısa kol ve sentromeri, beşden yediye kadar olan bölgeler ise uzun kolu kapsayacak şekilde 7 ayrı bölge tarif edilmiştir (Şekil 2). Şekil 2'de bu bölgeler ve AZF gen lokusu gösterilmektedir.

İlk kez 1976'da Tiepolo ve Zufuardi, 1170 infertil erkek üzerinde yaptıkları çalışmada Y kromozomunun üzerinde spermatogenezden sorumlu bir bölgenin varlığına işaret etmişler ve karyotip analizleri sonucunda 6 hastada Y kromozomunun uzun kolunun delesyona uğradığını gözlemiş ve bu bölgeyi de Azospermi Faktörü (AZF) olarak adlandırmışlardır (20). İnfertil erkekler üzerinde daha sonra yapılan sitogenetik çalışmalarda insitu hibridizasyon bantlama yöntemleri ile sık delesyona uğrayan bölgenin Y kromozomunun uzun kolu olduğu gözlenmiş ve bu bölge AZF olarak adlandırılmıştır. İnfertil erkekler üzerinde daha sonra yapılan sitogenetik çalışmalarda insitu hibridizasyon bantlama yöntemleri ile sık delesyona uğrayan bölgenin Y kromozomunun uzun kolunun distal bölgesi (Yq11) olduğu gösterilmiştir (20). İnfertil erkekler arasında Y kromozomu mikrolelesyonlarının prevalansı ortalama %7'dir. Son çalışmalarda Y-mikrolelesyonuna sahip erkeklerin spermini kullanarak ICSI ile hamileliklerin başarıldığı bildirilmektedir (23).

İnfertil erkeklerde yapılan Y kromozomu moleküler analizlerinde, 1'den 5'e kadar olan bölgede herhangi bir delesyon bulunamamış ve rastlanılan tüm delesyonların 6. bölgede olduğu saptanmıştır. 1992'de Vogt, 19 infertil erkeğin ikisinde, 6. bölgede delesyon saptamış ve bu delesyonlardan birinin Yq 11.22'nin distalinde, diğerinin ise Yq11.23'ün distalinde olduklarını göstermiş ve sonuç olarak bu bölgede azospermiden sorumlu en az iki genin olması gerektiği kanısına varılmıştır (24).

Bugün Y kromozomu uzun kolu üzerinde spermatogenezin farklı aşamalarında etkili olan AZF a, AZF b ve AZF c olmak üzere en az 3 bölgenin varlığı bilinmektedir. İnfertilite sebebi açıklanamayan erkeklerde, bu bölgelerin

delesyona uğramış olduğu görülmüştür (25). AZFa bölgesi aynı zamanda **Jolar Bölgesi** olarak da adlandırılır (Şekil 2).

Testise spesifik ekspresyon gösteren her üç gen bölgesinin hem testiküler histoloji ile ilgili olduğu hem de spermatogenezin evrelerine etki ettiği gösterilmiştir. AZFa bölgesinde X kromozomu üzerinde homologları bulunan ve vücutta yaygın olarak ekspresse edilen *DDFRY*, *DBY*, *UTY*, *TBY* genleri bulunurken, AZFc bölgesinde *DAZ*, *CDY*, *SPGY*, *BPYz* ve *PRY* genleri haritalanmıştır.

AZFb'de ise RNA binding motif kodlayan gen olarak adlandırılan *RBM* gen ailesi bulunur ki bu bölgeye ayrıca *YRRM* (Y spesifik RNA recognition motif) de denilmektedir. AZFb'de bulunan *RBM* genleri ve AZFc'de bulunan *DAZ* genleri testise spesifik ekspresyon göstermekte ve her ikisi de RNA – binding motif içeren birer proteini kodlamaktadır. Bu genlerin yapı ve fonksiyonları tam anlamıyla bilinmemekle beraber her ikisinin de spermatogenez esnasında spermin matürasyonundan sorumlu oldukları sanılmaktadır.

Kent ve First'ün 1996'da yaptıkları çalışmada AZFb ve AZFc arası delesyonlara daha sık rastlandığını, AZFb'nin delesyonlarının matürasyon arrestine ve AZFa, AZFb ve AZFc'nin delesyonlarında Sertoli Cell Only sendromuna neden olduğu bildirilmektedir (26).

AZFa delesyonları, sertoli cell only sendromu ile, AZFb delesyonları, pakiten spermatosit evresindeki spermatogenez arresti ile, AZFc delesyonları ise spermatid evresindeki spermatogenez arresti ile birlikte gözlenmiştir.

İnfertil erkeklerdeki Y kromozom delesyonlarının, en yaygın olarak, 3. bölge yani AZFc'de olduğu gösterilmiştir. Reijo ve arkadaşları 89 erkek ile çalışmış ve bunların %13'ünün AZFc bölgesinin tüm uzunluğu boyunca Y kromozomunun mikrodelsyonlarına sahip olduklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda şiddetli oligospermik erkeklerin %6'sının da AZFc'nin delesyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir (14).

AZFc bölgesinde delesyon var ise hastaların şiddetli oligospermiye ya da testiküler dokuda hiç spermin saptanamadığı azospermiye sahip olma ihtimalleri yüksektir.

2.2.1.6. DAZ (Deleted in Azoospermia) Gen Grupları

Bu gen grupları Y kromozomunun 6. bölgesindeki AZFc'nin distalinde yer alırlar ve ardışık tekrarlanan 24 aminoasitlik 7-11 kopyadan oluşan bir proteini kodlarlar (Şekil 2). DAZ geni 10 exon içerir ve spermatozoada ifade edilir. DAZ geni en erken germ hücrelerinin spermatogonial çizgi boyunca farklılaşmasına yardım eder ya da onların farklılanıp farklılanmayacağını ya da yenilenip yenilenmeyeceklerini belirler.

DAZ genlerinin özellikle spermatogonia ve spermatozoidlerde transkribe olduğu gösterilmiştir. DAZ geninin tüm kopyaları AZFc bölgesinde bulunduğu için, bu bölgenin delesyonu tüm kopyalarının kaybına neden olabilmektedir. Y kromozomu üzerinde dağınık olarak bulunan ve çok sayıda fonksiyonel kopyası olan genlerin bir veya bir kaçının delesyonu fenotipte ortaya çıkmayabilir. DAZ geninin tüm kopyalarının kaybı, ağır klinik belirtilerle ortaya çıkabilir. Farelerin Y kromozomu üzerindeki AZF bölgesinde DAZ veya DAZ benzeri bir gene rastlanmamıştır. 17. kromozomun uzun kolu üzerinde DAZ'a benzer DAZL genine rastlanmıştır. Fakat bu DAZL geni DAZ'ın aksine bir tek DAZ kopyasından oluşmaktadır. İnsanda DAZL'a benzer bir gen dizisi 3. otozomal kromozomun kısa kolunun 3p24 bölgesinde bulunmuş ve DAZLA (DAZ like Autozomal) olarak adlandırılmıştır. Yapı olarak tek DAZ kopyasından oluşur. DAZL ve DAZLA, RNA binding motif içeren bir proteini kodlamaktadır. DAZLA'nın otozomal resesif erkek infertilitesinin bazı ailesel olgularından sorumlu olduğu düşünülmektedir.

DAZ geninin testise spesifik ekspresyon gösterdiği, insanda DAZ proteininin sperm kuyruğunda toplandığı ve immatür germ hücre popülasyonunda da böyle bir proteinin bulunduğu gösterilmiştir (5).

2.2.1.7. RBM (RNA Bağlayıcı Motif) Gen Ailesi

Y kromozomunun uzun ve kısa kolu üzerinde yayılmış olarak bulunan 20-40 kopyadan oluşmuş bir gen ailesi olan *RBM*, 32 aminoasitlik bir proteini kodlar. *RBM 1* ve *RBM 2* olmak üzere 2 gen ailesinden oluşur. *RBM 1* gen ailesi Yq 11.23'te kümelenir ve 15 kopyadan oluşur. AZFb bölgesinde *RBM* gen ailesinin en azından bir fonksiyonel kopyasının bulunduğu gösterilmiştir. AZFb delesyonlu erkeklerde *RBM 1* gen kaybının kesin olarak infertiliteye neden olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Japon infertil erkekler üzerinde yapılan moleküler analizler sonrasında *RBM2* geninin polimorfik olduğu gösterilmiş ve bu genin infertil erkeklerin babalarında da delesyona uğramış olduğu saptanmıştır. Bu durum oğuldaki infertilitenin *RBM2* gen delesyonuna bağlı olmadığını göstermiştir (27).

Özetlenecek olursa Y kromozomunun diğer bölgeleri korunmuş olmakla birlikte DAZ bölgesinin korunmadığı ve bu bölgede delesyonlara sıkça rastlandığı dikkat çekmektedir. *RBM 2* geninin infertil erkeklerde delesyona uğradığı gösterilmekle birlikte babalarında da aynı delesyona rastlanması bunun infertiliteye yol açan bir mutasyondan çok fenotipe yansımayan bir polimorfizm olduğunu düşündürmektedir (28).

Bazı infertil erkeklerde *RBM 1* geni delesyonu gösterilmiş olsa da DAZ bölgesinin bu tür hastalarda daha büyük sıklıkla delesyona uğradığının gösterilmesi ve aynı zamanda sağlıklı fertil erkeklerde de *RBM 1* geni delesyonuna rastlanmış olması, AZF'ye en güçlü aday genin AZFc bölgesindeki DAZ geni olduğunu ortaya koymaktadır.

2.2.1.8. Y Kromozomu ile İlgili Anomaliler

Y kromozomu; XY gonadal disgenezi, XYY erkekler, rekürren spontan abortuslar (RSA), Turner sendromu gibi seks kromozom anomalilerinde rol oynamaktadır. Buna rağmen bu anomalilerde Y kromozom bağlantılı genlerdeki değişiklikler ve düzenleyici diziler hala açıklanamamıştır.

2.2.1.8.1. XY Gonadal Disgenezi (Swyer Sendromu)

Fenotipik olarak kadın görüntüsüne sahiptirler. XY gonadal disgenezili kadınlar doğumda normaldirler. Puberte ile gelişmemiş çizgi (strik) şeklinde kalıntı gonadlar belirir. Menstruasyon olmazlar. Sekonder seks karakterleri yoktur. Hastalar fenotipik olarak normal yapıdadır. XY gonadal disgenezili kadınlar normal kadınlardan daha uzundur. Bu durum kalıntı halinde bulunan gonadlardan androjen salınımı ile açıklanabilir. Turner sendromunun somatik bulgularına sahip değildirler. Bazı vakalarda kliteromegali vardır.

Swyer sendromunun üç formu gözlenmektedir.

1- STAS Formu: H-Y negatif kişilerde saptanan sporadik testiküler agenezi formudur.

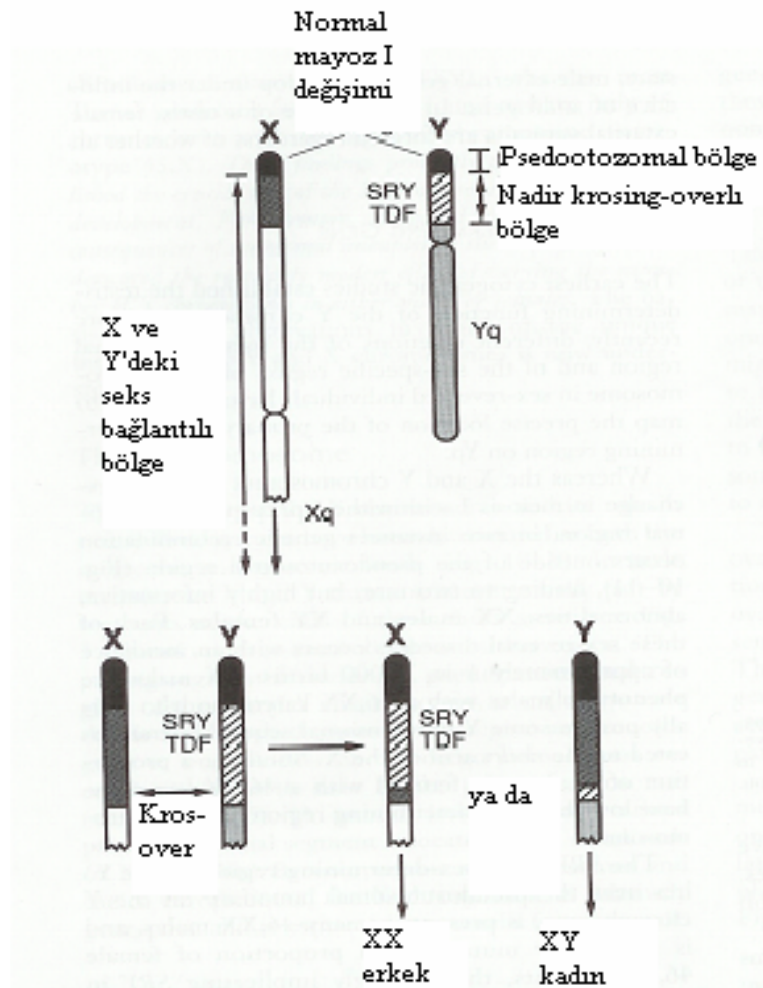
2- FTAS Formu: Familial testiküler agenezi sendromudur. X'e bağlı resesif pedigree gösterirler.

3- FTDS Formu: Ailesel testiküler disgenezi sendromudur. Hastalar H-Y pozitif olmalarına rağmen kadın fenotipi gösterirler. Ayrıca testis benzeri tümoral yapılar içerebilen strik gonadlara sahiptirler. Mutasyon STAS'ta Y kromozomunda, FTAS'ta ise X kromozomunda olmasına rağmen her ikisinde de fenotip aynıdır. Yapılan bir çalışmada iki vakada Y kromozomunun p kolunda küçük delesyonlar bildirilmiş ve vakaların 46 XY kadın karyotipine sahiptirler. Bu iki vakada lenf ödem, primer amonera ile birlikte strik gonadları içeren Turner sendromunun bazı belirtilerinin de mevcut olduğu bildirilmektedir (29). Hastaların boyları normal uzunluktayken vakalardan birinde bilateral gonadoblastoma tanısı da koyulmuştur. DNA analizi ile her iki hastada da delesyonun farklı olduğu, fakat testis belirleyici faktör (TDF) genini kapsayan yaygın bir *overlapping bölgeyi* içerdiği gösterilmiştir (29,30).

2.2.1.8.2. XYY Erkekler

Ekstra bir Y kromozomuna sahip XYY sendromu uzun boy, düşük zeka seviyesi, geç konuşma, bazı öğrenme problemlerinin görüldüğü bir anomalidir. Hastalık her 1000 canlı doğumda bir görülür. Nadiren sendrom babadan oğula geçer. Fakat pek çok vakada kalıtım özelliği gösterilememiştir. XYY sendromu

genelde gizli kalır ve ciddi bir rahatsızlık göstermez. Ancak kromozom analizi ile teşhis edilebilir. Tüm hücreler XYY yapısına sahip olmayabilir. Bu duruma **mozaizim** denir ve değişik derecelerde gözlenir. İnsan Y kromozomunun, erkek fetüsün miyadında gebeliklerinin devam ettirilmesinde rol oynayıp oynamadığı henüz tam olarak belirlenememiştir. Tekrar eden abortus gözlenen çiftlerden alınan DNA örneklerinin analizi, bu yönde bilgi sağlayabilir. Ayrıca abortus olan fetüsün analizi eğer var ise Y bağlantılı bazı kritik somatik kromozom yerlerini ve dizi modüllerini anlamamıza yardım edecektir (30).



Şekil 3. Swyer Sendromunun Oluş Mekanizması

2.2.1.8.3. Rekürren Spontan Abortus (RSA)

RSA' dan sorumlu spesifik bir gen gösterilememesine rağmen Yq pozitifliği ile artmış abortus riski arasında bir ilişki mevcuttur. 11148 ardışık yeni doğan çocukla yapılan bir araştırmada Yq pozitif kromozomuna sahip 58 erkek

çocuk görülmüştür. Bu 58 erkek çocuğun annelerinin %22 gibi abortus oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Yq pozitifliği olmayan normal karyotipli 4895 çocuk ile bu çocukların anneleri arasındaki ilişkiye bakıldığında bu oran %13 olarak bulunmuştur ve bu oran istatistiki olarak anlamlı değerlendirilmiştir ($p > 0.001$). Araştırma sonuçları uzun bir Y kromozomunun zigotun canlılığını etkileyebildiğini fakat bu mutasyonu taşıyan ebeveynin fertilizasyonunu etkilemediğini göstermiştir. Yani Yqh bölgesinin miyadında gebeliğin sağlanmasında oldukça önemli bir rolü olduğu görülmektedir. Araştırmaya göre Yqh materyali aynı zamanda fetüse de zarar vermektedir. Yqh materyalinin nasıl olup da babanın fertilizasyonuna zarar vermediği ise oldukça ilginçtir. Yq bölgesinin bazı açıklanamamış, bilinmeyen mekanizmalar ile babanın doğumundan sonra Yq pozitif olabileceği ihtimali oldukça güçlüdür. Bu durum daha sonra fetüsün abortusuna neden olan bir genetik bozukluk halini almaktadır (30,31).

2.2.1.8.4. Yqh bölgesi

Yqh materyalinin major kısmını DYZI satellit fraksiyonu oluşturur. Tekrar eden abortus vakalarında bu bölgenin kaybedilmesi ya da sayısının artması önemli olabilir. DYZI satellit fraksiyonu insan Y kromozomunun Yqh bölgesinde 3.4 kb'lık tek bir dizinin 800 - 4000 kopyasını içermektedir. Tekrar eden abortus vakalarında DYZI bölgesinin analizi Yqh bölgesinin fetüse zarar verip vermediğini açıklayacağı gibi aynı zamanda normal bir insanda DYZI kopyalarının optimal sayısının da belirlenmesini sağlayacaktır. Heterokromatik dizilerin kaybı ile tekrar eden abortus gözlenen hastalardan alınan DNA örneklerinin analizi miyadında erkek gebeliğin sağlanmasında Yqh bölgesinin rolünü anlamamızı sağlayacaktır.

2.2.1.8.5. Turner Sendromu (TS)

45,XO karyotipine sahip turner sendromu, 2500 kız canlı doğumunda bir oranında görülür. X kromozomunun bilinen tek monozomik vakasıdır. Saf XO döllenmelerinin %90'ından fazlası prenatal gelişim esnasında ya da postnatal dönemin ilk aylarında elimine olmaktadır. Hem X hem de Y kromozomlarının

kromozomal mozaizmi görülür. Yeni bir çalışmada turner sendromlu bir hastada DYZI bölgesinde nadir silinme ve anneden kalıtılmış olduğu düşünülen, Y kromozomundan türeyen anormal bir markır kromozom belirlenmiştir. Hastadaki DYZI' deki silinmelerin post zigotik bir sporadik mutasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.2.1.8.6. Aday Turner Sendromu Genleri

Turner sendromu fenotipini açıklamak için, kromozom imbalansı, genomik imprinting, haplo-yetmezlik gibi pek çok mekanizma öne sürülmüştür.

Her bir hücrede iki X kromozomu bulunan normal kadında bir X kromozomu üzerindeki genler, inaktivedir. Böylece kadınlar erkekte olduğu gibi X' e bağlı genlerin aynı miktarına sahip olmaktadır. Bu kuralın dışında kalan istisnalar ise Y kromozomu üzerinde karşılığı bulunan **X bağlantılı idareci** genlerdir. İdareci genler her iki X kromozomu üzerinde de açık kalarak erkek hücrelerinin miktarına eşit olurlar. Bundan da anlaşılacağı gibi turner sendromundaki anormallikler haplo yetmezliğe bağlı olarak ortaya çıkabilir. Çünkü tek X kromozomunun ürünü pek çok fonksiyon için ihtiyaç duyulan miktarın sadece yarısını oluşturmaktadır. Bu hipoteze göre turner sendrom lokusunun orijinal olarak X ve Y kromozomlarının kısa kolu üzerindeki pseudootozomal bölge dışında bulunabileceği öne sürülmektedir (32). Mutasyon analizleri Xp-Xp pseudootozomal bölgedeki SHOX/PHOX genlerinin TS için büyüme genine aday olabileceğini göstermektedir. Ayrıca ilave X' e bağlı lokus ya da anoploidinin de TS gelişimine katkıda bulunduğu iddia edilmektedir. X' e bağlı bu ilave lokusun insanda ZFX (X kromozomu üzerindeki çinko parmak motif geni) geni olma olasılığı oldukça güçlüdür. TS'da kısa boyluluktan başka hiçbir fenotip X ya da Y kromozomunun spesifik delesyonları ile ilgili değildir. TS lenf ödem geninin de Yq ya da Yp' nin distal bölgesinde olabileceği yönünde bulgular mevcuttur (33).

2.2.2. Konjenital Vaz Deferens Agenezi (Yokluğu) Olan Kistik Fibrozis Gen Mutasyonları

2.2.2.1. Ekstra Testiküler Duktal ve Ejakülatör Sistem Anomalileri

2.2.2.1.1. Kistik Fibrozis

Kistik fibrozis (CF) kuzey avrupada 1/1600 sıklıkla görülen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Taşıyıcı sıklığı 1/25'dir. 250 kilobaz uzunluğunda ve 27 ekzon içeren CF geni 7q31'de lokalizedir. Bu gen, epitelle örtülü lümenlerde klor iyon transmembran transportunun regülasyonuna yardım eden, kistik fibrozis transmembran taşıma regülatörü (CFTR) ismi verilen bir proteini kodlar. CFTR proteininin fonksiyonunun bozulması bilateral vaz deferens ile sonuçlanabilir. Azoospermik olguların %1.4'ünü oluşturan konjenital vaz deferensli hastaların %85'inde CF gen mutasyonu tanımlanmıştır (34). Normal ve fonksiyonel CFTR miktarı belirli değerlerin altına düştüğü zaman respiratuvar sistem ve pankreatik kanalda sekresyonlar kalınlaşır ve yapışkanlaşır. CFTR'nin vazal gelişme ya da vazal bütünlüğün devam ettirilmesinde de bir rolü vardır, çünkü hemen hemen kistik fibrozisli tüm erkekler bilateral vaz deferens agenezi gösterirler. Kistik fibrozisli hastaların kliniği fonksiyonel CFTR protein miktarına bağlıdır. Fonksiyonel CFTR miktarındaki azalma arttıkça hastaların fenotipik olarak daha fazla etkilendikleri görülür. Bu nedenle, modifiye polimorfizimler kadar her bir allel üzerinde oluşan mutasyonların kombinasyonları da hastalığın klinik seyrini belirler. Şimdiye kadar, 1000'in üzerinde farklı mutasyon kistik fibrozisli ya da Konjenital bilateral vas deferens yokluğu (CBAVD) olan hastalarda belirlenmiştir. $\Delta F508$ en sıklıkla belirlenen mutasyondur ve en az CF'li hastaların %50'sinde bulunur. CF'li pek çok hasta $\Delta F508$ mutasyonu için homozigottur (35).

CBAVD obstruktif azospermili hastaların yaklaşık %6'sında bulunur. CBAVD olan erkeklerde mutasyon ve polimorfizimlerin kombinasyonları kistik fibrozisli erkeklerde görülenden daha az şiddetli olduğu için, CBAVD'li olan erkekler kistik fibrozisli hastalar gibi pulmoner yada pankreatik disfonksiyona sahip değildirler. CBAVD'li hastaların sahip olduğu fonksiyonel CFTR proteini

miktarı respiratuvar ve pankreatik belirtileri önlemek için yeterli düzeydedir. Kistik fibrozisli ve CBAVD'li hastaların fizik muayenesinde vaz deferensin bilateral yokluğu ve epididimal kalıntının değişen uzunlukları görülür. Semen analizi seminal vezikülün yokluğu yada hipoplazisine göre asidik sıvı ve düşük volüm (<1ml) gösterir. Testiküler hacim normaldir ve spermatogenezis için uygundur. Klinik kistik fibrozisli ya da CFTR proteininin fonksiyonel olarak yetersizliğinin neden olduğu CBAVD'li hastalarda, renal anatomi normaldir. Uygun vazal gelişmeyi inhibe eden fonksiyonel CFTR protein miktarındaki azalma yedinci haftadan sonra üreme sisteminin duktal morfogenezini engellerken üreteral /renal büyümeyi etkilemez (6).

CBAVD'li hastaların %90'nı iki CFTR allelinin en azından birinde bir anormalliğe sahiptir. Hastaların yaklaşık olarak %75'i ya 2 mutasyona ya da bir mutasyon ve 5T polimorfizminin bir kombinasyonuna sahiptir. Araştırmalar polimorfizm etkisinin bu genin ürününün tamamen salgılanmasını inhibe ettiğini göstermiştir. ΔF508 mutasyonu bir allel üzerinde bulunduğu zaman, Normal CFTR'nin total miktarı anlamlı olarak azalır. M470 varyantı gibi diğer polimorfizimler, ya direkt olarak genin salınımını etkiler ya da aynı allel üzerinde diğer mutasyon ve polimorfizimlerin yan etkilerini modifiye eder (36). CBAVD, kistik fibrozisten daha hafif fenotipik özelliklere sahip olmasına rağmen her iki rahatsızlık da CFTR proteininde ki bir anormallikten kaynaklanır.

Ebeveynlerin bebeğe kistik fibrozisi ya da CBAVD'yi geçirme riskini belirlemek için mutasyon analizi her iki ebeveyne birden yapılmalıdır.

2.2.2.1.2. Persistan Müllerian Kanal Sendromu ve Young Sendromu

Young Sendromu ve Persistan Müllerian Kanal Sendromu, obstrüktif azospermiye neden olur. Young sendromlu hastalar kronik sinüzit, bronşiektazi ve epididimal obstrüksiyona ve sekonder azospermiye sahiptir. Epididimal obstrüksiyon mikrocerrahi rekonstrüksiyonla düzeltilir. Gerçek hastalık sebebi belirlenememesine rağmen bazı çalışmalarda anormal bir aksonomel yapının anormal sperm motilitesine yol açabileceği bildirilmektedir. Hastalığın diğer olası sebepleri arasında anormal silier fonksiyon ya da mukus niteliği sayılabilir (37).

Persistan müllerian kanal sendromu, antimüllerian hormonun (AMH) ya da AMH reseptörünün kantitatif, kalitatif yada geçici yetmezliği nedeniyle oluşmakta ve erkek psödohermafrodizminin nadir bir formunu oluşturmaktadır. PMDS'li erkekler sıklıkla bir inguinal herni içinde bulunan bir uterus, üst vajina ve fallop tüplerine (müllerian kanal yapıları) sahiptir. Bu erkekler sıklıkla kriptorşittir ve kısmi ya da tamamen duktal obstrüksiyona sahiptir.

2.2.3. Testis Fonksiyonlarını Bozan Kromozom Anomalileri

Normal insan somatik hücreleri 22 otozom çifti ve 1 seks kromozom çifti içeren 46 kromozomlu diploid hücrelerdir. Erkekler X ve Y olmak üzere 2 farklı seks kromozomuna sahiptir. Buna karşın kadınlar 2 X kromozomuna sahiptir. Gametler yani sperm ve yumurta haploiddir ve her biri 22 otozom ve bir tek seks kromozomunun tek bir kopyasına sahiptir. Fertilizasyon sırasında her iki ebeveynin kromozomlarının birleşmesi ile normal 46 kromozomlu yapıyı oluşturur.

Normal popülasyonda var olan %1'lik kromozom anormallik oranı İnfertil erkekteki %5.8'lik kromozomal anormallik oranı ile kıyaslandığında oldukça anlamlı olduğu görülür (38). Üstelik erkek infertilitesinde seks kromozom anomalileri otozomal kromozom anomalilerinden daha sık görülmektedir (%4.2 vs %1.5) (Tablo 1) (39).

Tablo 1. Azospermik ve Şiddetli Oligospermik İnfertil Erkeklerdeki Kromozomal

	9766 infertil erkek	94465 erkek yenidoğan
Kromozomal anomali	%5,8	%0,38
Seks kromozomal	%4,2	%0,14
Otozomal kromozomal	%1,5	%0,25

Kromozom anomalileri yapısal ya da sayısal olarak sınıflandırılabilir. Yapısal kromozomal anomalileri delesyon, inversiyon, bir kromozomun bir kısmının dublikasyonu ya da bir kromozomun diğer kromozoma bir parçasının translokasyonunu ve ring kromozom yapısını içerir. Sayısal kromozomal

anomaliler poliploid (tüm kromozomların multipl kopyalarını içeren hücreler) ya da anöploid (bir ya da daha fazla kromozomun bir ilavesini ya da delesyonunu içeren hücreler) olarak sınıflandırılır. Bazı kanser tipleri hariç poliploid hücreler genellikle yaşayamaz. İnfertiliteye neden olan kromozom anomalilerinden önce kısaca translokasyon, duplikasyon, delesyon, poliploidi ve anöploidi tanımlamalarını yapmak yararlı olacaktır.

2.2.3.1. Kromozom Yapısı Mutasyonları

2.2.3.1.1. Delesyon

Kromozomunun küçük bir parçasının kırılma sonucu kopması demektir. Kopma iki türlü olabilir ya bir darbe sonucu kromozomun terminal parçası koparak kromozomdan ayrılır (terminal delesyon) yada iki darbe sonucu kopan parça aradan çıktıktan sonra kromozomun iki parçası yeniden kaynaşır (insersiyonel delesyon). Terminal delesyon pek mümkün görülmemektedir. Çünkü kopan uç yapışkan uç halini alır ve delesyondan sonra bir translokasyon gerçekleşir.

2.2.3.1.2. İversiyon (Ters Dönme)

Bir kromozoma iki darbenin gelmesi ve bunun sonucunda kopan parçanın delesyona uğramadan kendi eksenini etrafında 180 derece dönerek yine eski yerine yapışması olayıdır. İki türlü inversiyon olmaktadır. Perisentrik ve parasentrik inversiyon. Sentromerin dışında olan ters dönmelere parasentrik inversiyon denir ve kırılma uzun yada kısa kollardan birinde olur. Kromozomun görünümü değişmemekle beraber gen sırası değişmektedir. Perisentrik inversiyonda ise iki darbe kromozomun kısa ve uzun kollarına gelir. Kırılan aradaki parça sentromeri de içerir ve bu parça kendi eksenini etrafında 180 derece ters dönerek yapıştığında hem gen sırası hem de kromozomun yapısı değişir.

2.2.3.1.3. Duplikasyon

Homolog iki kromozomdan birinde çift darbe sonucu kopan parça diğerinde tek darbe sonucu kopan aralığa girer ve kaynaşırsa duplikasyon

gerçekleşir. Duplikasyon daha çok mayoz bölünme sırasında eşit olmayan krossing-over sonucu oluşur. Duplikasyon kendini iki şekilde gösterir. Tandem duplikasyonda genler ardı ardına dizilirken ters tandem duplikasyonda artan parça kendi eksenini etrafında ters dönerek yeni yerine eklenmiştir.

2.2.3.1.4. Translokasyon

Heterolog iki kromozomdan birinden kopan bir parçanın diğerinin kırılan parçasının üzerine yapışmasıdır. İki grup içerisinde incelenebilirler.

1- Resiprokal (karşılıklı) Translokasyon: Homolog yada homolog olmayan iki kromozom arasında kopan parçaların karşılıklı yer değiştirmesi olayıdır.

2-Sentrik kaynaşma tipi translokasyon: Akrosentrik kromozomlar arasında kromozomların birinde sentromere yakın kısa kolda diğerinde ise sentromere yakın fakat uzun kolda birer kırılma olur. Sonra iki kromozomun uzun ve kısa kolları birleşerek translokasyon kromozomlarını oluştururlar. Bu tip translokasyona Robertsonian Translokasyon da denmektedir.

2.2.3.1.5. Yüzük (Ring) Kromozom

Bir kromozomun iki ucunda oluşan iki kırılma sonucunda, kırık uçların birbiri ile kaynaşması sonucunda halka şeklinde bir kromozom oluşur. Bu kromozoma yüzük veya ring kromozom denir.

2.2.3.2. Kromozom Sayısı Mutasyonları

2.2.3.2.1. Öploidi

Kromozomlardaki sayısal düzensizlikler olarak bilinirler. İnsan eşey hücrelerinde haploid sayıda bulunan 23 adet kromozomun haploid sayısının tam katları kadar ($n=23$ ve $3n, 4n, 5n, \dots$) artması olayıdır.

2.2.3.2.2. Anöploidi

Temel kromozom sayısının tam katları kadar olmayan artma yada eksilmelere denir ve öploiden daha sık görülür (40).

2.2.3.3. Kromozom Yapı Bozuklukları

Erkek infertilitesinin şiddetli şekilde görüldüğü azospermi ve ciddi oligospermili hastalarda otozomal ve seks kromozomlarında veya her ikisinde kromozomal yeniden düzenlenmeler görülür. Özellikle Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar rastgele seçilmiş erkek yenidoğanlara göre infertil erkeklerde 8.5 kat daha fazladır (41). Benzer şekilde, otozomal inversiyonlar da genel populasyona göre infertil erkeklerde 8 kat daha fazladır. Tutulan kromozomlara bakılmaksızın, Robertsonian translokasyonları olan hastaların çoğu anormal seminal parametreler göstermektedir. Resiprokal translokasyon taşıyan erkekler normalden azospermiğe kadar değişen semen özelliklerine sahip olabilir.

Normal bir fenotipe karşın, 46,XX karyotipli bir erkek (XX erkek sendromu) infertildir. Bu nadir durum yaklaşık 20.000 canlı doğumda bir görülür. Daha önce tanımlandığı gibi, bu sendrom için en olası açıklama, çok az hastada olmasa da, testisin Y kromozomu uzun kolunda bulunan seks belirleyici bölge yani SRY'nin X kromozomuna translokasyonudur. Bu XX erkek hastalar testis biyopsilerinde Sertoli cell-only patolojisiyle birlikte azospermiktir (42). Fenotipik özellikleri arasında jinekomasti, dişi kıllanma modeli ve küçük testisler bulunur. XX erkeklerin yaklaşık %10'unda (SRY-negatif) ambigius genitalia veya hipospadias bulunmaktadır (42)

2.2.3.4. Kromozom Sayı Bozuklukları

Genellikle, otozomal sayısal bozukluğa sahip fetuslar yaşama bağdaşmaz. Sadece trizomi 13, trizomi 18 ve trizomi 21'li fetuslar doğuma dek varlığını sürdürür ve trizomi 21'li hastalar nadiren trizomi 13 ile trizomi 18'li hastalar reproduktif döneme erişebilir. Otozomal sayısal bozukluğa sahip erkeklerde genellikle ciddi oligospermi veya azospermi vardır (43). Sayısal kromozomal anormalliklerin örnekleri arasında Klinefelter sendromu, mikst gonadal disgenezis ve XYY erkekleri sayabiliriz.

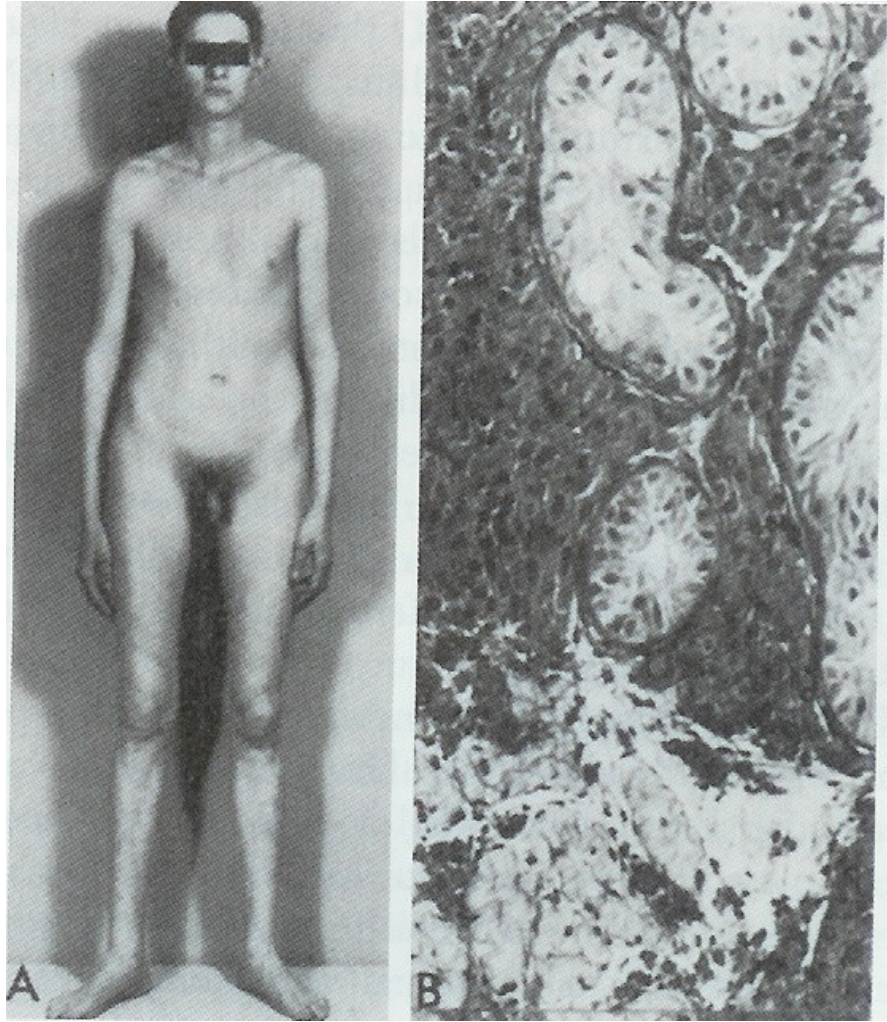
Klinefelter sendromu (XXY) en sık görülen seks kromozom bozukluğudur ve infertilite kiliniğine başvuran infertil erkeklerde genel popülasyona göre 30 kat

daha sıktır. Klinefelter sendromunun genetik özelliği fazladan bir X kromozomunun bulunmasıdır. Bu sendroma doğan her 600 erkekten birinde rastlanır. Hastalık mayotik redüksiyon bölünme sırasında seks kromozom ayrılamamasından kaynaklanır. Klinefelter sendromlu hastalar azospermik veya ciddi oligospermiktir ve azospermi vakalarının yaklaşık %14'ünü oluşturur (44). Testis biyopsilerinde sıklıkla seminifer tübüllerde skleroz gözlenir. Ancak, nadiren Sertoli hücreleri ve spermatozoa da bulunabilir. Seminifer tübüllerdeki şiddetli hasar nedeni ile hastaların %50'sinde gonadotropinlerin plazma seviyeleri değişir. Plazma folikül stimüle edici hormon (FSH) seviyesi genellikle belirgin olarak yükselirken, luteinize edici hormon (LH) seviyesi normal ya da yükselmiş olabilir. Hastaların %50-60'ında total plazma testosteron seviyesi düşmüştür. Klinefelter sendromlu erkeklerin fenotipi değişkendir, ancak küçük, sıkı testisler, artmış boy, kadın tipi kılınma, alt ekstremitelerde artmış varikozitler, zeka düzeyinde azalma, obezite, lösemi ve nonseminomatöz, ekstraponadal germ hücre tümörlerinin insidansında artış ve infertiliteyi içermektedir (45) (resim 3). Ayrıca, jinekomastili klinefelter sendromlu hastalarda meme kanseri gelişme riski artmıştır (45). Anne ya da babaya ait gametlerde mayoz sırasında kromozomların birbirinden ayrılmamaları Klinefelter sendromuna yol açarken, bu ayrılmanın olmayışı embriyonun gelişmesi sırasında mitozla çoğalan hücrelerde meydana gelirse mozaik tablo ortaya çıkar. Klinefelter sendromlu hastaların %10'u 46XY/47XXY mozaik karyotipine sahiptirler. Hücrelerin bir kısmının 46XY ve kalan hücrelerin 47XXY olduğu mozaik grup hastalar fenotipte daha az şiddetli belirtilere sahiptir. Bu hastalar değişen düzeylerde sperm üretirler ve nadiren de olsa doğal konsepsiyonla hamilelik sağlanabilmektedir. Daha yaygın olarak üreme teknolojilerinin uygulanmasıyla Klinefelter sendromlu bazı hastalar doğal yolla hamileliği sağlayabilir fakat bu karyotipik anomali bu hastaların çocuklarına değişik kromozom düzensizlikleri olarak geçmektedir (46).

Daha az yaygın olarak, seks kromozom anormallikleri mikst gonadal disgenezili ve XYY'li hastalarda ortaya çıkar. Mikst gonadal disgenezili hastalar fenotipik olarak erkek, kadın ya da ambigus genitaleli olabilir. Bu hastalar sıklıkla 45X/46XY mozaik karyotipine sahiptir; yaklaşık olarak 1/3'ü normal

karyotipe sahiptir. Pek çok hasta bir testise ve streak gonada sahiptir. Testis kriptorşit ya da skrotumda lokalize olabilir. Testis skrotumda lokalize ise normal leydig hücreleri ve sertoli hücre popülasyonları genellikle vardır. Buna rağmen, seminifer tübüllerde germ hücresi yoktur. Bu hastaların streak gonadları gonadoblastoma için malign dejenerasyon riski taşırlar.

XYY erkeklerin semen bulguları normalden azospermiye doğru değişen bir profil gösterir. Pek çok XYY erkek artmış boy hariç fenotipik olarak normaldir. XYY hastalar spermatogenezis yetmezliğe sahiptir ve testis biyopsisinde matürasyon arresti ya da sertoli-cell only sendromu gösterirler (47).



Şekil 4. A- Klinefelter sendromlu 47,XXY erkek erişkin fenotipi. Kol ve bacak uzunluğu, küçük genitelya, Jinekomasti. B- Germ hücresi içermeyen seminifer tübüllerin görüldüğü testis biyopsisi. (Thompson&Thompson, Tıbbi Genetik, 6. baskı, 2005).

2.2.3.5. Kromozomal Bozukluklar İçin Test

Kromozomal anomaliler ve bazı yapısal defektler giemsa bantlama sitogenetik analizi kullanılarak belirlenebilir. İdiopatik infertil erkeklerin %7-13'ü anormal bir karyotipe sahiptir. Bu nedenle genelde 5 milyondan daha az sperm dansiteli tüm erkeklere, özellikle bir yardımcı üreme tekniğini kullanmak için başvuranlara, yüksek rezolüsyonlu bantlama sitogenetik analizini önerilmelidir. Normal karyotipli bir infertil erkek, germ hücrelerinde kromozomal anöploidide bir artışa sahip olabilir (38). İnfertil hasta ejakülatlarından morfolojik olarak normal spermin multikolor fluoresan in situ hibridizasyon analizi (FISH), seks kromozom anomalilerinin artmış seviyelerini ortaya koymuştur. Ayrıca, azospermik hastaların testis biyopsilerinde yapılan FISH çalışmaları, hastaların germ hücrelerindeki seks kromozom anöploidilerinin insidansında artış olduğunu göstermiştir (41). Bu çalışmaların her ikisi de, rutin kan karyotipi veya sperm morfolojisiyle önceden bilinemesi de, yardımcı üreme tekniklerinde genetik olarak anormal spermleri kullanmanın riskini yansıtmaktadır. Bundan dolayı, ICSI'den sonraki hamileliklerde otozomal trizomi ve seks kromozom anöploidilerinin daha yüksek görülmesi şaşırtıcı değildir. Bu nedenle, hastada sayısal veya yapısal bir kromozomal anomali saptandığında, hastaya genetik danışma verilerek preimplantasyon genetik tanı önerilmeli, prenatal genetik tanı için amniyosentez veya koryonik villus örnekleme tavsiye edilmelidir.

2.2.4. Sperm Fonsiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar

2.2.4.1. Primer Silier Diskinezi (PCD)

Silialı hücrelerin aksonemlerine ait bazı defektleri içeren birçok sendrom tanımlanmıştır. Kartagener ve Usher bu sendromların en bilinen örneklerdir. (48) Kartagener sendromu otozomal resesif bir hastalık olup kronik sinüzit, bronşektazi, retinitis pigmentosa ve sağırılık ile karakterizedir. Ağır formlarında mukosilier transportun bozulması ile respiratuar yetmezliğe neden olabilir.

Semen analizinde normospermiye rağmen motilite yetersiz ya da tamamen yoktur. Fertilitenin gerçekleşmediği vakalarda ICSI uygulanabilir.

Otozomal resesif bir hastalık olmasına rağmen X'e bağılı dominant kalıtımda bildirilmiştir. Normal silier fonksiyon için gerekli genin FISH analizi ile 14q 23'de lokalize olduğu bildirilmiştir (49).

Usher sendromu retinal fotoreseptörler ve odyovestibüler organlardaki silier defekte bağılı olarak retinitis pigmentosa ve sağırılık ile birlikte görülür. Sperm motilitesindeki bozukluk infertiliteye neden olmaktadır (48,49).

2.2.4.2. Noonan Sendromu

Turner sendromunun fenotipik özelliklerine benzer klinik özellikler gösterir. Fasial dismorfizm, kısa boy, pulmoner ve kardiyak problem, bilateral kriptorsidizm (% 77 erkekte) en yaygın belirtilerdir. Özellikle erkek fertilitesi, kriptorşidizm ve yükselmiş plazma FSH düzeyi ile ilişkilidir (48). Yüksek FSH ve kriptorşidizimli erkekte ciddi spermatik disfonksiyon görülür. Semen analizinde azospermi veya ciddi oligozoospermi saptanır. Otozomal dominant geçiş gösterir ve kromozom yapısı erkekte 46XY, kadında 46XX'dir. Bu sendrom ile ilişkili farklı kromozomlara ait delesyonlar bildirilmekle beraber henüz aday bir gen ortaya konulamamıştır.

2.2.4.3. Miyotonik Distrofi

Erişkin yaşlarda ortaya çıkan müsküler distrofinin en sık nedeni 19. kromozomun 3' bölgesinde serin-treonin kinaz proteinini kodlayan gendeki CTG trinükleotid tekrarıdır. CTG tekrarlarının olması spermatogenezin azalması ile korelasyon gösterir. Katarakt, müsküler atrofi, endokrinopati en belirgin özellikleridir. Çoğu hasta seminifer tübül hasarına bağılı olarak infertildir. Yapılan bir çalışmada 208 kişilik hasta grubunda; 70 miyotonik distrofi erkekte % 65'inin testiküler atrofi gösterdiği bulunmuştur (49).

2.2.4.4. Orak Hücre Anemisi

Hemoglobinopatilerin en tipik ve en sık görüleni β -globin zincirini kodlayan gendeki mutasyon sonucu gelişen orak hemoglobindir. Onbir nolu kromozomda lokalize olan genin, β zincirin 6. pozisyonunda bulunan glutamin aminoasidinin yerine valin aminoasidi gelerek rahatsızlık oluşur. Otozomal

resesif geçiş gösteren hastalık testiküler disfonksiyon, hipotalamik-hipofizer defektler veya çok sayıda kan fransfüzyonuna bağlı olarak gonadlarda demir depozisyonu sonucu oluşmaktadır (50).

2.2.4.5. Genetik Endokrinopatiler

Hormonlar, büyüme faktörleri ve onların reseptörleri ve diğer ilgili sinyal transdüksiyon proteinleri mutasyona uğrayabilir ve hipotalamik pitüiter gonadal aksı etkileyebilir. Bu rahatsızlıklar nadirdir fakat şiddetli erkek infertilite bozukluğu yapabilir. Rahatsızlıklar genellikle, seksüel gelişme ve fonksiyonun endokrin ya da humoral regülasyonunda yer alan spesifik genler içinde mutasyonlar, küçük delesyonlar ya da polimorfik genişlemelerden kaynaklanır.

2.2.4.5.1. Gonadotropinler (GnRH)'in üretim veya Sekresyon Bozuklukları

GnRH'ın anormal salınımı ve sentezi ile GnRH'ın salınımını takiben FSH ve LH'da anatomik bir sebep olmaksızın düşük düzeyde salınım sonucunda oluşan bozukluklar idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) olarak ifade edilir. Gonadotropinler normal düzeylerde salgılanmazsa, androjen üretimi ve spermatogenezis yetersiz olur.

2.2.4.5.2. Kallman Sendromu

Erkek infertilitesinde en sık rastlanılan X'e bağlı bozukluktur ve IHH'nin bir sebebi olarak bilinir. Kalman sendromu yaklaşık 10000-60000 canlı doğumda bir görülür. X kromozomunun uzun kolunda lokalize olan Ka1 (Xp22.3) geninde oluşan mutasyon hipotalamustan GnRH sekresyonunda bozukluğa sebep olur. Kallman sendromlu hastalar uzun boylu ve azospermiktirler. Pubertal gelişim gecikmiştir. Bu hastalarda testisin FSH ve LH stimlasyonunun yokluğu sebebiyle, spermatogenezis ve testesteron üretimi yoktur. Bu erkekler sıkı prepubertal boyutta testislere ve küçük penise sahiptir. Hastalar konjenital sağırlığa, kraniyum ve yüz asimetrisine, yarık damak, serebeller disfonksiyon, kriporşidizm ve renal anomalilere sahip olabilir. Kallman sendromlu pek çok hastada fertilitte için yapılan hormon replasman

tedavisinin (insan koryonik gonodotropin = hCG ve FSH) sonucu başarılıdır (51).

Pek çok gen mutasyonu farklı mekanizmalarla IHH'ye sebep olmaktadır. Bir X kromozom geni olan Dax1, konjenital adrenal hipoplazi ve IHH'ye neden olmaktadır. Dax1 bir nükleer hormon reseptör süper familyasını kodlar ve testis epitelyal bütünlüğünün ve spermatogenezisin devamlılığında fonksiyona sahiptir. Gonadotropin releasing hormon için bir G protein reseptör çiftini kodlayan Gonadotropin releasing hormon reseptörlerinin mutasyonları, üreme disfonksiyonuyla sonuçlanan parsiyel ya da tam hipogonadizme sebep olmaktadır. Gonadotropin releasing hormon sekresyonu PC1 geni tarafından etkilenir. PC1 geni mutasyona uğradığı zaman IHH, obezite ve diyabete sebep olmaktadır (52).

2.2.4.5.3. Prader-Willi Sendromu

Obezite, kriptorşidizm, hafif ya da orta mental gerilik ve IHH ile karakterizedir. Kromozom 15'in kısa kolunda oluşan mutasyon ya da delesyon (15q11q13) bu sendroma neden olur. Hastalık babadan ya da daha az sıklıkla bu lokusun 2 kromozomal kopyasının annesinden geçmesi sonucu oluşur (37).

Genetik, erkek üreme sisteminin pek çok özelliğini etkiler. Fare modellerinde infertiliteyle ilgili 150'den fazla gen gösterilmiştir. Buna rağmen bu bulguların insan erkek infertilitesinde bulunması ve gösterilmesi oldukça yavaştır. Yine de, farelerde gösterilen infertilite gen silinmelerinin önemli bir kısmının erkek infertilitesiyle ilişkili olması olasılığı oldukça güçlüdür. İnsan erkek infertilitesinin moleküler temeli hakkında daha anlaşılmamış pek çok şey vardır. İnsanlardaki genetik rahatsızlıklar bozulmuş spermatogenezise ve ejakülasyon bozukluklarına neden olabilir. Erkek infertilitesinin genetik temelini anlaşılması ile yeni tedavi yaklaşımları geliştirilerek bu hastaların çocuk sahibi olabilmeleri başarılacaktır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi tarafından onaylandı. Tüm hastalara çalışmanın amacı ve yapıma şekli anlatılarak yazılı bilgilendirme formu imzalatıldı.

3.1.1. Çalışma Grubu

Şubat 2005- Nisan 2007 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına ve tüp bebek merkezine infertilite nedeni ile başvuran, Isparta ve yöresinde yaşayan azospermili ya da şiddetli oligospermili (sperm sayısı <5 milyon/ml) hastalar ile benzer yaş grubunda çocuğu olan fertil sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. Hastaların detaylı anemnezleri alındı. Kriptorşidizm, geçirilmiş genital infeksiyon hikayesi, genital travma, geçirilmiş operasyonlar, alışkanlıklar (sigara, alkol, uyuşturucu kullanımı), radyasyon tedavisi, kemoterapi gibi maruz kalınan gonodotoksinler sorgulanarak hastaların detaylı anemnezleri alındı. Hastaların testis sayıları, lokalizasyonu ve volümü kaydedildi. Varikozel varlığı fizik muayene ile belirlendi. Ayrıca epididim ve vas deferensin skrotal kısımlarının palpasyonu yapıldı. Vaz deferens obstrüksiyonu ya da agenezisi şüphesi olan hastalar ile daha önce fertilizasyon amacı ile vazektomi yapılan hastalar çalışmaya alınmadı.

3.2. Metod

3.2.1. Semen Analizi

Tam semen analizi dünya sağlık örgütü kriterlerine göre yapıldı (53). Semen örnekleri 2-5 günlük cinsel perhiz periyodundan sonra alındı. Oligospermi tanısı, aralıklarla yapılan, en az 2 anormal semen analizi ile koyuldu. Azospermi tanısı semen santirfüjünden (20 dakika 1000 devirde çevrilerek yapıldı) sonra yapılan pellet analizi ile en az 2 ejakülatın

değerlendirilmesi ile konuldu. İlave olarak, kromozom analizi ve hormonal değerlendirme için kan örnekleri alındı.

3.2.2. Hormonal Değerlendirmeler

FSH, LH, prolaktin ve testesteronun serum konsantrasyonları elektrokemiluminesens immunasay (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ile ölçüldü. Erkekler için normal referans aralıkları: FSH 1.5-12.4 IU/L, LH 1.7-8.6 IU/L, prolaktin 4.1-18.4 ng/ml ve testesteron 2.8-8 ng/ml olarak belirlendi.

3.2.3. Sitogenetik Değerlendirme

Üniversitemizin tıp fakültesi Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına ve tüp bebek merkezine infertilite nedeni ile başvuran ve bölgemizde yaşayan azospermili 92 hasta ile şiddetli oligospermili (sperm sayısı <5 milyon/ml) 23 hasta olmak üzere toplam 115 erkek olgudan, heparinize enjektör ile 5 ml venöz periferik kan alındı. Ayrıca olgularla benzer yaş, alışkanlık, sosyo-ekonomik düzeyde ve aynı cinsiyette sağlıklı 60 kontrol bireyden de kan alınarak toplam 175 bireyde sitogenetik inceleme yapıldı. Sayısal kromozom anomalisi saptanan olguların preparatlarına mozaiklik oranlarını belirlemek amacı ile **Floresan In-Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi** uygulandı.

3.2.3.1. Kültürlerin Kurulması

Sitogenetikte, kromozomların elde edilmesinde kullanılan farklı hücre kültürü yöntemleri vardır. Kısa süreli lenfosit kültürü en sık kullanılan yöntemdir. Periferik kan materyali üremesi için kültür ortamlarına alındıktan sonra belirli süreler sonunda hasatlanır. Daha sonra elde edilen lenfosit kümeleri preparat haline getirilir ve ilgili boyama yöntemleri ile boyandıktan sonra değerlendirmeye alınır.

3.2.3.1.1. Periferik Kan Hücre Kültürü

3.2.3.1.1.1. Zenginleştirilmiş Besiyerinin Hazırlanması

Hücreleri üretebilmek için L-Glutaminli besiyerleri kullanıldı. Ayrıca besiyerini mikrobiyal kontaminasyondan korumak için Penisilin ve Streptomisin gibi antibiyotikler, besin değerini arttırmak için Fetal Calf Serum ile hücreleri bölünmek için indükleyen Fitohemaglutinin besi ortamı içerisine ilave edildi.

Hazırlanan besiyerinin içeriği ve miktarları aşağıda verilmiştir.

RPMI 1640 Medium (Biological Industries, BİO1-106-1B) 100 ml

Fetal Calf Serum (Biological Industries, BİO4-001-1B) 30 ml

Fitohemaglutinin Solüsyon (Biological Industries, BİO12-006-1H) 3,3 ml

Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, BİO3-031-1B) 2 ml

L- Glutamin (Biological Industries, BİO3-020-1B) 2 ml

Hazırlanan besiyeri ağız kapaklı 10 ml'lik steril falkon tüplere 6'şar ml. bölündü.

Fitohemaglutinin solüsyonunun hazırlanması:

Ticari olarak gelen 5 ml'lik fitohemaglutinin şişesi, içinde 5 ml RPMI 1640 Medium ile sulandırıldı.

Fetal Calf Serumun hazırlanması:

-20 derecede muhafaza edilen fetal calf serum çözdürüldükten sonra 65 °C'de 1 saat inaktive edildi.

3.2.3.1.1.2. Ekim İşlemleri

a. Steril disposable 5 ml'lik enjektör önce heparinize (Liquemine Roche) edildi. İlk olarak 0.5 ml heparin boş enjektöre çekildi. Heparinin enjektöre iyice bulaşması sağlandı ve fazla heparin tekrar şişe içerisine boşaltıldı.

b. Heparinize enjektör ile her olgudan 5 ml periferik kan alındı. Alınan kanlar, steril ortamda ağız kapaklı steril falkon tüplerdeki 6 ml zenginleştirilmiş besiyeri üzerine 15 damla (0,6-0,8 ml) olacak şekilde ekildi. Tüpler hafifçe

karıştırıldıktan sonra her tüpün üzerine olgunun adı, soyadı, besi ortamının cinsi ve tarih not edildi. Daha sonra tüpler ağızları sıkıca kapatılarak 37 °C'lik etüve kaldırıldı. Günde bir kez tüp yavaşça alt üst edilmek suretiyle 72 saat etüvde tutuldu.

3.2.4. Kromozom Eldesi

3.2.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

Hipotonik solüsyon:

0.075 M KCl (Merck, 104936) olacak şekilde 0.56 gr KCl tartılarak 100 ml bidistile suda çözüldü, kullanılacağı saatten en az 1 saat önce hazırlanarak 37 °C'lik etüve konuldu.

Fiksatif solüsyonu:

1 birim glacial asetik asit (Merck, 100056) üzerine 3 birim methanol (Merck, 106008) ilave edilerek iyice karıştırıldı. Karışım kullanılmadan önce ve çalışma aralarında -20 °C'de saklandı.

Solüsyon her deney aşamasında taze olarak hazırlandı. Bu solüsyonun taze olması içindeki alkolün uçuculuğu açısından önemlidir.

3.2.4.2. Hücrelerin Elde Edilmesi

Kromozom preparasyonu için Moorhead'in tekniği modifiye edilerek uygulandı (54,55). Üreme için 37 °C'deki etüve bırakılan kültür tüplerine, kromozom eldesinden 2 saat önce yani 70. saatte 10 µg/ml olacak şekilde 2 damla (2 ml'lik enjektör kullanıldı) kolçisin ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı, tekrar iki saat süre ile 37 °C'ye ayarlanmış etüve kaldırıldı. Bu süre sonunda etüvden çıkarılan tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich, universal 32R) edildi. Süpernatant kısmı pastör pipeti ile atıldı.

Çökelti ile üzerinde kalan 0.5 ml'lik sıvı vortekslendi ve bu sırada üzerine toplam hacim 6 ml olana kadar yavaşça hipotonik (0.075 M KCl) solüsyonu eklendi. Tüpler 20-30 saat 37 °C etüvde bekletildi. Süre bitiminde 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, pastör pipeti ile süpernatant kısmı atıldı. Çökelti ile

üzerinde kalan 0.5 ml'lik sıvı vortekslemedi ve vorteksleme işlemi devam ederken tüplerin yan duvarından yavaşça toplam hacim 6 ml olana kadar fiksatif ilave edildi. Fiksatif eklendikten sonra tüpler en az 1 saat süreyle -20 °C'de bekletildi. Bu bekleme basamağı sadece ilk fiksatifle yıkama için önemlidir, diğer fiksatif aşamalarında bekleme yapılmadan renk şeffaf olana kadar yıkama işlemine devam edildi. Rengi açılan tüplerin üzerinden 4 ml süpernatant kısmı atıldı ve kalan 2 ml kısım yayma için kullanıldı. Kalan miktar yavaş yavaş pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bir gün önceden yarı yarıya bidistile su ve alkolle hazırlanmış lamaların alkol kısmı dökülerek tekrar bidistile su konuldu ve suyun donması için buzluğa kaldırıldı. Yayma sırasında lamalar buz içinden alındı, 45 derecelik açı ile 20 cm yukarıdan pastör pipeti ile soğuk ıslak lam üzerine hücre süspansiyonu bırakıldı. Yayma işlemi yapılan preparatlar, kapalı sistem etüvde 37 °C'de 3 gün veya 65 °C'de 1 gece yaşlandırıldı.

3.2.5. Giemsa Bantlama Tekniği

Sitogenetik laboratuvarlarında kromozomları tanımlamada kullanılan en yaygın yöntemdir. İşlem için Korenberg'in boyama yöntemi modifiye edilerek kullanıldı (54).

Her kromozom kendine özgü açık ve koyu bant bölgeleri içerir. Bu bölgeler premetafaz ve metafaz kromozomlarında sayıca farklılık gösterir. Kromozomların ilk defa Paris Kongresi'nde (1971) idiogramları belirlenmiş, en son şekli 1985 ISCN'de yayınlanmıştır (55).

Bu boyama yöntemi kullanılmadan önce (yaymadan hemen sonra) preparatlar 37 °C'lik etüvde 3 gün bekletilerek yaşlandırılır. Alternatif olarak oda ısısında 4 gün veya 56-65 °C de de 1 gece bekletilebilir.

3.2.5.1. Kullanılan Solüsyonlar

PBS (Phosphate Buffer Saline) solüsyonları:

Bir PBS tablet (Amresco, AIE404-100) 100 ml bidistile suda çözüldü. İkinci PBS solüsyonu yine 100 ml'de 1 PBS çözülerek hazırlanır. Ancak bu solüsyon işlem öncesinde soğuk olmalıdır.

Trypsin solüsyonu:

Hazırlanan PBS solüsyonu 37 °C'ye kaldırılır 37 °C'ye geldiği hassas termometre ile tespit edilen PBS tampon solüsyonu üzerine 0.05 gr Trypsin eklenerek Trypsin solüsyonu hazırlanır.

Söranson tamponu:

A solüsyonu: 4.537 gr KH₂PO₄ (Merck, 104873) 500 ml bidistile suda çözüldü.

B solüsyonu: 5.935 gr Na₂HPO₄ (Merck, 106586) 500 ml bidistile suda çözüldü.

Balon jöjeye A solüsyonundan alınarak pH 6.8'e gelinceye kadar B solüsyonu eklenerek 2 solüsyon karıştırıldı (Ortalama olarak 53 ml A solüsyonu 47 ml B solüsyonu ile karıştırılarak hazırlanır).

Giemsa boya solüsyonu:

3 ml Giemsa lösing (Merck, 109204), 97 ml pH 6.8'lik söransan tamponu içine ilave edilerek 100 ml'ye tamamlandı.

3.2.5.2. Preparatların Boyama İşlemleri

a) Preparatlar mikroskop altında 10X'lik objektifle incelenir ve kromozomların kondansasyonuna göre tripsinde bekletme süresi ayarlanır. Kromozomlar koyu ve parlak ise preparatlar 20-30 saniye, mat ve soluk ise 5 saniye tripsin solüsyonuna daldırılır. Kronometre ile saptanan süre boyunca çok yavaş bir tempoda çalkalanır.

b) Süre bitiminde preparatlar soğuk PBS solüsyonunda çalkalanır. Bu aşama önemlidir. Preparatlar soğuk PBS'den geçirilmezse tripsinin aktivasyonu devam eder.

c) % 3'lük Giemsa boya solüsyonunda 3-5 dakika bekletilir. Preparat beherden çıkarılmadan boyanın üst kısmında oluşan parlak tabaka adi kurutma kağıdına emdirilir. Musluk suyundan geçirilen preparatlar kurutma kağıdı arasında kurutulur. Entellan ile lamelle kapatılır ve mikroskopta incelenir.

d) Hazırlanan preparatlar, ışık mikroskopunda 100X objektifle incelendi. 100 metafaz plağı kromozomal anomaliler açısından incelendi.

3.2.6. Dijital Görüntülerin Elde Edilmesi

Kromozom anomalisi tespit edilen preparatlar ve kontrollerden elde edilen birkaç metafazın 100X objektifle immersiyon yağı altında Zeiss marka mikroskop (Zeiss Imager A1, Germany) ve Canon marka dijital fotoğraf makinesi (Canon PC1049, Japan) kullanılarak fotoğrafları çekildi ve görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.2.7. Floresan In-Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

3.2.7.1. Kullanılan Solüsyonlar

20XSSC (Sodium Salina Citrat) Stok solüsyonu

175.3 gram sodyum klorid (Merck) ve 88.2 gram tri-sodyum sitrat (Merck) tartılarak, 1000 ml distile suda çözdürüldü. Hazırlanan stok solüsyonunun pH'sı; dilüe hidroklorik asit solüsyonu (HCl) (Merck) kullanılarak, 7.0'ye ayarlandı. Bu stok solüsyon aliminyum folyo ile sarılarak, +4 °C'de saklandı (56,57).

2X SSC Solüsyonu

Stok olarak hazırlanan 2X SSC solüsyonundan 10 ml alınıp, üzerine 90 ml distile su ilave edilerek, hacim 100 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH'sı; dilüe HCl solüsyonu kullanılarak, 7.0'ye ayarlandı. Kullanım esnasında solüsyonun, oda sıcaklığında (20-25 °C) olmasına dikkat edildi.

Etanol Serileri

Preparatı dehidrate etmek amacı ile; %70, %85 ve %100'lük etanol serileri hazırlandı. -20 °C'de saklandı (56,57).

0.4XSSC Solüsyonu

Stok olarak hazırladığımız 20XSSC solüsyonundan 2 ml alınıp, 98 ml distile su ilave edilerek, hacim 100 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH'sı dilüe HCl solüsyonu kullanılarak, 7.0'ye ayarlandı.

2XSSC, %0.05 Tween 20 (Sigma) Solüsyonu

Stok olarak hazırladığımız 20XSSC solüsyonundan 10 ml alınıp, 90 ml distile su ilave edilerek, hacim 100 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyona, 50 µl Tween-20 (Sigma) ilave edildi. Solüsyonun pH'sı; dilüe HCl solüsyonu kullanılarak, 7.0'ye ayarlandı (56,57).

%100 Metanol (Merck)

Fiksatif Solüsyonu

1 ml glasiyal asetik asit (Merck) ve 3 ml metanolün (Merck) karıştırılması ile fiksatif solüsyonu hazırlandı (56,57).

3.2.7.2. Kullanılan FISH Probenun İçeriği (Cytocell)

- Chromoprobe-multiprobe hibridizasyon chamber
- Hibridizasyon solüsyonu-B (Cytocell)

Formamid, dekstran sülfat ve SSC'den oluşmaktadır.

- 41 adet direkt olarak işaretlenmiş prob ile kaplı cm multiprob device counterstain solüsyonu (Cytocell)

DAPI (ES: 0.125 ml/ml) ve antifade içermektedir.

- 24 mm x 60 mm boyutlarında lamel
- Eşit olarak 24 kareye bölünmüş lam

3.2.7.3. FISH Tekniğinin Uygulanması

Ön Hazırlık

- Olgulardan rutin kromozom eldesi yöntemi uygulanarak, son aşamada 3 kez fiksatifle yıkanan doku kültürü materyali, bir kez daha 1600 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.

- Eşit olarak 24 kareye bölünmüş lamın temizlenmesi:

Lam, %100'lük metanol içinde 2 dakika bekletildi. Süre sonunda yumuşak bir bezle iyice kurulandı.

- İdeal hücre yoğunluğunun sağlanması:

FISH tekniği için kullanılacak olan Cytocell lamı, 24 eşit kareye bölünmüş olup bu karelerden 22 adeti otozomal kromozomlar için, 2 adeti de seks kromozomları için ayrılmış durumdadır. Santrifüj edilen materyalden otomatik pipet ile 2 µl alınıp, lamın 1 nolu karesine damlatıldı. Faz-kontrast mikroskopta (Nikon), 10X objektif ile metafaz yoğunluğu ve metafazların altlarında stoplasmik artık bulunup bulunmadığı kontrol edildi. Karede, bir alanda 5 kaliteli metafaz veya en az 20 interfaz varsa hücre yoğunluğu ideal olarak kabul edildi. Eğer metafaz ve interfaz yoğunluğu az ise; materyal yeniden 1600 rpm'de 7 dakika santrifüj ederek, daha az süpernatant bırakılıp, daha yoğun çökelti elde edildi. Fazla ise; fiksatif solüsyonu ile yeterli oranda dilüe edildi. Metafazların altında sitoplasmik artık var ise; çökteliyi kareye damlattıktan sonra üzerine bir miktar fiksatif solüsyonu damlatılarak stoplasmik artıklar uzaklaştırılmaya çalışıldı (57).

Preparatın hazırlanması

24 eşit kareye bölünmüş lamın, 1 nolu karesine hücre yoğunluğunu ayarlamış olduğumuz materyalden 2 µl damlatılarak, uygun bir şekilde kurumasi sağlandı. Daha sonra materyalin taşmasını engellemek amacı ile bir kare atlayarak, lamın 3 nolu karesine, materyalden 2 µl damlatılıp kurutuldu. Bütün karelere materyalden damlatıldıktan sonra, faz kontrast mikroskopta yeterli metafaz bulunup bulunmadığı ve yaymanın kurumasının iyi olup olmadığı kontrol edildi (57).

Hibridizasyona Hazırlık Aşaması

- Su banyosu 37 °C'ye ayarlandı. Hibridizasyon kutusu su banyosuna konarak, 37 °C'ye gelmesi sağlandı.
- FISH probu içinde hazır olarak bulunan hibridizasyon solüsyonundan, ilk önce pipetaj yapılarak bir ependorf tüpüne 30 µl alındı ve 37 °C'ye ayarlı etüve konuldu.
- Multiprob sistemi; etiketli kısım alta gelecek şekilde 37 °C'ye ayarlı etüve konuldu.

- Yayma yaptığımız lam; oda ısısındaki (20-25 °C) 2XSSC solüsyonu içinde, 2 dakika bekletildi.

- Preparatın dehidratasyon aşaması:

Süre sonunda 2XSSC'den çıkarılan preparat, dehidratasyon için; -20 °C'de saklanan %70, %85 ve %100'lük alkol serilerinin her birinde, sırası ile 2'şer dakika bekletildi. Preparatın, %100'lük alkol içerisindeki bekleme süresi biter bitmez çıkarılıp, hızlı bir şekilde kurutuldu ve ısısının 37 °C olması için 37 °C'ye ayarlı etüve konuldu.

- Daha önceden, ısınması için 37 °C'ye ayarlı etüve koyduğumuz hibridizasyon solüsyonundan; üzerinde her kromozoma spesifik telomerik prob bulunan ve 24 kareye ayrılmış olan multiprob sisteminin her karesine otomatik pipet kullanarak ve pipet ucunu multiprob sistemine değdirmeden 1 µl damlatıldı.

- Hibridizasyon solüsyonunu damlattıktan sonra; ısının 37 °C'ye gelmesi için etüve konulan lam ile multiprob sistemi; lamın 1 nolu karesi ile multiprob sisteminin sarı renkli 1 nolu karesi çakışacak şekilde hava kabarcığı bırakılmadan birleştirildi. Preparat altta kalacak şekilde kaydırılmadan ters çevrildi. 37 °C'ye ayarlı etüvde 10 dakika bekletildi (57).

Denatürasyon Aşaması

Bekleme süresi sonunda metafaz yayması bulunan lam ile her kromozoma spesifik telomerik prob bulunan multiprob sisteminin denatürasyonu için; hazırlanan preparat 75 °C'de ve 2 dakikaya ayarladığımız termal ısıtıcıya (Techno) konuldu. Program başlatılarak denatürasyon işlemi yapıldı (57).

Hibridizasyon Aşaması

Denatürasyon işlemi tamamlandıktan sonra; 37 °C'ye ayarlı su banyosuna konulan hibridizasyon kutusu içine, denatüre ettiğimiz lam+multiprob sistemi yerleştirildi. Hibridizasyon için, bir gece 37 °C'deki su banyosunda inkübasyona bırakıldı (57).

Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

- Hibridizasyon süresi tamamlandıktan sonra; lam ile multiprob sistemi kaydırılmadan dikkatli bir şekilde birbirinden ayrıldı.
- 72 °C'ye ayarlanan su banyosuna, 0.4XSSC solüsyonu konularak, gerekli sıcaklığa eriştikten sonra, lam bu solüsyon içerisinde 2 dakika bekletildi.
- Süre sonunda preparat; oda sıcaklığındaki (20-25 °C) 2XSSC / %0.05 Tween-20 (Sigma) solüsyonu içerisinde 30 saniye bekletildi.

Görüntüleme ve Sayım

- 2XSSC / %0.05 Tween-20 solüsyonundan çıkarıp, lamı dikey bir şekilde tutarak lamdaki fazla solüsyonun uzaklaştırılması sağlandı. Ama lamın tamamen kurumamasına dikkat edildi.
- Lamın her iki ucuna 20'şer µl DAPI-Antifade solüsyonundan damlatıldı.
- Lam, 24X60 mm boyutlarındaki lamel ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı.
- Daha iyi sinyal alınabilmesi için lam, floresan mikroskopunda incelemeden önce hibridizasyon kutusuna konularak +4 °C'de 10 dakika bekletildi.
- Lam, floresan mikroskopunda (Zeiss) incelendi. İlk önce DAPI filtresi kullanılarak uygun metafaz taraması yapıldı. Uygun metafaz tesbit edildikten sonra, kırmızı ve yeşil spektrumlu filtreler kullanılarak sinyaller gösterildi. Floresan mikroskopunda elde edilen görüntüler yüksek performanslı CCD Camera ile bilgisayar sistemine (Power Macintosh G3) aktarıldı. X kromozomu için kırmızı, Y kromozomu için yeşil ve 16 nolu kromozom için mavi sinyal kullanıldı (57).

3.2.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, 'graphpad instad 3' programı ile yapıldı. Grupların ortalama verileri normal dağılım göstermediğinden, istatistik analiz için non-

parametrik testlerden Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sigara ve alkol alan hasta sayılarının kıyaslanması ise Fisher's Exact Test (iki grubun kıyaslaması) ve Chi-square Testi (üç grubun kıyaslaması) ile yapıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak verildi. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışma ile Isparta yöresinde yaşayan ve infertilite nedeni ile hastanemize başvuran hastalar arasından Azospermi ya da şiddetli oligospermiye bağlı erkek faktör infertilitesi olan hastalardaki kromozomal anomalileri belirlendi. Bu amaçla yine benzer bir kontrol popülasyonun kromozomal anomali sıklığı araştırılmıştır.

Şubat 2005-Nisan 2007 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına ve tüp bebek merkezine başvuran 92 azospermik, 23 oligospermik infertil erkek birey ile normal semen analizine sahip 60 fertil erkek çalışmaya dahil edildi. Azospermik, oligospermik ve fertil erkeklerin yaşları (ortalama±SD) sırayla 32.05±7.17 (19-47), 33.34±6.35 (25-48) ve 32.7±6.5 (21-47) idi. Grupların yaş ortalamaları arasında anlamlı fark bulunamadı (p>0.05). Ortalama infertilite süresi azospermik hastalarda 7±4.6 yıl (0.4-24), oligospermik hastalarda 7.8±5.9 yıl (0.5-20) olarak bulundu. infertilite süreleri arasında istatistiki olarak anlamlı fark yoktu (p=0.76). Kontrol grubu hastaların ortalama çocuk sayısı 2±0.8 (1-4) idi. (Tablo 2).

Tablo 2. Hasta Gruplarının ve Kontrol Grubu Hastalarının Yaş Dağılımları, infertilite süreleri ve Çocuk Sayıları

*Hasta grupları ile kontrol grubu kıyaslaması, p>0.05.

** Azospermi grubu ile oligospermi grubu kıyaslaması, p=0.76

	Azospermi Grubu (n=92)	Oligospermi Grubu (n=23)	Kontrol Grubu n(60)
Yaş (yıl) (ortalama±SD; min-Max)	32.1±7.2;19-47	33.3±6.4; 25-48	32.7±6.5*; 21-47
infertilite süresi (yıl) (ortalama±SD; min-max)	7±4.6; 0.4-24	7.8±5.8**;0.5-20	-
Çocuk sayısı (ortalama±SD; min-Max)	-	-	2±0.8; 1-4

Hastaların % 34'ü memur, %28.6'sı işçi, %17.4'ü çiftçi, %16.5'i esnaf, %2.6'sı işsiz, %0.8'i öğrenciydi. Azospermi grubunda memur sayısı, oligospermi grubunda ise işçi sayısı en fazlaydı. Hastaların sperm bulgularına göre meslek

grupları tablo 3'de verildi. Önceden radyoterapi, kemoterapi görmüş hasta yoktu.

Tablo 3. Hastaların Sperm Bulgularına Göre Meslek Dağılımları

Meslek Grupları (n)	Azospermi grubu (n=92)	Oligospermi Grubu (n=23)	Toplam sayı (%)
Memur	34	5	39 (33.9)
Çiftçi	15	5	20 (17.4)
İşçi	26	7	33 (28.7)
Esnaf	14	1	15 (13)
İşsiz	2	1	3 (2.6)
Öğrenci	1	-	1 (0.8)

4.1. Klinik Bulgular

Azospermik hastaların 3 tanesinde bilateral inmemiş testis hikayesi, 4 tanesinde tek taraflı inmemiş testis hikayesi, 5 tanesinde sol varikozel operasyonu hikayesi ve 1 tanesinde cinsel yolla bulaşan hastalık (üretit) hikayesi mevcuttu. Oligospermik hastaların 6 tanesinde varikozel operasyonu hikayesi, 1 tanesinde postpubertal kabakulak orşiti hikayesi ve 1 tanesinde epididim kisti hikayesi vardı. Azospermi grubunda inmemiş testis hikayesi olan hasta sayısı en fazla iken, oligospermi grubunda varikozel ameliyatı olan hasta oranı fazlaydı (Tablo 4).

Tablo 4. Hasta Gruplarının Genital Sistemle İlgili Geçirilmiş Hastalık Hikayeleri

Hastalık Grupları	Azospermi Grubu (n=92)	Oligospermi Grubu (n=23)
Bilateral inmemiş testis	3	-
Unilateral İnmemiş Testis	4	-
Varikozel	5	6
Üretit	1	-
Epididim Kisti	-	1
Orşit	-	1
Toplam	13	8

Geçmişte ve şimdi sigara içme prevalansı azospermik grupta % 57.6, oligospermik grupta % 56.5, normal fertil kontrol grubunda ise %13.3 olarak bulundu. Hasta grupları arasında sigara içme oranları açısından istatistiki fark yoktu (p=1). Fakat kontrol grubu hastalarda sigara içme oranı anlamlı olarak daha düşüktü (p<0.0001). Azospermik grupta 10 hasta (%10.8), oligospermi grubunda 2 hasta (%8.7) ve kontrol grubunda 2 kişi (%3.3) hafif-orta miktarda düzenli alkol kullanıyordu. Hasta grupları arasında alkol kullanma oranları açısından istatistiki bir fark bulunamadı (p=1). Ayrıca hasta grupları ile kontrol grubu hastalar arasında da alkol kullanma sıklığı açısından istatistiki fark gözlenmedi (p=0.2) Hasta ve kontrol gruplarının sigara ve alkol kullanma sıklıkları tablo 5'de gösterildi.

Tablo 5. Hasta gruplarının ve kontrol grubunun sigara, alkol kullanma sıklıkları

* Oligospermi grubu ile azospermi grubu kıyaslaması, p=1; ** Oligospermi grubu ile azospermi grubu kıyaslaması, p=1; *** Kontrol grubu ile hasta gruplarının kıyaslaması, p<0.0001; ****Kontrol grubu ile hasta gruplarının kıyaslaması, p=0.2

Alışkanlıklar	Azospermi Grubu (n=92)	Oligospermi Grubu (n=23)	Kontrol Grubu (n=60)
Sigara kullanan hasta sayısı / toplam hasta sayısı (%)	53/92 (%57.6)	13/23 (%56.5)*	8/60 (%13.3)***
Alkol kullanan hasta sayısı /toplam hasta sayısı (%)	10/92 (%10.8)	2/23 (%8.7)**	2/60 (%3.3)****

4.2. Hormon Analizi

Hastaların serum FSH, LH, testesteron ve prolaktin düzeyleri tablo 7'de verildi. Azospermik ve oligospermik grubun FSH ve LH düzeyleri sırayla 19.5 ± 11 , 10.8 ± 5.3 ve 13.4 ± 12.3 , 7.1 ± 5.6 IU/L idi. Azospermik grupta hem FSH hem de LH oligospermik gruptan anlamlı olarak yüksekti (sırayla p=0.01 ve p=0.005). Buna rağmen azospermik ve oligospermik hasta grupları arasında testesteron ve prolaktin düzeyleri benzer değerlerde bulundu (sırayla p=0.4, p=0.8) (Tablo 6).

Tablo 6. Hasta Gruplarının FSH, LH, Testesteron ve prolaktin Düzeyleri

*Azospermi grubu ile oligospermi grubunun kıyaslaması

	Azospermi Grubu (n=92)	Oligospermi Grubu (n=23)	P Değeri*	Tüm hastalar (n=115)
FSH (ort±SD, min-Max) (IU/mL)	19.5±11; 4-48	13.4±12.3; 3.4-49.4	P=0.01	18±11.6; 3-49.4
LH (ort±SD, min-Max) (IU/L)	10.8±5.3; 3-26.5	7.1±5.6; 2-23	P=0.005	10±5.5; 2-26.5
Testesteron (ort±SD,min- Max) (ng/mL)	6.4±4.9; 0.8-31	5.3±3.1; 2-12.6	P=0.4	6.2±4.7; 0.8-31
Prolaktin(ort ±SD, min- Max) (ng/mL)	12.02±5.3; 5.2-25.2	12.3±5.6; 6.7-28	P=0.8	12.1±5.4; 5.2-28

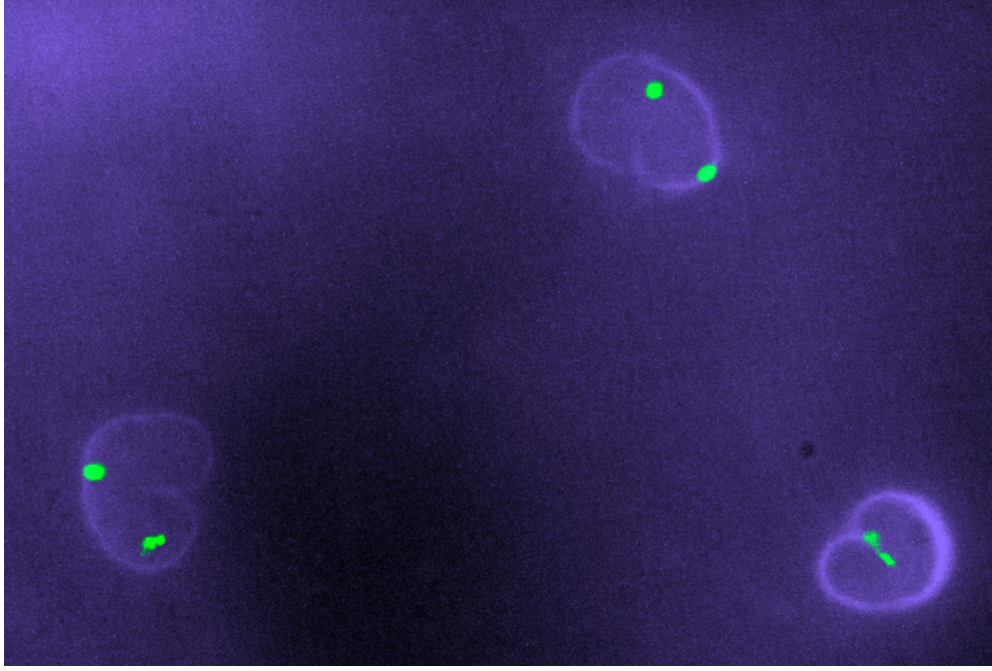
4.3. Sitogenetik Analiz

Azospermik vakaların 5 tanesinde sayısal kromozom düzensizliği bulundu (%4.3). 4 hasta 47, XXY mozaik karyotipine (Klinifelter sendromu) sahipken kalan 1 hasta 46 XX kromozomal yapıya (gonadal disgenezi) sahipti. Kromozomal anomalili hastaların genel özellikleri tablo 7’de özetlendi. Oligospermik hastalar ve kontrol grubu bireylerde sayısal ve yapısal kromozom değişikliği saptanmadı.

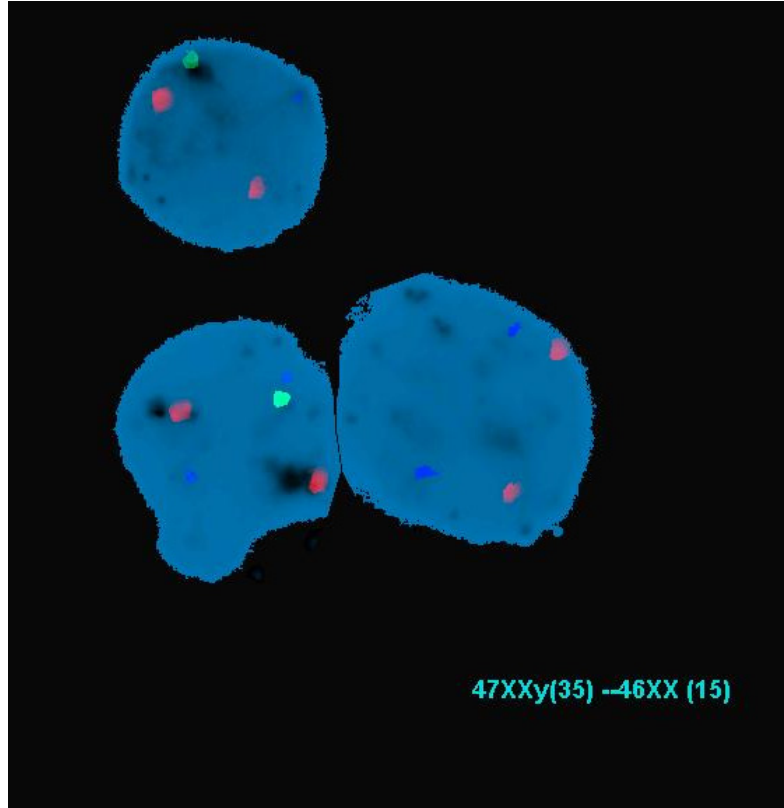
Tablo 7. Azospermik ve oligospermik hastalarda kromozom anormallikleri

Vaka No	Yaş	Sigara/ Alkol	FSH/LH	Ürogenital anormallik	Karyotip	Semen Sayısı
Vaka 1 (CD)	25	+/+	17.4/10.2	Varikozel operasyonu	46, XY 46, XX 47, XXY Mozaik	azospermi
Vaka 2 (MA)	45	+/-	21.3/13.2	-	46, XX	azospermi
Vaka 3 (RE)	32	-/-	16.2/11.5	-	46, XX 46, XY 47, XXY 45, X Mozaik	azospermi
Vaka 4 (HŞ)	34	-/-	18.6/10.5	-	46, XY 47, XXY Mozaik	azospermi
Vaka 5 (EY)	36	-/-	17.3/11.7	-	46, XY 47, XXY Mozaik	azospermi

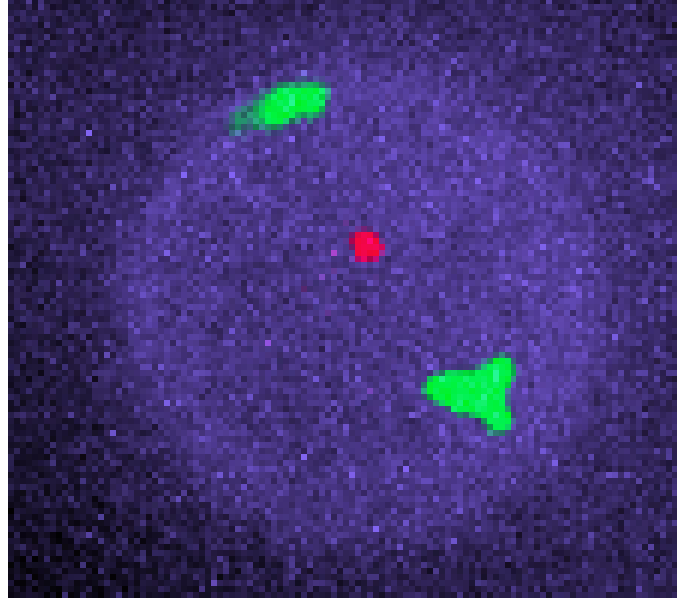
Sayısal kromozom değişikliği olan ilk olgu 25 yaşında sigara ve alkol alışkanlığı olan, FSH ve LH seviyeleri yüksek normal fiziksel görünümde bir hastadır. Her iki testisi hipoplazik olan hasta daha önce varikozel nedeni ile opere olmuştu. Hastanın GTG bantlama yöntemi uygulanmış metafazlarında yapılan analiz sonucu karyotipinin 46, XX/47, XXY mozaik olduğu gözlemlendi. Mozaizim oranını belirlemek ve bulgumuzu desteklemek için hastanın preparatlarına FISH uygulandı. Hastanın preparatlarında FISH analizi sonucu 100 interfaz nükleusu sayıldı ve karyotipi %30 46, XX ve %70 47, XXY olarak belirlendi. Bu hastanın FISH görüntüsü şekil 5,6 ve 7’de gösterildi.



Şekil 5. 46, XX/ 47, XXY bir olgunun FISH görüntüsü

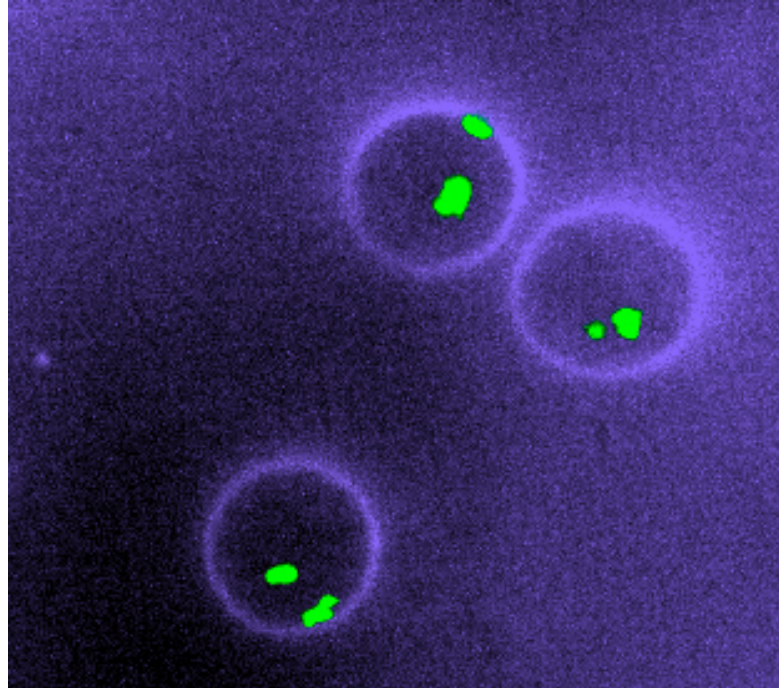


Şekil 6. 46, XX/47, XXY kromozom kuruluşunda infertil olgu

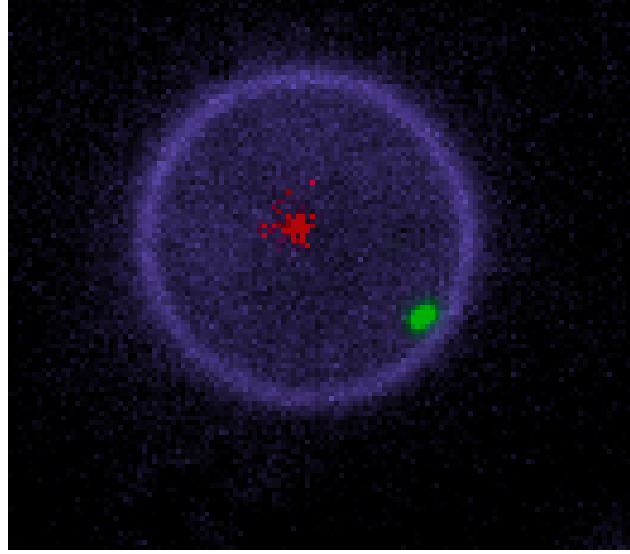


Şekil 7. 46, XX/47, XXY mozaik Klinifelter Sendromlu bir nolu vakanın FISH görüntüsü

Erkek fenotipinde, sekonder seks karakterleri olan iki nolu vakamız 46, XX kromozomal kuruluşa sahipti. Gonadal disgenezi düşünülen 45 yaşındaki hasta azospermikti ve sigara kullanıyordu. Vakanın plazma FSH ve LH düzeyleri yüksekti. Testisleri ileri derecede atrofikti. Bu hastanın FISH görüntüsü şekil 8 ve 9’da gösterildi.

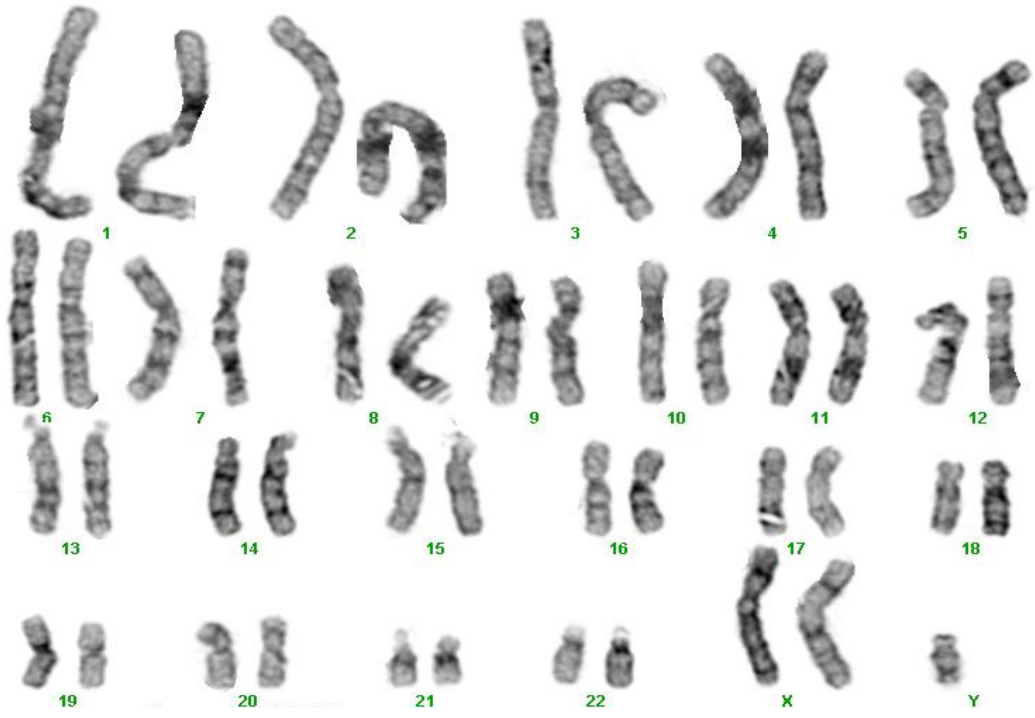


Şekil 8. 46, XX erkeğin FISH fotoğrafları

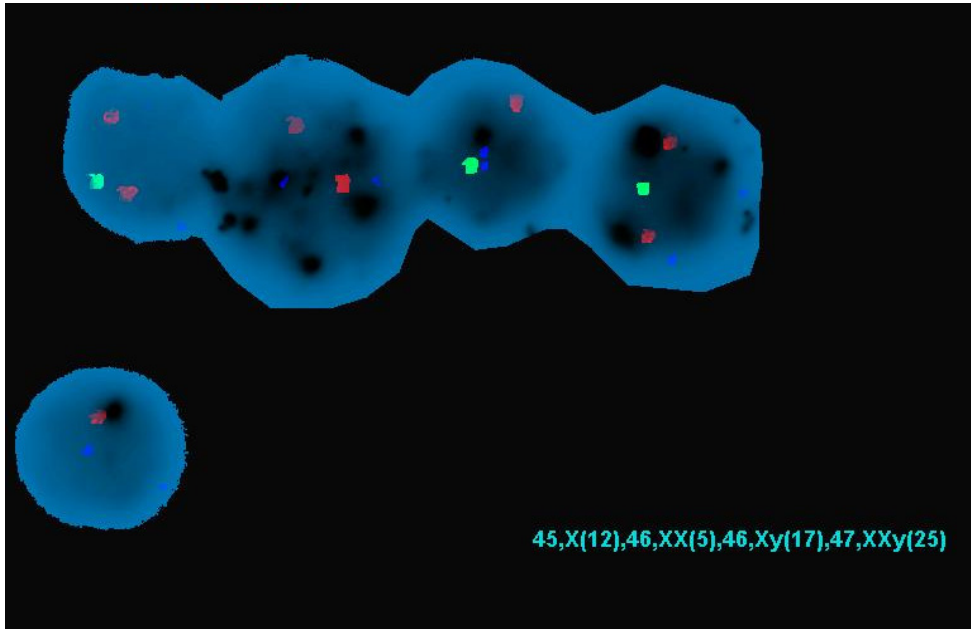


Şekil 9. 46, XX erkeğin FISH fotoğrafları

3 numaralı hastamız 32 yaşında, sigara/alkol alışkanlığı olmayan ve ek bir genital patoloji hikayesi taşımayan azospermili bir olguydu. Plazma FSH ve LH düzeyleri yüksekti. Hastanın GTG bantlama yöntemi uygulanmış metafazlarında yapılan analiz sonucu karyotipinin 46, XX/46, XY ve 47, XXY/45, X mozaik olduğu gözlemlendi. Mozaizim oranını belirlemek ve bulgumuzu desteklemek için hastanın preparatlarına FISH uygulandı. Hastanın preparatlarında FISH analizi sonucu 100 interfaz nükleusu sayıldı ve karyotipi %9 oranında 46, XX, %25 oranında 46, XY, %50 oranında 47, XXY ve %16 oranında 45, X mozaizmine sahipti. Olgu Turner sendromunun tüm fiziksel özelliklerini taşıyordu. Kısa boylu (150 cm) olan hastada, testisler hipoplazik, sekonder seks karakterleri gelişmemiş ve jinekomasti mevcuttu. Bu hastanın karyotipi şekil 10'da, FISH görüntüsü şekil 11'de gösterildi.

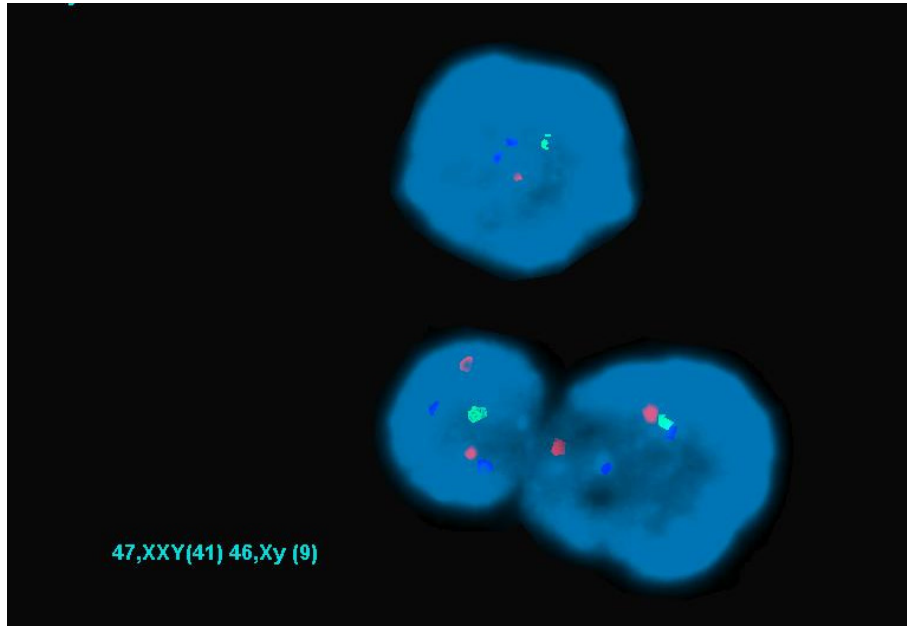


Şekil 10. 46, XX/46, XY/47, XXY/45, X mozaik karyotipinde üç nolu infertil erkek olgunun karyotip örneği

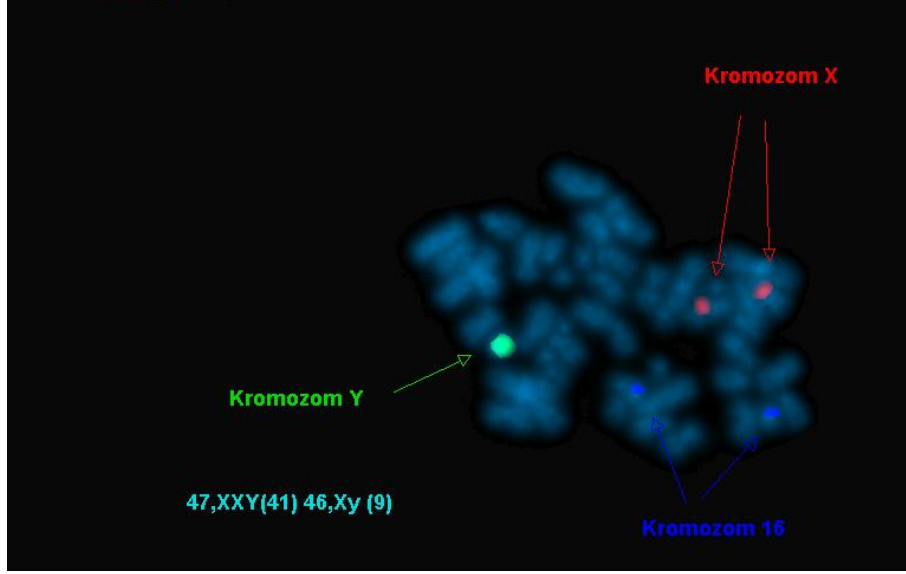


Şekil 11. 46, XX/46, XY/47, XXY/45, X mozaik karyotipinde üç nolu infertil erkek olgunun FISH görüntüsü

34 yaşında, azospermik 4 nolu olgunun FSH/LH miktarı 18.6/10.5 olarak belirlendi. Oldukça uzun boy ve ekstremitelere sahip hasta, Klinefelter Sendromunun bir çok özelliğini taşıyordu. Jinekomasti ve hipoplazik testislere sahipti. Hastanın GTG bantlama yöntemi uygulanmış metafazlarında yapılan analiz sonucu karyotipinin 46, XY/47, XXY mozaik olduğu gözlemlendi. Mozaizim oranını belirlemek ve bulgumuzu desteklemek için hastanın preparatlarına FISH uygulandı. Hastanın preparatlarında FISH analizi sonucu 100 interfaz nükleusu sayıldı ve karyotipi %18 oranında 46,XY ve %82 oranında 47, XXY olarak belirlendi. Bu hastanın FISH görüntüsü şekil 12 ve 13'de gösterildi.

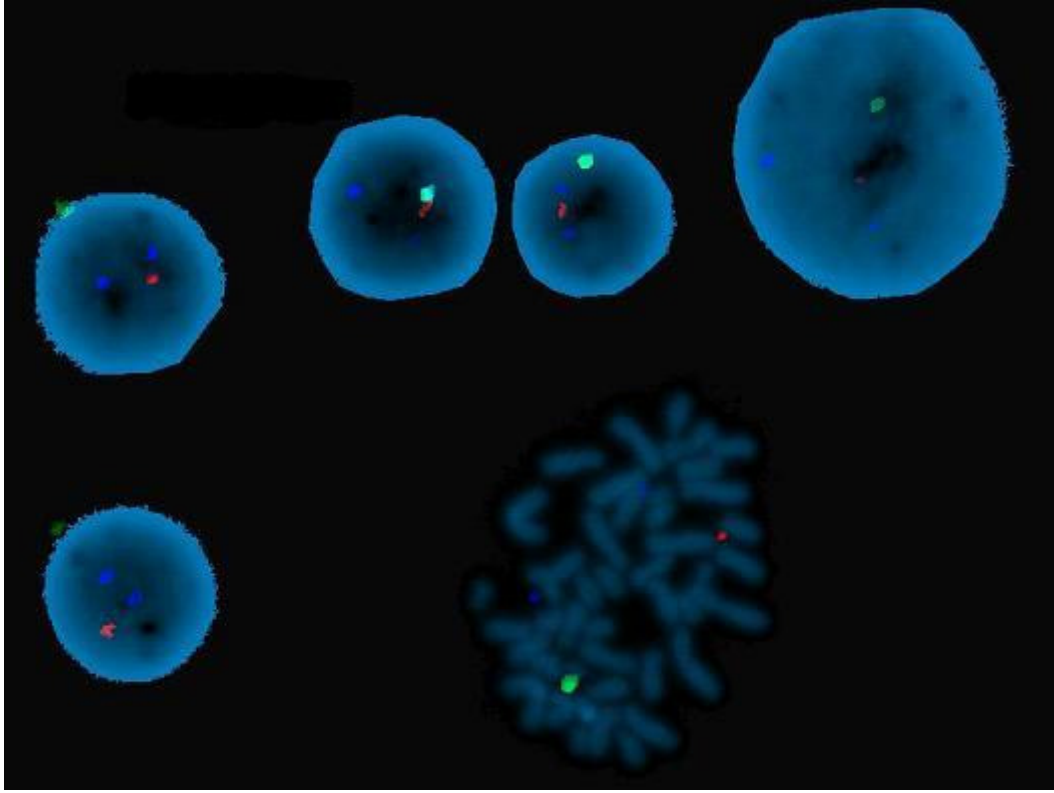


Şekil 12. 46,XY/47,XXY infertil olgunun interfaz nükleuslarının FISH görünümü



Şekil 13. 46, XY/47, XXY kromozom kuruluşunda infertil olgunun metafaz nukleuslarında uygulanan FISH görüntüsü

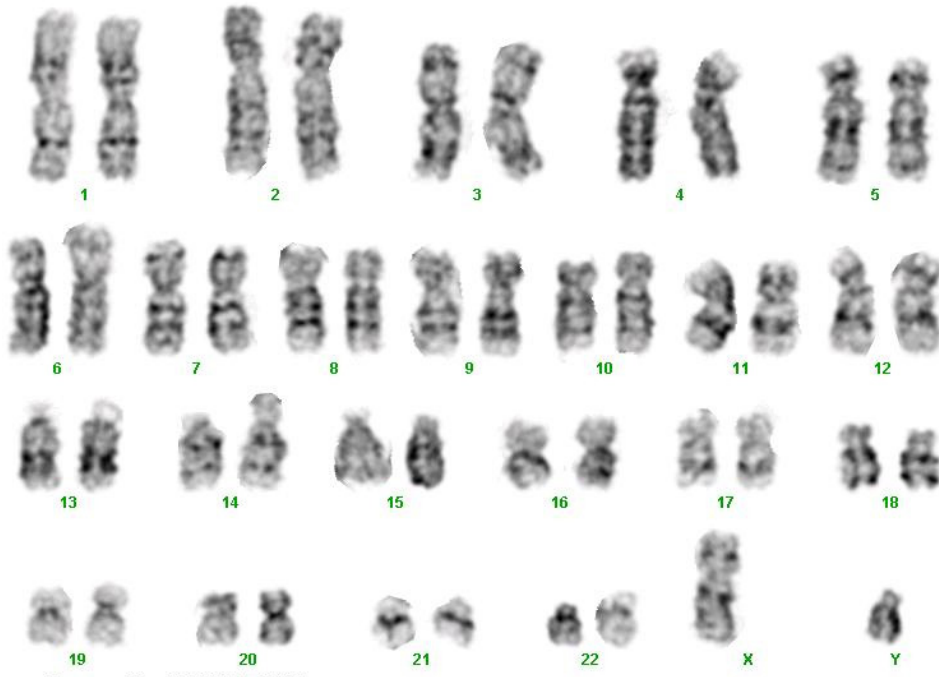
Sayısal kromozom değişikliği saptanan son olgumuz 36 yaşında ve azospermik bir bireydi. FSH/LH düzeyleri 17.3/11.7 olarak belirlendi. Fenotipik olarak normal olan olgunun GTG bantlama uygulanmış preparatlarında yapılan analiz sonucunda 47, XXY karyotipine sahip olduğu gözlemlendi. Preparatlara FISH uygulandı. 100 interfaz çekirdeği sayımından sonra %98 oranında 46, XY; % 2 oranında ise 47, XXY mozaizmine sahip olduğu belirlendi, hastaya ait interfaz ve metafaz nukleuslarının FISH görüntüsü şekil 14’de gösterildi.



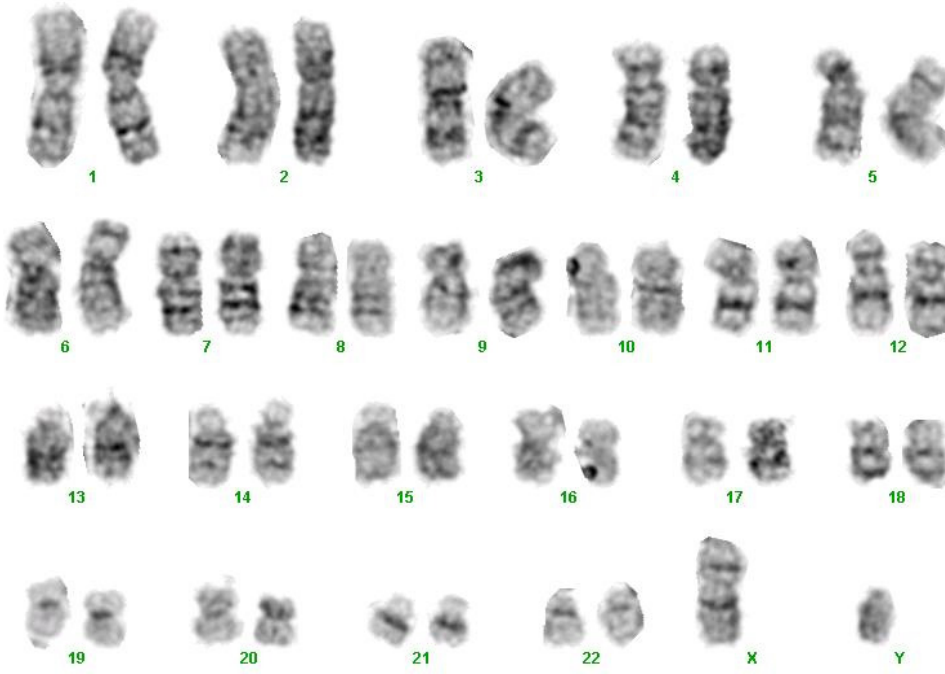
Şekil 14. 46, XY/47, XXY kromozom kuruluşuna sahip infertil olgunun FISH görünümü



Şekil 15. 46, XY normal karyotipli infertil vaka



Şekil 16. 46, XY kromozom kuruluşunda infertil erkek karyotipi



Şekil 17. 46, XY normal kromozom kuruluşuna sahip infertil erkek hastanın karyotipi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Azospermi ve şiddetli oligozoospermi, sperm kanallarında tıkanıklık, kriptorşidizm (inmemiş testis), endokrin rahatsızlıklar, infeksiyon, varikozel, kabakulak orşiti gibi pek çok durumla ilişkili olabilir (58,59). Buna rağmen, vakaların yaklaşık %30'unda erkek infertilitesinin nedeni hala bilinmemektedir (5). Bu hastalarda en olası sebep genetik bozukluklardır. Bu nedenle kromozom anomalileri, Y kromozom mikrolelesyonları, kistik fibrozis gen defektleri gibi genetik bozukluklar bu grup hastalarda etiyolojik faktör olarak araştırılmalıdır (6). Obstruktif azospermi düşünülen ve özellikle duktus deferensleri palpe edilemeyen, testisleri normal görünümde olan hastalarda kistik fibrozis gen defektleri, nonobstruktif azospermi ya da şiddetli oligospermi düşünülen hastalarda ise kromozomal anomaliler ve Y kromozomu mikrolelesyonları etiyolojik faktör olarak dikkate alınmalıdır.

Sitogenetik anomalilerin insidansı infertil erkeklerde %5.8 ve normal erkek popülasyonda ise yalnız %0.5 olarak bildirilmektedir (41). Son yıllarda ICSI tedavisi ile kromozomal anomalisi olan erkeklerin baba olmaları sağlanmaktadır. Buna rağmen, bu tür anomalilerin bu erkeklerin erkek çocuklarına geçerek gelecek jenerasyonlarda infertiliteye sebep olma olasılıkları yüksektir (60).

Bizim prospektif çalışmamızın ana amacı bölgemizdeki nonobstruktif azospermi ve şiddetli oligospermili infertil erkekler arasında sitogenetik anomalilerin oranını belirlemektir. Sitogenetik anomaliler standart sitogenetik metodlarla araştırıldı (61).

Erkek infertilitesinde genetik faktörlerin önemi geçmiş yıllarda pek çok çalışma ile belirlenmiştir. (62-70). 6982 vakanın yer aldığı oldukça geniş serili bir çalışmada erkek infertilitesi ve bazı kromozomal anomaliler arasındaki ilişki araştırılmış, infertil erkeklerde kromozomal anomalilerin sıklığı %5.3 bulunurken, tüm popülasyondaki kromozomal anomali sıklığı %0.6 olarak bildirilmiştir (62). Çalışmalarda infertil popülasyonda gonozomal ve otozomal kromozomal anomali sıklığı normal popülasyona göre sırasıyla 15 ve 6 kat fazla

bulunmuştur (3,4). Azospermik hastalarda kromozomal anomali oranları %12.5 ila %31 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir (4,41,66-70).

Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalardan birinde 28 azospermik ve 32 oligospermik hastanın kromozomal incelenmesi yapılmıştır ve kromozomal anomali sıklığı azospermik hastalarda %4 olarak bulunurken oligospermik hastalarda kromozom anomalisine rastlanılmamıştır. Fakat çalışmada oligospermi grubunu oluşturan hastaların şiddetli oligospermik mi yoksa hafif oligospermik mi olduğu belirtilmemiştir. Bu belirsizlik, oranları tartışılır hale getirmektedir. Yine ülkemizde yapılan 18 azospermik ve 10 oligospermik hastanın değerlendirildiği az vakalı bir çalışmada kromozomal anomali saptanmamıştır (71). Fakat bu çalışmada vaka sayısının yetersiz olması kesin bir sonuç çıkarmayı engellemektedir. Ülkemizde, kromozomal anomali sıklığı hakkında fikir edinmek için daha geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır. Son zamanlarda yapılan geniş kapsamlı bir çalışma non-obstruktif azospermili hastaların kromozomal anomali sıklığı ile ilgili oldukça faydalı bilgiler vermektedir. Geniş bir hasta serisinin değerlendirildiği retrospektif çalışmada 383 non-obstruktif azospermi vakasının sitogenetik sonuçları bildirilmiştir (72). Nonobstruktif azospermili 47 vakada (%12) kromozomal anomali saptanmıştır. Bu anormalliklerin 9'unun (%19) otozomal, 38'inin (%80) gonozomal olduğu bildirilmektedir. Otozomal kromozom anomalilerinin 2'si, 13-14 ve 14-22 nolu kromozomların Robertsonian translokasyonudur. %1.6 sıklıkta görülme oranı ile Robertsonian translokasyon infertil erkeklerde bulunan en sık otozomal kromozomal anomalidir. Robertsonian translokasyonlara özellikle oligospermili infertil erkeklerde sık rastlanmaktadır. Bu anomalinin sıklığı azospermik ve fenotipik olarak normal yenidoğan erkeklerde sırayla %0.09, %0.08 olarak bildirilmektedir (73,74,75). Çalışmada 3 azospermik vakada kromozom 1,5 ve 9 da inversiyon bildirilmektedir. Bugün kromozom 9'un inversiyonu polimorfizm olarak kabul edilmektedir (74). Kromozom 1'deki inversiyonun da spermatogenezis üzerine hiçbir negatif etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (76). Çalışma grubumuzda ise 92 azospermik infertil vakanın 5 tanesinde (%4.3) kromozomal anomali saptandı. Şiddetli oligospermi (23 hasta) ve kontrol grubu (60 vaka) hastalarının hiçbirinde kromozomal anomaliye rastlanmadı.

Azospermi grubunda %5.4 (5 vaka/92 azospermik vaka) olarak belirlediğimiz kromozomal anomali sıklığı diğer çalışmalarda bildirilen %12.5-31 ve ülkemizdeki %12 oranından düşüktür (72).

Tayvan' da yapılan bir çalışmada 50 azospermik ve 80 oligospermik infertil erkek ile 50 kontrol bireyin kromozom anomali sıklığı %4.6 (azospermi grubu %10, oligospermi grubu %1.3) olarak bulunmuştur (61). %4.6 kromozomal anomali oranı çalışmamızdaki veriler (% 4.3) ile uyumludur. Bu çalışmada bizim çalışmamız gibi prospektif bir çalışma olup, belirli bir bölgedeki toplumsal kromozomal sıklığı belirlemeyi amaçlamıştır. Çalışmanın, bizim çalışmamızdan farkı, azospermik hastaların daha az, oligospermik hastaların daha fazla sayıda olmasıdır. Azospermik hastalarda, oligospermik hastalara göre kromozomal anomali sıklığı daha fazladır. Tayvan çalışma grubuna göre, araştırmamızdaki azospermik hasta sayısı daha fazla olduğu için (50 ye karşılık 92 hasta), kromozomal anomali sıklığının serimizde daha fazla olması gerekirdi. Fakat her iki serideki oranlar benzer bulunmuştur. Yani bölgemizdeki azospermik ve oligospermik vakalarda etiyolojik faktör olarak belirlenen kromozomal anomali sıklığı oranı (%4.3), hem başka ülkelerde bildirilen hem de ülkemizde bildirilen oranlardan daha düşüktür. Tayvan'da yapılan çalışmada 130 hastanın 6 tanesinde saptanan kromozomal anomalinin 2 tanesi translokasyon, 4 (%66) tanesi Klinefelter Sendromudur. Klinefelter sendromu bu çalışmada en sık rastlanan kromozomal anomalidir.

Şamlı ve arkadaşları çalışmalarında, gonozomal kromozomal anomalili 38 azospermik erkeğin %66'sında regüler tipde, %10'unda mozaik tipte Klinifelter sendromu (47, XXY) saptamışlardır. Azospermik hastalarda bulunan en sık gonozomal kromozomal anomalinin %7 ile Klinifelter Sendromu olduğu bildirilmiştir (72). Diğer bir çalışmada Klinifelter Sendromunun azospermik hastalarda bulunan en sık gonozomal kromozomal anomali olduğu bildirilmektedir (41,61). Çalışma grubumuzda ise hiçbir hastada otozomal kromozomal anomaliye rastlanmamıştır. Gonozomal kromozomal anomali 5 vakada (%100) belirlenmiştir. Bunlardan 4 tanesi (%80) Klinifelter sendromudur ve bu vakaların hepsi mozaik tiptedir. Azospermik hastalarda belirlediğimiz

gonozomal kromozomal anomaliler, ülkemiz ve dünya literatüründe de belirtilen major kromozomal anomalidir.

5. vakamız 46, XX karyotipinde erkek hastadır. Bu karyotipdeki bir hastanın erkek yönünde gelişmesi için Y kromozomunun kısa kolunda bulunan SRY genine sahip olması gerekmektedir (10, 20) (Şekil 3). Olguların %80'inde Y kromozomu üzerindeki testis/cinsiyet belirleyici bölgeye ait (SRY Yp üzerinde yer alır) bir fragmanın X kromozomu üzerindeki homolog bölgeye translokasyonu görülmektedir (77,32). Bir hipoteze göre X kromozomunda otozomal testis belirleyici gen olarak bilinen *SRVX* geninin mutasyon veya delesyonu sonucu SRY-negatif olan hastalar oluşmaktadır (78,33). Her iki halde de hastalar azospermiktir ve erkek fenotipine rağmen sperm üretimi gerçekleşmemektedir. Bu hastaların Y kromozomu olmadığı için, Y kromozomunun uzun koluna lokalize olan ve spermatogenezi kodlayan genleri taşıyan AZF bölgeleri de yoktur (20,24) (Şekil 8 ve 9). AZF bölgesinin olmaması nonobstruktif azospermi ile sonuçlanmaktadır (20, 24). 46, XX karyotipine sahip hastamız, erkek fenotipinde, evli, cinsel yaşamı normal ve azospermikti.

Oligospermik erkeklerde kromozomal anomali sıklığı pek çok çalışmada %1.8-6.9 olarak bildirilmiştir (4,41,67-69). Şamlı ve arkadaşları, 436 oligospermik hastanın 20'sinde (%4) kromozomal anomali olduğunu saptamışlardır (72). Bu anomalilerin 8'inin (%40) otozomal ve 12'sinin (%60) gonosomal olduğu belirtilmiştir. 3 (%0.7) vakada polimorfizm olarak kabul edilen kromozom 9'da inversiyon (13,30,33), 3 (%0.7) vakada kromozom 13 ve 14'ü içeren Robertsonian translokasyon ve 2 (%0.5) vakada otosomal kromozomları içeren resiprokal translokasyon saptamışlardır. Bir başka çalışmada oligospermik hastalar için resiprokal translokasyon sıklığı %0.6 olarak bildirilmektedir (41). Şamlı ve arkadaşlarının çalışmasında gonozomal kromozomal anomalili 12 oligospermik vakanın 4'ünde (%0.9) Klinifelter Sendromu saptanırken diğer bir çalışmada oligospermili erkeklerde 47 XXY karyotipinin sıklığı %0.7 olarak bildirilmektedir (77,79).

Çalışma grubumuzda 115 infertil vakanın 23 tanesi şiddetli oligospermiye (<5milyon/ml) sahipti. Vakaların hiç birinde kromozomal anomaliye rastlanmadı.

Çalışma grubumuzda oligospermik hastaların oranının düşük olması kesin sonuç çıkarmayı engellemektedir. Bu grupta etiyolojik faktör olarak varikozel operasyonu hikayesine sahip hasta oranı oldukça yüksekti (6/23). Bir hastada geçirilmiş kabakulak orşiti hikayesi ve başka bir olguda epididim kisti mevcuttu. Bu grupta genetik faktörler dışındaki olası etiyolojik faktörlerin fazla olması kromozomal anomali sıklığını düşürmüş olabilir.

Çalışma grubumuzda en dikkat çekici bulgulardan biri kontrol grubuna göre infertil grupta sigara içme oranının anlamlı olarak yüksek olmasıydı ($p<0.0001$). Sigara içme oranı azospermi grubunda %57.6, oligospermi grubunda %56.5 ve kontrol grubunda %13.3 olarak saptandı. Azospermik ve oligospermik hasta grupları arasında sigara içme oranları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=1$). Son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada da infertil hasta grubunda (azospermili ve oligospermili) kontrol grubuna göre sigara içme oranının yüksek olduğu bulunmuştur (Azospermik grupta %40, oligospermik grupta %32.5 ve kontrol grubunda %10) (61). Fakat sigara kullanımının erkek germ hücrelerine gonodoksik etkisi olup olmadığının ilave çalışmalarla belirlenmesi gerekmektedir. Bizim serimizde alkol kullanma oranları azospermi grubunda %10.8, oligospermi grubunda %8.7 ve kontrol grubunda %3.3 idi. İnfertil grupta alkol alım oranları daha yüksek olmasına rağmen, arada istatistiki olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0.2$). Diğer bir çalışmada da alkol kullanma oranları hem azospermik hastalarda hem de oligospermik hastalarda %20 olarak bildirilmiştir (61). Bizim serimizde, alkol kullanma oranlarının hem hasta hem kontrol grubunda düşük olmasında, yaşam tarzı, gelenekler ve dini engellerin etken olduğunu düşünmekteyiz.

Azospermik grupta FSH ve LH düzeyleri, sırasıyla 19.5 ± 11 ve 10.8 ± 5.3 mIU/ml iken oligospermik grupta, sırasıyla 13.4 ± 12.3 ve 7.1 ± 5.56 mIU/ml'dir. Bu değerler normal FSH (1.5-12.4 IU/L) ve LH (1.7-8.6 IU/L) düzeylerinden oldukça yüksekti. Fonksiyonel testisten salgılanan inhibin (FSH'ı kontrol eder) ve testesteron (LH'ı kontrol eder) gibi hormonlar, hipofizer hormonların salınımını kontrol ederler. Hasta gruplarında testisküler fonksiyonun bozuk olması, negatif feed-back ile çalışan hipofizer hormonların (FSH, LH) yükselmesine yol açabilir. Azospermik grupta hem FSH hem de LH oligospermik gruptan anlamlı olarak

yüksekti (sırayla $p=0.01$ ve $p=0.005$). Buna rağmen testesteron ve prolaktin düzeyleri azospermik (sırayla, 6.4 ± 4.9 ve 12 ± 5.3 ng/ml) ve oligospermik (sırayla, 5.3 ± 3.1 ve 12 ± 5.6) hasta grupları arasında benzer değerlerde bulundu (sırayla $p=0.4$, $p=0.8$). Ayrıca bu değerler normal referans değerleri (prolaktin:4.1-18.4, testesteron:2.8-8 ng/ml) içindedir. Testesteron testisin leyding hücrelerinden salgılanır. Fakat testisin interstisyumunda yer alan leydig hücreleri spermatogeneze göre dış ortama ve hastalıklara dayanıklıdır. Yani testis volümü çok azalsa bile yeterli testesteron üretimi sağlanmaktadır. Vutyavanich ve arkadaşları bulgularımıza benzer şekilde azospermik hasta grubunda FSH ve LH'un oligospermik gruptan anlamlı olarak yüksek olduğunu ($p=0.001$) (61), prolaktin ve testesteron düzeylerinin ise azospermik ve oligospermik hastalar arasında benzer olduğunu bulmuşlardır ($p=0.7$) (61). FSH düzeyi testisteki spermatogenezin seviyesi ile ters orantılıdır. Testisteki spermatogenez bozuldukça, FSH düzeyi artmaktadır. LH düzeyide testisin interstisyumunda bulunan leyding hücrelerinin fonksiyonel durumu ile yakın ilişki içindedir. Leyding hücreleri azaldıkça LH düzeyi artar. FSH ve LH düzeyindeki artış testisteki spermatogenez ve testesteron üretiminin bozuk veya yetersiz olduğunun habercisidir. Çalışmamızda azospermik grupta FSH ve LH düzeylerinin oligospermik gruptan daha yüksek bulunması, azospermik grupta testis fonksiyonunun daha bozuk olduğunu düşündürmektedir.

Çalışma grubumuzda kriptorşidizm (inmemiş testis) hikayesi olan 7 hasta (4 tek taraflı, 3 çift taraflı) vardı ve hepsi azospermikti (Tablo 4). Bu hastaların hiçbirinde kromozomal anomali saptanmadı. Bu, hem Vutyavanich ve arkadaşlarının hem de Fagerli ve arkadaşlarının bulguları ile uyumluydu (61,78,80). Fagerli ve arkadaşları, 38 adet kriptorşidizm hikayesi olan hastanın hiçbirinde kromozomal bozukluk ve Y delesyonu saptamamışlardır. Diğer bir çalışmada ise inmemiş testis hikayesi olan hastalarda kromozomal anomali saptanmıştır (79,81). Araştırmaya katılan azospermili 5 bireyin ve oligospermili 6 bireyin varikosel operasyon hikayesi vardı (Tablo 4). Azospermi grubunda bir varikoselli hastada kromozomal anomali saptadık (Tablo 8). Simoni ve arkadaşları da varikoseli olan hastalarda kromozomal bozukluk bildirmişlerdir

(79,81). Bulgular, varikosele sahip hastalarda infertilitenin sebebinin varikozel olmayıp kromozomal bozukluğa bağlı olduğunu göstermiştir.

Azospermi ve oligosperminin diğer genetik sebepleri, Y kromozom mikrolelesyonları (%3-19), androjen reseptör geninde mutasyonlar ya da polimorfizm olabilir. Y kromozomu mikrolelesyonları spermatogenetik yetmezliğin en sık sebeplerinden birisidir. İdiyopatik azospermide %15-20, idiyopatik oligospermide %7-10 oranında rastlanmaktadır (59-61). Son yıllarda sebebi bilinmeyen infertil erkeklerin %35'inden fazlasında azospermi ve oligospermiye androjen reseptör geninde oluşan mutasyon ya da polimorfizimlerin de sebep olduğu bildirilmektedir (80,82). Androjen reseptörünün transaktivasyon domaininde trinükleotid tekrar (CAG) artışı olması ile anormal spermatogenez arasında ilişki olduğu bulunmuştur (80,82).

Kromozom anomalisi olan bireylerin sahip olduğu anormal genetik iğerikli gametler, ovumun fertilizasyonu iğer yapılan yardımcı üreme teknik işlemleri esnasında kullanılabilir. Bu nedenle bu işlem iğer başvuran çiftlerin detaylı pedigrisi ile genetik konsültasyon işlemlerine ve sitogenetik analizleri iğereren pek çok laboratuvar testlerine alınması önemlidir. İntrastoplazmik sperm injeksiyonu gibi yardımcı üreme teknik işlemleri uygulanmadan önce, rutin olarak sitogenetik incelemenin yapılması gerekir (53).

Sonuç olarak, hasta grubumuzda belirlenen %4.3'lük kromozomal anomali sıklığı literatüre göre düşük gözükmektedir. Fakat literatürde bildirilen rakamlar genelde retrospektif çalışmaların bulgularıdır ve bu literatürlerin hasta seçim kriterleri çok farklıdır. Bu nedenle bölgesel ve ülkeler arası farkları ortaya çıkarmak iğer geniş kapsamlı prospektif, homojen çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda 115 infertil (nonobstruktif azospermili ve şiddetli oligospermili) hasta ile 60 kontrol bireyi prospektif olarak değerlendirdik. Azospermik grupta etiyolojik faktör olarak 5 hastada (%5.4) kromozomal anomali saptamamız belirli anormalliği olmayan oligospermik ve azospermik hastalarda kromozomal anomali bulunup bulunmadığının test edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

6. ÖZET

Çalışmanın amacı bölgemizdeki nonobstruktif azospermi ve şiddetli oligospermili infertil erkekler arasında kromozomal anomalilerin oranını belirlemektir. Bu amaçla Isparta yöresinde yaşayan ve infertilite nedeni ile Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına ve tüp bebek merkezine başvuran 92 azospermili, 23 şiddetli oligospermili (sperm sayısı <5 milyon/ml) hastada kromozomal anomaliler araştırıldı. Ayrıca, normal semen analizine sahip benzer yaş grubunda ve çocuğu olan 60 fertil erkeğin periferik kan örneklerinde de kromozomal anomaliler araştırıldı.

Sitogenetik anomaliler standart sitogenetik metodlarla belirlendi. Hastalara ve kontrol grubu bireylere ait periferik kan lenfositlerinin kültürleri 72 saatlik inkübasyon periyodundan sonra 0.1 mikrogram/mL kolşisin ile muamele edildi. Prometafaz kromozomlar ayrıldı ve standart G ve CBG bantlama teknikleri kullanarak boyandı. Her kişi için en az 25-50 metafaz analiz edildi

İnfertil hastaların 5 tanesinde (%4.3) sayısal kromozomal anormali bulundu. Bu hastaların hepsi azospermik hasta grubunda idi (5/92 hasta, %5.4). 4 hasta 47, XXY karyotipine (Klinefelter sendromu) sahipken kalan 1 hasta 46, XX kromozomal yapıya (gonadal disgenezi) sahipti. Oligospermik hastalar ile kontrol grubu bireylerde sayısal ve yapısal kromozom değişikliği saptanmadı.

İnfertilite kliniğine başvuran non-obstruktif azospermik ve şiddetli oligospermik infertil erkeklerde, infertilitenin etiyolojisini belirlerken sitogenetik inceleme yapılması ve genetik danışma verilmesi doğru tanının konmasına yardımcı olacaktır. Böylece mevcut kromozomal bozuklukların doğacak bebeğe potansiyel geçme riski, ICSI öncesi belirlenebilecek ve aile konu ile ilgili bilgilendirilebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Azospermi, oligospermi, erkek infertilitesi, karyotip, kromozomal anomaliler, Klinefelter Sendromu.

7. SUMMARY

The objective of the present study was to determine the frequency of chromosomal abnormalities in infertile males with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. With this aim, chromosomal abnormalities were researched on 115 patients (infertile males) with azoospermia (92 patients) and severe oligozoospermia (sperm count < 5 million/ml) (23 patients) who lived in region of Isparta and applied to Urology Department and IVF Center of Süleyman Demirel University, School of Medicine. Moreover, chromosomal analyses were also performed to 60 fertile males who have less a child, normal semen analyse and same age average with patient groups.

Cytogenetic abnormalities were investigated with standart cytogenetic methods. Briefly, cultures of peripheral blood lymphocytes were treated with 0.1 miyrogram/mL of colcemid after a 72-h incubation period. The prometaphase chromosomes were spread and stained using Standard G- and CBG banding techniques. At least 25-50 metaphases per subject were analysed.

Chromosomal abnormalities were found in 5 out of 115 infertile patients, corresponding to a frequency of 4.3%. All of them were in azospermic patient groups, corresponding to a frequency of 5.4% (5/92 patients). While four cases with chromosomal abnormality had 47, XXY karyotype (Klinefelter's syndrome), last 1 patient had 46, XX chromosomal karyotype (Gonadal disgenesis). Numerical or structural chromosomal abnormalities were not determined in oligozoospermic patients and control cases.

Cytogenetic analysis and genetic counseling would be helpful in infertile patients with non-obstructive azospermia and severe oligospermia by determining the genetic factors causing infertility. The potential inheritance risk of these genetic disorders to offspring provides an information for screening infertile males prior to ICSI.

Key Words: Azoospermia, oligozoospermia, male infertility, karyotype, chromosomal abnormalities, Klinefelter's syndrome

KAYNAKLAR

1. Simpson JL. Churchill Livingstone, New York: Emery AEH, (Ed.): Disorders of gonads and internal reproductive ducts. In: Principles and Practice of Medical Genetics. 1990; 1593
2. Vaffe T, Qates RD. Genetic abnormalites and reproductive failure, Urol Ci North Am 1994; 21: 389
3. Kjessler B., Mancini RE ve Martini L (Eds.). Academic Pres, New York: Chromosomal Constitution and male reproductive failure In: Male Fertility and Sterility 1974; 231-247
4. Chandley A.C. The Chromosomal Basis of human infertility, Br Med Bul 1979; 35: 181
5. Kadioğlu A, Aydos K, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (edt). İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul: Subfertil erkeğin değerlendirilmesi, İn: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. 2004;161-174
6. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (edt), İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul: Azospermik Olgunun Değerlendirilmesi, İn: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi, 2004; 232-237
7. Harley VR, Jakson DI, Hextall PJ. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. Scienc 1992; 255: 453
8. Tilford, C.A., Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L.G., Rosenberg, M., McPherson, J.D., Wylie, K., Sekhon, M., Kukaba, T.A., Waterston, R.H., Page, D.C. A physical map of the human Y chromosome. Nature 2001; 409: 943–945
9. Foresta, Moro E, Ferlin A. Y chromosome mikroleletions and alterations of spermatogenesis. Endocrinol Rev 2001; 22: 226
10. Vogt PH, Edelman A, Kirch S. Huan Y chromosome: azospermia factors (AZF) mapped the different subregions in Yq11, Hum Mol Genet 1996; 5: 993
11. Graves, J.A., Foster, J.W. Evolution of mammalian sex chromosomes and sex determining genes. Int. Rev. Cytol 1994; 154: 191–259
12. Stevanovic, M., Lovell-Badge, R., Collignon, J., Goodfellow, P.N. SOX3 is an X-linked gene related to SRY. Hum. Mol. Genet 1993; 2: 2013–2018
13. Lahn, B.T., Page, D.C. Four evolutionary strata on the human X chromosome. Science 1999; 286: 964– 967

14. Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L.G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D., Hovatta, O. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat. Genet* 1995; 10: 383–393
15. Vogt, P.H., Edelman, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., Koehn, F.M., Schill, W.B., Farah, S., Ramos, C., Hartmann, M., Hartschuh, W., Meschede, D., Behre, H.M., Castel, A., Nieschlag, E., Weidner, W., Grohne, H.J., Jung, A., Engel, W., Haidl, G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different sub-regions in the Yq11. *Hum. Mol. Genet* 1996; 5: 933–943
16. Underhill, P.A., Passarino, G., Lin, A.A., Shen, P., Foley, R.A., Mirazo'n Lahr, M., Oefner, P.J., Cavalli-Sforza, L.L. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origin of modern human populations. *Ann. Hum. Genet* 2001; 65: 43–62
17. Sun, C., Skaletsky, H., Birren, B., Devon, K., Tang, Z., Silber, S., Oates, R., Page, D.C. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat. Genet* 1999; 23: 429–432
18. Prasanth, S.G., Ali, S. Expression of Protooncogene c-kit receptor in rats *Rattus norvegicus* and identification of a mutant mRNA transcript implicated in spermatogenic failure. *DNA Cell Biol* 2003; 22: 447–456
19. Skaletsky, H., et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423: 825–837
20. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factor controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34:119
21. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; 348: 448
22. Pao CC, Kao SM, Hor JJ, Chang SY. Lack of mutational alteration in the conserved region of ZFY and SRY genes of 46,XY females with gonadal dysgenesis. *Hum Reprod* 1993; 8: 224
23. Choi JM, Chung P, Veeck L, Mielnik A, Palermo GD, Schlegel PN Center for Reproductive Medicine and Infertility. Weill Medical College of Cornell University, New York, New York 10021, USA, *Fertil Steril* 2004; 81(2): 337-41
24. Vogt P et al. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992; 89: 491

- 25.** Kent- First M, Muallem A, Shultz J, et al. Defining regions of the Y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molec Reprodand Develop* 1999; 53 (1): 27-41
- 26.** Kent- First M, Kol A, Muallem R. infertility in intracytoplasmic sperm injection-derived sons. *Lancet* 1996 Aug; 348: 332
- 27.** Arn P, Chen H, Tuck Muller CM, Mankinen C, Wachtel G, Li S, et al. SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11. *Hum Genet* 1994; 93:389
- 28.** Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (edt), İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul: Şamlı MM. Spermatogenezin genetik kontrolü, İn: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. 2004; 101-114
- 29.** Dimitrios I, Nikolaos V, Alexandra, T., Israel, R., Nikolaos, V. Description and molecular analysis of SRY and AR genes in a patient with 46,XY pure gonadal dysgenesis (Swyer syndrome). *Annales de génétique* 2004; 47, 185–190
- 30.** Sher, A., Seyed, E., Hasnain. Genomics of the human Y-chromosome 1. Association with male infertility. *Gene* 2003; 321: 25-37
- 31.** Genest, P., Genest, F.B. The influence of the length of the human Y chromosome on spontaneous abortions. A prospective study in family lines with inherited polymorphic Y chromosomes. *Ann. Genet* 1985; 28: 143– 148
- 32.** Quintana-Murci, L., Fellous, M. The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland”. *J. Biomed. Biotechnol* 2001; 1: 18– 24
- 33.** Zinn, A.R., Ross, J.L. Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr. Opin. Genet. Dev* 1998; 8: 322– 327
- 34.** Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *J Endocrinol invest* 2000; 23: 684
- 35.** Mc callum T, Milunsky J, Munariz R, Carson R, Sadeghi- Nejad H, Oates R. Unilateral renal agenesis associated with congenital bilateral absence of the vas deferens: phenotypic findings and genetic considerations. *Hum Reprod* 2001; 16:282
- 36.** Daudin M, Bieth E, Bujan L, Masat G, Pontonnier F, Mieuxset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and implications for genetic counseling. *Fertil Steril* 2000; 74: 1164

37. Jaffe TMOR. Genetic disorders affecting male infertility. In advances in urology (eds): M. T. Book: Chicago, Year Book Medical Publishers, vol. 9, 1996 pp. 363-405
38. Düzcan F, Atmaca M, Ozan Çetin G, Bağcı H. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82: 53-56
39. Johnson MD, Genetics risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: Recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998; 70: 397-411
40. Nurten Özçelik. Isparta: Tıbbi Biyoloji 1999; 103-111
41. Van Asche E, Boundella M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P. Cytogenetics of in infertile men. *Hum Reprod* 1996; 11 (Suppl 4) : 1-24
42. Antonelli A, Gandini L, Petrinelli P, et al. Chromosomal alterations and male infertility. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 677-83
43. Speed EM. Heterologous pairing and fertility in humans. In: Gillies CB, editor. *Fertility and chromosome pairing: recent studies in plants and animals*. Boca Raton (FL): CRC Pres; 1989; 1-36
44. Rives N, Joly G, Machy A, Simeon N, Leclers P, Mace M. Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Molecular Human Reproduction* 2000; 6: 107-112
45. Okada H ve Fujioka H. Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *Human Reprod* 1999; 14:946-52
46. Mroz K, Carrel L, Hunt PA. Germ cell development in the XXY Mouse: evidence that X chromosome reactivation is independent of sexual differentiation. *Developmental Biology* 1999; 207: 229-238
47. Attanasio A, Blank B, Rager K, Gubta D. Effect of human chorionic gonadotropin on the plasma levels of testosterone, estradiol sex hormone binding globuline and free testosterone in klinefelter syndrome. *Endokrinologie* 1982; 80:129-134
48. Elsayi MM, Pryor Jp, Klufio G, Barnes J, Patton MA. Genital Tract function in men with Noonan syndrome. *J Med Genet* 1994; 31: 468
49. Rutland J, de long RU: Random ciliary orientation. A cause of respiratory tract disease. *N Engl J Med* 1990; 323 (24): 1681
50. Osegbe DN, Akiyanju OO. Testicular dysfunction in men with sickle cell disease. *Postgrad Med J* 1987; 63: 95

51. 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
52. Özdiler E, Aydos K. Ankara: Klinik Androloji. 2000;71-101
53. World Health Organization. Cambridge: Cambridge University Press: Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed.;1999
54. Lüleci G, Başaran S, Bağcı G, Keser İ. Meteksan, Ankara: Sitogenetik uygulama yöntemleri. 1990: 22-31
55. Mitelman Felix. ISCN. An International System for Human Cytogenetic. Nomenclature 1995:94
56. Başaran N. ve arkadaşları. Etam: Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH). 1996:51-56
57. Yakut Sezin. Antalya: Tekrarlayan Düşükleri Olan ve Sitogenetik Olarak Karyotipleri Normal Bulunan Çiftlerde Kriptik Translokasyonların Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) İle Araştırılması. 2000
58. Fernando L, Gromoll J, Weerasooriya TR, Nieschlag E, Simoni M. Y-chromosomal microdeletions and partial deletions of the azospermia Factor c (AZFc) region in normozoospermic, severe oligozoospermic and azoospermic men in Sri Lanka. *Asian J Androl* 2006; 8:39-44
59. Vogt PH. Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 471-500
60. Vicdan A, Vicdan K, Günalp S, Kence A, Akarsu C, Işık AZ. Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 117: 49-54
61. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Sirirungsri W, Sirisukkasem S. Frequency of Y chromosome microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile Thai men with oligozoospermia and azospermia. *Asian J Androl* 2007; 9: 68-75
62. Abrahamsson L ve Beckman G. Chromosomal aberrations and male infertility. *J Urol* 1982; 128: 52-53
63. Egozcue S ve Blanco J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reprod Update* 2000; 6: 93-105
64. Kleiman SE ve Yogev L. Genetic evaluation of infertile men. *Human Reprod* 1999;14: 33-38

65. Peschka B ve Leygraaf J. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1999;14: 2257-2263
66. Başaran S ve Engur A. The results of cytogenetic analysis with regard to intracytoplasmic sperm injection in males, females and fetuses. *Fetal Diagn Ther* 2004;19: 313-318
67. Bourrouillou G, Dastugue N ve Colombies P. Chromosome studies in 952 males with a sperm count below 10 million/ml. *Human Genetics* 1985; 366-367
68. Lee S ve Kim NK. Genetic analysis of three polymorphic sites of the luteinizing hormone beta-subunit gene in infertile Korean men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2003; 79: 517-521
69. Retief AE ve Van ZYL. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Human Genetics* 1984; 162-164
70. Şamlı MM, Yılmaz E, H Şamlı, İmirzalıoğlu N. İnfertil erkeklerde genetik değerlendirme: Y kromozom mikrolezyonları. *Türk Üroloji Dergisi*, 2002; 28: 53-59
71. Soydan H, Avcı A, Özkök Y, Orkunoğlu F, Bedir S, İmirzalıoğlu N. Ciddi oligospermik ve azospermik idiyopatik infertil erkeklerde Y Kromozomu mikrolezyonu analiz sonuçları. *Türk Üroloji Dergisi*, 2003; 29: 414-423
72. Şamlı H, Şamlı MM, Solak M, İmirzalıoğlu N. Genetic anomalies detected in patients with non-obstructive azoospermia and oligozoospermia. *Arch Androl*, 2006; 52: 263-267
73. Debraekeleer M ve Dao T. Cytogenetics studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6: 245-250
74. Brown WM. Jacobs P ve Brunton M. Chromosome studies on randomly chosen men and women. *Lancet* 1965; 561-563
75. Videa S, Araujo H. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. *Arch Androl*, 2001; 46: 205-210
76. Chandley AC, McBeath S, Speed RM. Pericentric inversion in human chromosome 1 and the risk for male sterility. *J Med Genet*, 1987; 24: 325-334
77. Page Dc, Brown LG, de la Chapelle A. Exchange of terminal portions of X and Y chromosomal short arms in human XX males. *Nature* 1987; 328: 437-40

- 78.** Andersson P, Page DC, Pettay D, Subrt I, Turleau C, de Grouchy J. Autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45 x maleness. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 745-48
- 79.** Huynh T, Mollard R ve Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update*, 2002; 8: 183-198
- 80.** Fagerli J, Schneck FX, Lee PA, Bellinger MF, Witchel SF. Absence of microdeletions in the Y chromosome in patients with a history of cryptorchidism and azospermia or oligospermia. *Fertil Steril* 1999; 71: 697-700
- 81.** Simoni M, Gromoll J, dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azospermia) gene in azospermia and severe oligospermia. *Fertil Steril*, 1997; 67: 542-547
- 82.** Gottlieb b; Lombroso R, Beitel LK, Trifiro MA. Molecular pathology of the androgen receptor in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 42-48