



**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**AZOSPERMİ TANILI PRİMER İNFERTİL ERKEKLERDE AZF a,b,c  
BÖLGELERİNİN MLPA TEKNİĞİ İLE TARANMASI VE SONUÇLARIN  
KONFİRMASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KÖNÜL HAZİYEVA**

**DANIŞMAN  
DR. ÖĞR. ÜY. OĞUZ ÇİLİNGİR**

**2018**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**AZOSPERMİ TANILI PRİMER İNFERTİL ERKEKLERDE AZF a,b,c  
BÖLGELERİNİN MLPA TEKNİĞİ İLE TARANMASI VE SONUÇLARIN  
KONFİRMASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KÖNÜL HAZİYEVA**

**DANIŞMAN  
DR. ÖĞR. ÜY. OĞUZ ÇİLİNGİR**

**2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Könül HAZIYEVA' nın Yüksek Lisans olarak hazırladığı “Azospermi Tanılı Primer İnfertil Erkeklerde AZF a,b,c, Bölgelerinin MLPA Tekniği İle Taranması ve Sonuçların Konfirmasyonu” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliđi'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek “KABUL” edilmiştir.

06.06.2018

Üye : Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS



Üye : Dr.Öğr.Üy. Oğuz ÇİLİNGİR (Danışman)



Üye : Dr.Öğr.Üy. Onur EROĞLU



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07.06/2018 tarih ve 1178/5829. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Meysi GÜNEŞ  
Enstitü Müdürü



## Özet

### **Azospermi tanılı primer infertil erkeklerde AZF a,b,c bölgelerinin MLPA tekniği ile taranması ve sonuçların konfirmasyonu**

Y kromozomu mikrolelesyonları, azosperminin en yaygın nedenidir ve azospermik infertil erkeklerin %5-15'inde görülmektedir. Azospermik erkeklerin bir kısmında, Y kromozomunun uzun kolunda (Yq) delesyonların saptanması üzerine spermatogenezin bu bölgeden regüle edildiği tahmin edilmiştir ve bu bölge azospermi faktör bölgesi (AZF) olarak tanımlanmıştır. Sperm gelişimi ve farklılaşmasından sorumlu olan AZF bölgesi, AZFa, AZFb, AZFc bölgelerini içermektedir Bu bölgeler çok kopyalı gen aileleri içerir.

Yöntem karşılaştırması amacıyla planladığımız bu çalışmamızda; Üroloji Anabilim Dalı'na başvurup, detaylı öykü alımı, fizik muayene ve sperm analizleri yapıldıktan sonra herhangi bir ek sağlık problemi olmayan, klinik olarak azospermi tanısı alan hastalar Tıbbi Genetik polikliniğimize yönlendirilmiştir. Sitogenetik analiz sonrasında normal karyotipe sahip olduğu belirlenen ve multipleks PCR (mPCR) ile yapılan moleküler analiz sonucunda normal olarak değerlendirilen 50 azospermik bireyden oluşan hasta grubumuz ve 15 fertil bireyden oluşan kontrol grubumuz MLPA yöntemiyle analiz edilmiştir. Daha önce mPCR (Polymerase Chain Reaction) analiz yöntemiyle delesyon saptanmayan hasta grubumuzun 8 bireyinde %16 oranında MLPA tekniği ile AZFc ve AZFb bölgelerine ait parsiyel delesyonlar saptanmıştır. AZFb bölgesinde yerleşen EIF1AY geninde delesyon 2 hastada, AZBb+c bölgesindeki EIF1AY ve BPY2 genine ait parsiyel delesyonlar ise sadece 1 hastada görülmüştür. Bunun yanısıra yine 5 hastada AZFc bölgesinde yerleşen BPY2 geninde parsiyel delesyonlar tespit edilmiştir. Fertil bireylerden oluşan kontrol grubumuzda herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

Bu yöntem; daha geniş bölgeleri kapsayan mikrolelesyon/mikroduplikasyon analizinin yapılabilmesine ve bunun yanısıra detaylı genotip/fenotip korelasyonlarının kurulmasına yardımcı olacaktır. AZF bölgelerinin parsiyel ve komplet delesyonların erkek infertilitesine etkilerinin araştırılması açısından mPCR yöntemine kıyasladığımızda MLPA yönteminin daha elverişli olduğunu düşünmekteyiz. Buna sebep ise, saptanabilecek bazı delesyonların oluştuğu bölgelerin rutinde kullanılan mPCR yöntemiyle bakılan bölgeler arasında olmaması ile ilişkilendirilebilir. Multipleks PCR yöntemi ile çalışıldığı zaman bu bölgelere özgü primerlerin dizayn edilmesi gerekirken, MLPA yöntemiyle tek prob miksle analiz edilebilmektedir.

Anahtar kelimeler: Azospermi, Y kromozom Mikrolelesyonları, AZF Bölgeleri, MLPA, Parsiyel Delesyonlar

## Summary

### **Screening by Multiple ligation – dependent probe amplification assay of AZF a, b, c regions in primary infertile men with azoospermia.**

Y chromosome microdeletions are the most common cause of azospermia and occur in 5-15% of infertile men with azospermia. In some of the azospermic males detection of deletions in the long arm (Yq) of the Y chromosome predicted that spermatogenesis was to be regulated from this region, which was defined as the azospermia factor region (AZF). The AZF region which responsible for sperm development and differentiation contains regions AZFa, AZFb, AZFc. These regions contain multiple copies of gene families. Azospermia is seen as a pre-meiotic spermatogenic arrest or SCOS (Sertoli cell-only syndrome).

In this study which we planned to compare the methods; patients who applied to the Department of Urology and received clinical history of azospermia without any additional health problems after detailed history taking, physical examination and sperm measurements were directed to our Medical Genetics clinic. Our patient group consisting of 50 azospermic patients and 15 fertile individuals, which are normally evaluated as a result of cytogenetic and molecular analyzes, has been analyzed by MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) method. Partial deletions of AZFc and AZFb regions were detected by MLPA technique in 8 (16%) patients which had no deletions were detected by previously analyzed multiplex PCR method. Partial deletions of the EIF1AY and BPY2 genes were seen in 2 patients in the AZFb locus and only in 1 patient in the AZBb+c region. In addition, in 5 patients were detected partial deletions of BPY2 gene which located in AZFc region. In our control group which consist of fertile individuals were not determine any microdeletion or microduplication.

This method will enable the analysis of microdeletions/microduplications covering a wider area and will also assist in the establishment of detailed genotype/phenotype correlations. We think that MLPA is more suitable when compared to mPCR in terms of investigating the effects of partial and complete deletions of AZF regions on male infertility. The reason for this may be related to the fact that some of the deletions which can be detected are not among the regions examined by the mPCR method used in the routine. When using the multiplex PCR method, it is necessary to design the primers specific to these regions, it can be analyzed with a single probe mix with MLPA method.

Key words: Azoospermia, Y Chromosome Microdeletion, AZF Regions, MLPA, Partial Deletion

# İçindekiler

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
Özet	III
Summary	IV
Tablo Dizini	IX
Şekil Dizini	X
Simge ve Kısaltmalar Dizini	XI
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 Erkek Genital Sisteminin Embriyolojisi	2
2.1.1 Testislerin farklılaşması	2
2.1.2 Hipotalamus, hipofiz ve testis ilişkisi	2
2.1.2.1 İnterstisyel Kısım	3
2.1.2.1.1 Leydig Hücreleri	3
2.1.2.2 Tübüler kısım	3
2.1.2.2.1 Sertoli hücreleri	3
2.1.2.2.2 Germ hücreleri	4
2.2 Spermatogenez	4
2.2.1 Fertilizasyon	6
2.3 Erkek İnfertilitesinin Tanımı	6
2.3.1 Erkek İnfertilitesinin nedenleri	6

2.4 İnfertil Erkeğin Değerlendirmesi	8
2.4.1 Öykü ve fizik muayene	9
2.4.2 Semen analizi	9
2.4.3 İdrar tahlili ve ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranması	9
2.4.4 Hormonal değerlendirme	9
2.4.5 Diğer değerlendirme yöntemleri	10
2.5 Semen Analizi ve Sınıflandırılması	10
2.5.1 Azospermi	11
2.6 Erkek İnfertilitesinde Genetik Değerlendirme	12
2.6.1 Kromozomal anomaliler	13
2.6.1.1 Yapısal kromozom anomalileri	14
2.6.1.1.1 Resiprokal translokasyonlar	14
2.6.1.1.2 Robertsonian translokasyonlar	14
2.6.1.1.3 Inversiyon	14
2.6.1.1.4 46,XX kromozom kuruluşlu erkek sendromu	15
2.6.1.2 Sayısal kromozom anomalileri	15
2.6.1.2.1 Klinefelter sendromu	16
2.6.1.2.2 XYY erkekleri	16
2.6.1.2.3 Miks Gonadal Disgenezi	16
2.6.1.3 Y kromozomu yapısal bozuklukları	16
2.6.1.3.1 İzodisentrik Y kromozomu	16

2.6.2 Y Kromozomu ve infertilite	17
2.6.2.1 Y kromozomu yapısı ve özellikleri	17
2.6.2.2 Azospermi faktörü ve Y mikrolelesyonları	18
2.6.2.2.1 AZFa bölgesi	19
2.6.2.2.2 AZFb bölgesi	20
2.6.2.2.3 AZFc bölgesi	21
2.6.2.2.4 AZFd bölgesi	23
2.6.2.2.5 Y mikrolelesyon mekanizması	23
2.6.2.3 Y kromozom parsiyel delesyonları	23
2.6.2.4 Y kromozom mikrolelesyon tayin yöntemi	24
2.6.2.4.1 Multipleks PCR yöntemi	24
2.6.2.4.2 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	26
3 GEREÇ VE YÖNTEMLER	27
3.1 Örneklerin Eldesi	27
3.2 Gereçler	27
3.2.1 Kullanılan gereçler	27
3.2.2 Kullanılan kimyasal malzemeler	28
3.2.3 SALSA MLPA P360-A1 prob kiti	28
3.3 Yöntemler	33
3.3.1 Qiagen® ekstraksiyon kiti ile periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesi	33
3.3.2 İzole edilen DNA örneklerinin MLPA yöntemiyle analizi	34



3.3.2.1 DNA denatürasyonu ve SALSA MLPA P360-A1 probe karışımları ile hibridizasyonu	34
3.3.2.2 Ligasyon ve dijasyon reaksiyonu	34
3.3.2.3 PCR amplifikasyonu	35
3.3.2.4 ABI 3130 cihazına yükleme	35
3.3.2.5 Değerlendirme	36
4 BULGULAR	37
4.1 Araştırma Grubu Olgularının MLPA Bulguları	37
5 TARTIŞMA	42
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	51
7 KAYNAKLAR DİZİNİ	53
8 ÖZGEÇMİŞ	66

## Tablo Dizini

	Sayfa
2.1 İnfertilitenin testiküler nedenleri	8
2.2 Dünya Sağlık Örgütüne göre semen analizi referans değerler	10
2.3 Dünya sağlık Örgütü göre semen kalitesine ilişkin terminoloji	11
2.4 Erkek infertilitesi ile ilişkili en sık görülen genetik anomalilerin görülme sıklığı ve fenotipi	13
3.1 Salsa MLPA P360-A1 prob kitinin bölgeleri	29
3.2 Salsa MLPA P360-A1 kitinin Y kromozom lokasyonuna göre düzenlenmiş problemleri	31
4.1 İnfertil erkek örneklerine ait daha önce yapılan multipleks PCR analiz sonuçlarının ve çalışmamızda kullanılan MLPA yönteminin sonuçlarının confirmasyonu	37
4.2 MLPA yöntemiyle yapılan Y mikrodelsiyon taramasının analiz sonuçları özeti	41
5.1 Farklı ülkelerde infertil erkeklerde tespit edilen Y kromozom mikrodelsiyonlarının sıklığı	43

## Şekil Dizini

	Sayfa
2.1 Seminifer tübül yapısında Sertoli hücreleri, germ hücreleri ve Leydig hücrelerinin yerleşimi	4
2.2 Spermatogenez süreci	6
2.3 Y kromozomu üzerindeki ökromatin, heterokromatin ve psödootozomal bölgeler	17
2.4 SRY geni ve HMG kutusu	18
2.5 Y kromozomu üzerinde protein kodlayan genleri içeren MYS bölgesi, AZFa, AZFb, AZFc bölgeleri	19
2.6 STS primer seti	25
2.7 Y kromozomundaki marker pozisyonlarının şematik görünümü	25
2.8 MLPA yönteminin basamakları	26
4.1 1 ve 5 no'lu hastalarda AZFb bölgesinde yerleşen EIF1AY geninin 490 nükleotit uzunluğu olan hedef dizisinde saptanan parsiyel delesyon görüntüsüyle referans olarak kullanılan örneğin analiz görüntülerinin karşılaştırılması	38
4.2 4 no'lu hastada AZFb bölgesinde yerleşen EIF1AY geninin ve BPY2 geninin hedef dizilerinde saptanan delesyonlar görüntüsüyle referans olarak kullanılan örneğin analiz görüntülerinin karşılaştırılması	39
4.3 2, 3, 6, 7 no'lu hastalarda AZFc bölgesinde yerleşen BPY2 geninin hedef dizilerinde saptanan delesyonların MLPA profilleri	40
5.1 Y kromozomu görüntüsü	49

## Simge ve Kısaltmalar Dizini

AMH	Antimüllerian hormon
ATP	Adenozin trifosfat
AZF	Azospermi faktörü
BPY2	Y- bağımlı Temel Protein, 2
CBAVD	Konjenital Bilateral Vaz Agenezi
CFTR	Kistik Fibroz Transmembran Regülatörü
CUAVD	Konjenital olarak Vaz Deferensin tek taraflı Agenezisi
EIF1AY	Y- bağımlı Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 1A
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropini
HMG	Yüksek Hareketlilik Grubu
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu
IdicY	İzodisentrik Y kromozomu
INSL3	İnsülin benzeri faktör 3
kb	Kilobaz
LH	Lüteinleştirici hormon
Mb	Megabaz
ml	Mililitre
$\mu$ l	Mikrolitre
MLPA	Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu
mPCR	Çoklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu

NOA	Non-obstrüktif Azospermi
nt	Nükleotit
OA	Obstrüktif Azospermi
PARs	Psödootozomal bölgeler
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCOS	Sertoli Hücre Sendromu
SRY	Y kromozomunun Cinsiyet Belirleyici Bölgesi
STS	Dizi-Hedefli Bölgeler
TESE	Testisten Matür Sperm Elde edilmesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## 1- GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite cinsel olarak aktif ve bir yıl boyunca kontrasepsiyon olmaksızın cinsel birleşme sonrası gebeliğe ulaşamaması durumudur (WHO, 2010). Erkek fertilitésinin azalması, doğumsal ve edinsel nedenli ürogenital anomalilerin, erkek bezlerinin enfeksiyonlarının, skrotal sıcaklığın artmasının, endokrin bozuklukların, genetik anomalilerin ve immünolojik faktörler gibi çeşitli olayların sonucunda gerçekleşebilir (Rowe & Comhaire, 2000). İnfertilite tüm erkeklerin yaklaşık % 7'sini etkiler. Primer testis yetmezliği, tüm erkek faktörü infertilitesinin yaklaşık %75'ini oluşturur. Genetik faktörler vakaların yaklaşık %15'inde tanımlanabilir. Ancak yaklaşık %50 vakada etiyoloji hala bilinmemektedir ve "idiopatik infertilite" olarak adlandırılmaktadır (Csilla Krausz, 2011).

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasındaki ilk adım rutin semen analizidir. Dünya sağlık organizasyonuna göre, geleneksel semen analizi sperm sayısını, morfolojisini ve hareketliliğini gösteren parametreleri içermektedir (Oleszczuk, Giwercman, & Bungum, 2011). Uygulanan değerlendirme yönteminin kantitatif analiz limitine göre ejakülatın santrifüjü sonrasında pellette hiç spermin bulunamaması durumuna azospermi olarak adlandırılmaktadır. Azospermi tüm erkeklerin %1'inde, infertil erkeklerin ise % 15'inde tespit edilir ve obstrüktif azospermi (OA) ve non-obstrüktif azospermi (NOA) olarak sınıflandırılır (O'connell, McClure, & Lewis, 2002; Wosnitzer, Goldstein, & Hardy, 2014). Azosperminin %29 oranında oluşmasına neden, temelinde yatan genetik anomalilerdir (Dohle et al., 2002). Y mikrolelesyon ve karyotip analizi yaparak, bu bozuklukların bir kısmı saptanabilir (Jungwirth et al., 2012). Y kromozomu mikrolelesyonları, azosperminin en yaygın nedenidir ve azospermik infertil erkeklerin % 5-15'inde görülmektedir. Azospermik erkeklerin bir kısmında, Y kromozomunun uzun kolunda (Yq11) delesyonların saptanması üzerine spermatogenezin bu bölgeden regüle edildiği tahmin edilmiş ve bu bölge azospermi faktör bölgesi (AZF) olarak tanımlanmıştır. AZF bölgesi çoklu gen aileleri, AZFa, AZFb, AZFc bölgelerini içermektedir (Ferlin ve ark., 2007). AZF bölgesindeki genler yalnız spermatogenezle ilgili genlerdir. Bu nedenle bu bölgedeki delesyonlar fenotipik bozukluk yapmadan izole spermatogenez defektine (şiddetli oligozospermi ya da azospermiye) neden olur (Koşar & Özçelik, 2007).

Bu çalışmanın amacı, Anabilim Dalımız polikliniğine yönlendirilen, normal karyotipe sahip olduğu belirlenen ve multipleks PCR yöntemiyle yapılan analiz sonucunda Y mikrolelesyonu saptanmayan hastaları MLPA tekniği ile araştırmak, olası mikrolelesyon/mikroduplikasyonları tespit etmek ve değerlendirmektir.

## **2 - GENEL BİLGİLER**

### **2.1–Erkek Genital Sisteminin Embriyolojisi**

#### ***2.1.1 Testislerin farklılaşması***

Embriyonik dönemde ilk olarak, ara mezoderm tabakasının üzerinde ürogenital katlantı (ridge) gelişir ve ilk gonad yaklaşık birinci aydan sonra belirir. Gonadların gelişiminde bir sonraki basamak primordial germ hücrelerinin göçüdür. Allantois tabanındaki yolk kesesinde, 4. haftanın sonunda belirmeye başlayan bu hücreler, ürogenital katlantıya göçleri sırasında çoğalmaya devam ederler. Germ hücreleri yerleştikten yaklaşık bir hafta sonra, gonad bipotansiyel özelliğini kaybetmeye başlar, testis ya da overe farklılaşır (Şıklar Z., 2014). Bipotansiyel gonad testis yönünde geliyecekse seminifer tübüller 5. haftadan sonra belirginleşir. Germ hücreleri spermatogonia yönünde farklılaşmaya başlar ve bu aşamadan puberte başlangıcına kadar mayoz bölünme olmayacaktır (Bundak et al., 2008; Fichna, Fichna, Żurawek, & Nowak, 2011). Fetal dönemde 6. haftaya kadar küme şeklinde duran gonadal hücreler daha sonra testiküler kord ve interstisyel doku şeklinde ayrılmaya başlar. Testisin gelişiminin bütünlüğü açısından, gonositlerin öncül hücreleri olan germ hücrelerinin yanı sıra somatik hücrelerin de varlığı önemlidir. Puberteye geçiş, testislerin steroidogenez yeteneği kazanması dışında, beslenme durumu ve vücudun büyüme hızından da etkilenmektedir (Bartke, 1999).

Testis belirlenmesinde en önemli transkripsiyon faktörü "sex-determining region Y" SRY'dir. Y kromozomunun kısa kolunda Yp11.3 bölgesinde kodlanır. Erkek yönünde gelişimi sağlayan başlıca faktörün Y kromozomu olduğu anlaşıldıktan sonra, Y kromozomundaki çeşitli aday genler "Testis Belirleyici Faktör" olarak incelenmiş ve 1990 yılında SRY izole edilmiştir (Şıklar, Z. 2014).

#### ***2.1.2 Hipotalamus, hipofiz ve testis ilişkisi***

Spermatogenez ve steroidogenez, birbirilerinden morfolojik ve fonksiyonel olarak ayırt edilebilen iki kısımda yer alırlar. Bu kısımlar ise seminifer tübüllerden ve seminifer tübüller arasındaki interstisyel bölmeden oluşan tübüler bölmelerdir. Anatomik ayrı olmalarına rağmen bu bölmeler birbiriyle ilişkilidir ve sperm üretimi için bir bütün olmaları gereklidir (Weinbauer, Luetjens, Simoni, & Nieschlag, 2010).

Testislerde erkek cinsel hormonları olan androjenler ve erkek gametler üretilir. Testisin ve bölmelerinin işlevi hipotalamus ve hipofiz bezi tarafından yönetilir (Weinbauer et al., 2010).

#### *2.1.2.1 İnterstisyel kısım*

Bu bölmenin en önemli hücreleri Leydig hücreleridir. Bu hücreler, testiküler testosteron ve insülin benzeri faktör 3 (INSL3) kaynağıdır. İnterstisyel bölme bağışıklık hücreleri, kan ve lenf damarları, sinirler, fibroblastlar ve gevşek bağ dokusu içerir. İnterstisyel bölme toplam testis hacminin yaklaşık %12-15'ini kapsar, Leydig hücreleri ise bu hacmin %10-20'si oluşturur (Weinbauer et al., 2010).

##### *2.1.2.1.1 Leydig hücreleri*

İnterstisyel alanda beliren leydig hücreleri, çöломik epitelyum ve mezonefrik mezenkimden gelen steroidojenik öncül hücrelerden kaynaklanır. Farklılaşması için lüteinleştirici hormon (LH), aynı zamanda sadece Sertoli hücrelerinden salınan büyüme faktörleri ve farklılaşma faktörleri de gereklidir (Bundak et al., 2008). Leydig hücrelerinin steroidogeneze başlaması ile androjen bağımlı erkek üreme sistemi de farklılaşmaya başlar (Weinbauer et al., 2010). İntrauterin dönemde plasentadan salgılanan human koryonik gonadotropin (hCG), Leydig hücre gelişimi ve androjen sentezinden sorumludur (El-Gehani, Zhang, Pakarinen, Rannikko, & Huhtaniemi, 1998; Hardelin & Dodé, 2008; Majdic, Saunders, & Teerds, 1998) .

##### *2.1.2.2 Tübüler kısım*

Bu kısım toplam testis hacminin yaklaşık %60-80'ini kapsar. Germ hücreleri, iki farklı somatik hücre tipi olan peritübüler hücrelerini ve Sertoli hücrelerini içerir. Genel olarak, insan testisinde yaklaşık 600 seminifer tübül bulunur (Weinbauer et al., 2010).

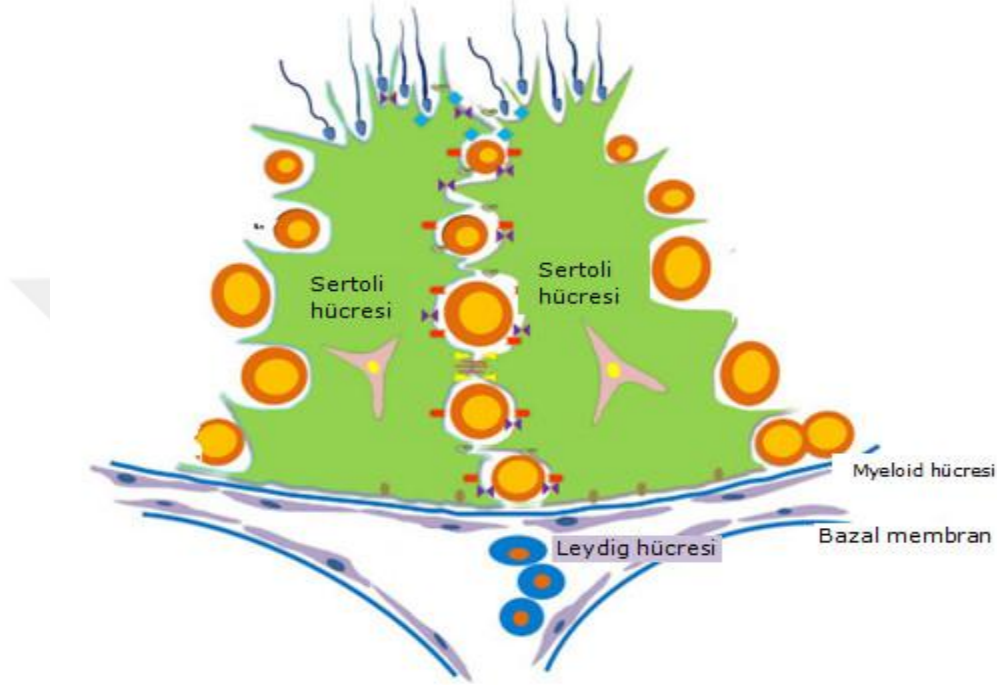
##### *2.1.2.2.1 Sertoli hücreleri*

Sertoli hücreleri, bazal membrana bağlı somatik (diploid) hücrelerdir. Sertoli hücreleri Leydig hücrelerinin farklılaşmasında görev alır (Hardelin & Dodé, 2008) (Şekil 2.1). Bu hücreler spermlerin oluşumunu ve salınmasını düzenlemektedirler (Nacar & Nacar, 2010).

Testiste Sertoli hücrelerinden salınan antimüllerian hormon (AMH) erkek yönündeki somatik gelişim için gereklidir (P. A. Lee & Houk, 2007; Zhao et al., 2001). Antimüllerian hormon (AMH) SRY geninin eksprese edilmesinden kısa bir süre sonra, Sertoli hücrelerinden eksprese edilir. SOX9



gen ekspresyon artışı ile Sertoli hücre oluşumu ve testis farklılaşması başlar (Canto, Munguia, Söderlund, Castro, & Mendez, 2009).



Şekil 2.1 Seminifer tübül yapısında Sertoli hücreleri, germ hücreleri ve Leydig hücrelerinin yerleşimi (Hai et al., 2014)

#### 2.1.2.2.2 Germ hücreleri

Spermatogenezde hücreler arası bağlantı ve iletişim son derece önemlidir. Bu ilişkiyi sağlayan etkenin gelişim evrelerindeki germ hücreleri yüzeyinde bulunan adhezyon molekülleri ve hücre dışı matriks bileşenleri arasındaki etkileşimler olduğu düşünülmektedir. Germ hücreleri yada spermatojenik hücreler, Sertoli hücreleri ile birlikte seminifer tübül epitelini oluşturan, düzenli olarak çoğalan ve olgun spermiumlara farklılaşan hücrelerdir. Olgunlaşma aşamalarındaki bu hücreler bazaldan lümene doğru spermatogonyum, primer spermatozoid, sekonder spermatozoid, spermatozoid ve spermium olarak sıralanır (Nacar & Nacar, 2010).

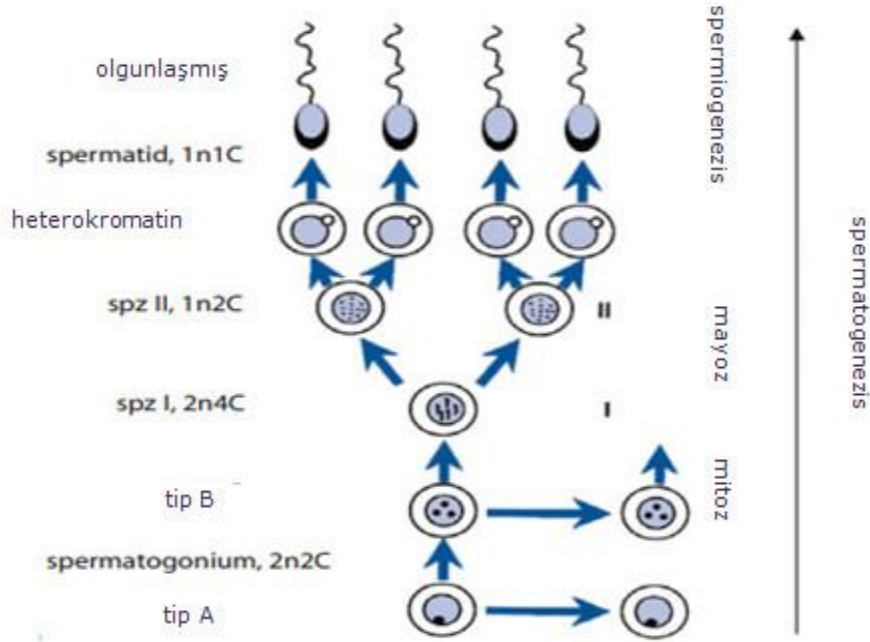
## 2.2 - Spermatogenez

Testislerin seminifer tübüllerinde gerçekleşen spermatogenez, ilkel multipotent kök hücrelerin, yani spermatogoniaların kendilerini yenilemek

adına bölünerek çoğaldığı veya spermatozoa olacak yavru hücreleri oluşturan karmaşık bir süreçtir (Turek P.J., 2000).

Spermatogenez puberteyle birlikte başlar ve yaşlanma sürecine bağlı hızının yavaşlamasıyla birlikte yaşam boyunca sürebilir (Satar & Gençdal, 2013). Proliferasyon fazı, redüksiyon-bölünme fazı ve farklılaşma fazı olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. Spermatisitogenez olarak adlandırılan proliferasyon fazında spermatogoniumlar mitoz bölünmeyle çoğalarak, primer spermatisitleri oluşturur. Spermatisit fazı olan redüksiyon-bölünme aşamasına girmeden önce primer spermatisit hücreleri DNA'larını replike ederler. Spermatisit fazında ardı ardına gelen iki mayoz bölünme gerçekleşir ki, sonrasında hücrelerin hem kromozom sayısında, hem de DNA miktarında azalma olur ve bu aşama sonucunda spermatid hücreleri meydana gelir. Farklılaşma fazında haploid spermatidler, olgun spermiumu meydana getirecek olan ve spermiogenez olarak adlandırılan bir farklılaşma sürecine girerler (Hai et al., 2014).

Bir spermatogenez döngüsü ilkel spermatogonia kök hücrelerinin takip eden germ hücrelerine bölünmesini içerir. Spermatogoniyumların ilk basamağı ve en az farklılaşmış olanı, mitoz bölünme sonrası oluşan koyu tip A spermatogoniyumlarıdır. Koyu tip A spermatogoniyumları (Ad) yeni Ad hücrelerle birlikte soluk tip A spermatogoniyumları (Ap) üretirler. Soluk tip A spermatogoniyumları mitotik bölünme sonrasında tip B spermatogonia'dan preleptoten primer spermatisitlere dönüşürler. Primer spermatisitler ise birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatisitleri oluşturur. Hemen arkasından ikinci mayoz bölünmeyle haploid sayıda kromozom içeren spermatidler meydana getirir. Spermatisit adını alan hücreler DNA içeriklerini yani genetik materyallerini iki katına çıkardıktan sonra 4 ayrı hücreye bölünürler. Bu 4 hücreden her biri artık yirmi üç kromozom içermektedir (McAninch J. W., Lue T. F., Smith D. R., 2013). Her bir primer spermatisit, 2 sekonder spermatisite ve bunların her biri de 2 spermatide bölünür (Şekil 2.2). Spermatidlerin Sertoli hücresi içinde olgun spermatozoa haline gelmesi aşaması haftalarca sürer ve çok sayıda olayı içerir (Satar & Gençdal, 2013).



Şekil 2.2 Spermatogenez süreci (Bergmann, 2006)

### 2.2.1 Fertilizasyon

Fertilizasyon aşaması fallop tüplerinin ampulla bölümünde gerçekleşir. Sperm ve ovum arasındaki doğrudan temas, her gametin yüzeyindeki spesifik reseptörler tarafından gerçekleştirilir. Sperm hücrelerinin ovuma girişinden sonra DNA sentezi için gerekli maddeler taşınmaya başlar ve bu sayede de DNA sentezi başlamış olur. Döllenen yumurtada kromozom sayısı kırk altı olur ve hücre bölünmesi başlar. Dölleniş yumurta, uterusu ulaştınca buraya yerleşir. Oluşan yeni hücreye zigot denir (McAninch J. W., 2013).

## 2.3 - Erkek İnfertilitesinin Tanımı

İnfertilite cinsel olarak aktif ve bir yıl boyunca kontrasepsiyon olmaksızın cinsel birleşme sonrası gebeliğe ulaşılamaması durumudur (WHO, 2010).

### 2.3.1 Erkek infertilitesinin nedenleri

Erkek fertilitésinin azalması, doğumsal ve edinsel nedenli ürogenital anomalilerin, erkek bezlerinin enfeksiyonlarının, skrotal sıcaklığın (varikozel) artmasının, endokrin bozuklukların, genetik anomalilerin ve immünolojik faktörler gibi çeşitli olayların sonucunda gerçekleşebilir (Rowe & Comhaire,

2000). Erkek infertilitesinin nedenlerinin sayısı çok olsa da geleneksel olarak pretestiküler, testiküler ve posttestiküler etkenler şeklinde gruplandırılır.

Pretestiküler faktörler: Sertoli hücreleri tarafından salınan inhibin hormonuyla normal spermatogenez sırasında kontrol edilen FSH (Folikül uyarıcı hormon) hormonun değeri, spermatogenezdeki hatalar sonucunda yükselmeye başlar. Gonadotropinlerde artma ve testosteron miktarında azalma ise Leydig ve Sertoli hücre fonksiyonlarını etkilemektedir. Hipotalamus ve hipofiz yollarını bozulmasından kaynaklanan FSH ve LH değerlerinin azalmasına bağlı yetersiz testosteron oranı sonucu oluşan hipogonadotropik hipogonadizm hastalığı infertiliteye sebep olmaktadır.

Testiküler faktörler: Testiküler faktörler büyük oranda geri dönüşümsüzdür. Testis düzeyinde etki göstererek infertiliteye neden olan durumlar (Tablo 2.1) gösterilmiştir (Aydos K., 2007).

Posttestiküler faktörler: Bu etyolojik kategori, seminal yolun tüm obstrüktif/subobstrüktif lezyonlarını, yardımcı bezlerin infeksiyonlarını ve iltihaplı hastalıklarını aynı zamanda otoimmün infertiliteyi içerir. Bilateral obstrüksiyon durumunda semen fenotipi azospermi olarak, diğer taraftan ise posttestiküler koşullarda sperm sayısının, motilitesinin ve morfolojisinin farklı derecede hasar görmesi gözlenilebilir. Posttestiküler faktörler reproduktif yol obstrüksiyonu bozukluklarına, cinsel birleşmeye bağlı bozukluklarına ve sperm fonksiyon veya hareketliliği ile ilişkili hastalıklara neden olabilir (Csilla Krausz, 2011).

Tablo 2.1 İnfertilitenin testiküler nedenleri (Turek PJ., 2000)

<b>Kromozomlara bağlı nedenler</b>	Klinefelter sendromu XX erkek sendromu XYY sendromu
<b>Diğer sendromlar</b>	Noonan sendromu Miyotonik distrofi Kaybolan testis sendromu İzole sertoli hücresi sendromu Y kromozomu mikrolelesyonları
<b>Gonadotoksinler</b>	Radyasyon İlaçlar
<b>Sistemik hastalıklar</b>	Böbrek yetersizliği Karaciğer sirozu Orak hücreli hastalık
<b>Defektif androjen aktivitesi</b>	5 alfa-redüktaz eksikliği Androjen reseptör eksikliği
<b>Testis hasarlanmaları</b>	Orşit Torsiyon Travma
<b>Kriptorşidizm</b>	Bir gelişim kusuru olduğu düşünülmektedir. Normal skrotum içindeki testiste yüksek bir germ hücre anormalliklerine sahip olma riski vardır ve bu nedenle tek veya çift taraflı inmemiş testisi olan erkekler ileride infertil olma riski taşır.
<b>Varikozel</b>	Skrotal venlerin pampiniform pleksusu içinde genişlenmiş ve kıvrımlanmış venler olarak tanımlanmaktadır. Testis atrofisiyle ilişkilidir ve semen kalitesini bozduğuna ilişkin tartışılmaz kanıtlar vardır.
<b>İdiyopatik</b>	İnfertil erkeklerin yaklaşık %20-40'ında herhangi bir etiyolojik neden saptanamaz. Genetik ve çevresel faktörlerinde açıklayabileceği olasılığı olan bu gruba idiyopatik infertilite adı verilir.

## 2.4 - İnfertil Erkeğin Değerlendirmesi

Çiftlerin %30-40'ında erkek faktörünün infertilitenin nedeni olarak saptanması ve olguların %50'sine katkıda bulunması, çiftin birlikte değerlendirilmesini önemli hale getirmektedir. Erkek infertilitesi aynı

zamanda sistemik hastalığın belirtisi olabileceği için tam ürolojik değerlendirme önemlidir (McAninch J. W., 2013).

#### **2.4.1 Öykü ve fizik muayene**

İnfertilite araştırmasında genel üreme öyküsünün alınması ile başlanılır. İnfertilitenin süresi, şimdiki ve önceki eşlerle olan birlikteliklerde oluşan gebelikler ve daha önce konsepsiyonda güçlük olup olmadığı, bunun yanısıra; çocukluk ve ergenlik dönemi ve bu dönemler de geçirilmiş hastalıklar, yapılan cerrahi işlemler, cinsel ilişki sıklığı ve zamanlaması, sistemik hastalıklar, ateş, viremi veya diğer akut enfeksiyonlar, gonadal toksinlere maruz kalınımı ve ailedeki fertilitte durumu sorgulanır (Kadioğlu et al., 2004; McAninch J. W., 2013; Walsh et al., 2005).

#### **2.4.2 Semen analizi**

İnfertil erkeklerin değerlendirilmesinde semen analizi önemlidir (Sigman, Boyle, & Jarow, 2008). Fertilitenin bir ölçütü olmamakla birlikte, bu tahlil sperm üretimi ve üreme sisteminin tıkalı olup olmadığı konusunda bilgi veren birinci kaynaktır (Weidner et al., 2002). Azoospermi hariç semen analizinde kesin olarak fertil veya infertil ayrımı yapılamaz (Sigman et al., 2008).

#### **2.4.3 İdrar tahlili ve ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranması**

İdrar tahlili üriner sistemde anatomik veya tıbbi sorunları akla getirebilir (McAninch J. W., 2013). Pellet testi adı verilen işlem; hastadan alınan idrar örneklerinde hiç sperm bulunamaması halinde santrifüj ile dibe çöken kısımda sperm araştırılmasına dayanmaktadır. Ejakülasyon volümü 1 ml'den düşükse ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranması yapılır (Sigman et al., 2008).

#### **2.4.4 Hormonal değerlendirme**

İnfertiliteye neden olabilecek hipofiz ekseniiyle ilişkili sorunlar (hiperprolaktinemi, gonadotropin eksikliği, konjenital adrenal hiperplazi) ortaya çıkabilir. Sperm sayısında azalma veya morfolojisinde bozukluk varsa hormonal inceleme yapılır. Testosteron hormonal dengenin bir ölçütüdür, FSH ise endokrin dengesinden çok sperm üretiminin durumunu yansıtır. FSH, testosteron ve östrodiol hormonlarının ölçümü periferik kan testiyle öncelikli olarak yapılır (Pavlovich, King, Goldstein, & Schlegel, 2001). Testosteron ve FSH anormalse endokrin anormalliğin tam yerini belirlemek için serum LH ve prolaktin düzeyleri ölçülebilir. Kontrol altına alınmamış sistemik hastalıklar sperm üretimini etkileyebileceğinden aktif hastalığa ilişkin klinik kanıt varsa tiroid hormonu tayini, karaciğer fonksiyonu ve diğer organlara özel testler yapılmalıdır (McAninch J. W., 2013).

### 2.4.5 Diğer değerlendirme yöntemleri

Başta karyotip analizi ve Y mikrodelsiyon analizi olmak üzere genetik testlerde yapılmakta olup bunun yanı sıra antispermi antikor tayini, sperm-servikal mukus etkileşim testleri, reaktif oksijen tayini, akrozom reaksiyon testi gibi nadir testlerde gerekli olduğunda istenmektedir (Aydos K., 2007).

## 2.5 - Semen Analizi ve Sınıflandırılması

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasındaki ilk adım rutin semen analizidir. Dünya sağlık organizasyonuna göre geleneksel semen analizi sperm sayısını, morfolojisini ve hareketliliğini içermektedir (Oleszczuk et al., 2011). WHO (World Health Organization) standartlarına göre fertilizasyonun olması için optimal şartlarda semenin mililitresinde on beş milyon spermatozoa olması gerekmektedir. WHO tarafından 1999 ve 2010 yıllarında belirlenen normal sperm parametreleri karşılaştırması ve 2010 yılında belirlenen semen kalitesine bağlı olarak semen analizi terminolojileri Tablo 2.2'de ve Tablo 2.3'de gösterilmiştir (WHO, 2010).

Tablo 2.2 Dünya Sağlık Örgütüne göre semen analizi referans değerler (World Health Organization, 2010)

Parametre	WHO 1999	WHO 2010
Semen hacmi (ml)	≥2 ml	1,5 ml
Toplam sperm (ejakulat/106)	40 milyon	39 (33-46) milyon
Sperm sayısı/ml	20 milyon	15 (12-16) milyon
Total motilite (%)	>50	40 (38-42)
Hızlı ileri hareketli,%	25	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm,%)	75	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal form, %)	-	4 (3,0-4,0)
pH	≥7,2	≥7,2
Peroksizom-pozitif lökosit	<1,0	<1.0

Tablo 2.3 Dünya sağlık Örgütü göre semen kalitesine ilişkin terminoloji (World Health Organization, 2010)

<b>Semen analizi terminolojileri</b>
Normozoospermi: Alt referans limitlerine eşit veya yüksek toplam sperm sayısı (veya raporlanan sonuca göre, konsantrasyonu) , ileriye doğru hareketli (PR) ve morfolojik olarak normal spermatozoa yüzdeleri
Oligozoospermi: Alt referans limitinden düşük toplam sperm sayısı (veya raporlanan sonuca göre, konsantrasyonu)
Asthenozoospermi: Hem ileri hareketli spermlerin (PR) hem de morfolojik olarak normal spermlerin yüzdesi alt referans limitlerinden düşük
Teratozoospermi: Alt referans limitinden düşük yüzdede morfolojik olarak normal spermler
Oligoasthenoteratozoospermi: Alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı (veya raporlanan sonuca göre, konsantrasyonu) , hem ileri hareketli (PR) hem de morfolojik olarak normal spermlerin yüzdeleri
Azospermi: ejakülatta hiç sperm olmaması
Aspermi: semen yok (retrograd ejakülasyon var veya yok)
Kriptoospermi: taze preparatlarda sperm olmamasına rağmen santrifüjlenmiş pellette gözlenir
Lökospermi :ejakülatta eşik değeri üstünde lökosit varlığı
Nekrozoospermi: ejakülatta düşük yüzdede canlı ve yüksek yüzdede cansız spermler

### **2.5.1 Azospermi**

Azoospermi, uygulanan değerlendirme yönteminin kantitatif analiz limitine göre ejakülata santrifüjü sonrasında pellette hiç spermin bulunmaması durumudur (World Health Organization, 2010), tüm erkeklerin %1'inde, infertil erkeklerin % 15'inde tespit edilir ve obstrüktif azospermi (OA) ve non-obstrüktif azospermi (NOA) olarak sınıflandırılabilir (O'connell et al., 2002; Wosnitzer et al., 2014).

Obstrüktif azospermi (OA) - vas deferensin (CUAVD) doğuştan tek taraflı olarak yokluğunun veya konjenital bilateral vaz deferens yokluğunun (CBAVD) bir sonucu olabilir. Kistik fibroz transmembran regülatörü (CFTR) proteininin mutasyonları ile ilişkili olup, bunun sonucunda vaz deferansin olmamasına ve epididimisin kısmen veya tamamen yokluğuna yol açar (J. Y. Lee, Dada, Sabanegh, Carpi, & Agarwal, 2011; Wosnitzer et al., 2014).



Sperm taşıyan kanalların tıkanmasından dolayı sperm elde edilemediği için cerrahi yöntemle tıkanıklığın geçirilmesi halinde spermatogenez normale döner (J. Y. Lee et al., 2011). Azospermi vakalarının % 40'ını oluşturan OA, tipik olarak normal ekzokrin ve endokrin fonksiyonun korunmasının yanısıra, testiste normal spermatogenezle eşlik eder (Association & Medicine, 2006).

Nonobstruktif azospermi - primer testis yetmezliği olarak bilinir. Hipotalamik-pituiter-adrenal eksen anormallikleri (sekonder testikül yetmezliği olarak da bilinir) ile ilişkili olabilir. İki farklı etyoloji hormon seviyelerine göre kolaylıkla ayırt edilir (J. Y. Lee et al., 2011). Bu erkeklerin spermatogenez düzeyleri, sperm üretmeye yetmeyecek kadar düşüktür. Üreme yetmezliğine herhangi bir çevresel faktör sebep olmamışsa, böyle vakaların çoğunda üreme yetmezliği genetik bir temelden kaynaklanır (Koşar & Özçelik, 2007).

## **2.6 - Erkek İnfertilitesinde Genetik Değerlendirme**

Erkek infertilisine yol açan nedenlerin bir kısmı sonradan oluştuğu halde, bir kısmı genetik kökenlidir. Özellikle azospermik ve şiddetli oligospermik hastaların etiyolojilerinde hem cinsiyet kromozomlarında hem de otozomal kromozomlarda meydana gelen sayısal ve yapısal bozukluklar önemli yer tutar (Tablo 2.4) (Koşar & Özçelik, 2007). Azospermi vakalarının yaklaşık %29'unun, temelinde yatan faktör genetik anomalilerdir (Dohle et al., 2002). Ayrıntılı bir genetik öyküyle birlikte, karyotip ve Y mikrodelsiyon analizleri bu bozuklukların bir kısmını saptayabilmektedir (Jungwirth et al., 2012).

Tablo 2.4 Erkek infertilitesi ile ilişkili en sık görülen genetik anomalilerin görülme sıklığı ve fenotipi (Tahmasbpour, Balasubramanian, & Agarwal, 2014)

Genetik anormallikler	Fenotip	Görülme sıklığı
Kromozom anomalileri	azospermi → normospermi	%2-10
<u>Sayısal anomaliler</u>		%5-10 azospermi
Klinefelter sendromu	azospermi → şiddetli oligospermi	%2-5 oligospermi
Diğer cinsiyet sendromları	azospermi → normospermi	%0,1-0,2
<u>Yapısal anomaliler</u>		
Robertsoniyan translokasyonlar	azospermi → şiddetli oligospermi	%0,5-1
Resiprokal translokasyonlar	azospermi → şiddetli oligospermi	%0,5-1
Y kromozom delesyonları ve mikrodelesyonları	azospermi → şiddetli oligospermi	%5-10
AZFa	azospermi → SCOS	%0,5-1
AZFb	azospermik durdurulması → spermatogenezin	%0,5-1
AZFc	azospermi → şiddetli oligospermi	%3-7
AZFb,c	SCOS → spermatogenezin durdurulması	%0,5-1
Parsiyel AZFc delesyonları	azospermi → normospermi	%3-5
<u>Genetik mutasyonlar</u>		
CFTR	obstruktif azospermi	%4-5

### 2.6.1 Kromozomal anomaliler

Kromozom anomalilerin görülme oranları, normal populasyonda %0,5 iken infertil erkeklerde bu oran %5,8'e yükselmektedir (Shah, Sivapalan, Gibbons, Tempest, & Griffin, 2003). İnfertil erkeklerde, spermatogenik bozukluğun ciddiyetine bağlı anöploidi insidansı %2-15 arasında gözlenmektedir. Cinsiyet kromozom anomalilerin ise otozomal kromozom anomalilerinden daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (%4,2'ye karşın %1,5) (Stouffs & Lissens, 2012). Azospermi veya oligozoospermisi olan erkeklerin

yaklaşık %3–13'ünde sayısal veya yapısal kromozom anormallikleri bildirilmiştir (Durak Aras et al., 2012).

Kromozom anomalilerinin çoğu mayoz aşamasında oluşmaktadır (Martin, 2008). Mayoz bölünmede oluşan kromozomal rekombinasyon, spermatogenez sırasında kromozomların doğru ayrılması için de oldukça önemlidir. Sperm üretiminde bozulma hem sayısal hem de yapısal kromozomlardaki yüksek frekans ile ilişkilidir (Csilla Krausz, 2011). Kromozom anomalileri sayısal ve yapısal anomaliler olmak üzere ikiye ayrılır (Poongothai, Gopenath, & Manonayaki, 2009).

#### *2.6.1.1 Yapısal kromozom anomalileri*

Yapısal kromozomal anomalileri, translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar, duplikasyonlar, izokromozom, insersiyon gibi kromozomların yapılarında değişiklik yaratarak ortaya çıkan aberasyonlar olarak tanımlanabilir (Neto, Bach, Najari, Li, & Goldstein, 2016).

İnfertil erkeklerde saptanan yapısal kromozom anomali taşıyıcılık sıklığı, genel popülasyona göre 6 kat daha yüksek bir yüzde (%2 oranında) olarak gözlenmektedir. En sık gözlenen anomaliler ise sırasıyla; robertsonian translokasyonlar %0,7, resiprokal translokasyonlar %0,6, inversiyonlar ise %0,2 olarak sıralanabilir (Anton, Vidal, & Blanco, 2011; Mau-Holzmann, 2005).

##### *2.6.1.1.1 Resiprokal translokasyonlar*

Resiprokal translokasyonlar homolog olmayan kromozomlar arasında parça değişimi sırasında oluşmaktadır. Bu kromozom anomalileri azospermik erkeklerde oligospermik erkeklere göre daha az görülür. Resiprokal translokasyonlar mayozda oluşan hata sonucu spermatogenezde olgunlaşmada duraklamaya ve dengesiz gamet oluşumuna yol açmaktadır (Piomboni, Stendardi, & Gambera, 2014).

##### *2.6.1.1.2 Robertsonian translokasyonlar*

İki akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21 ve 22) kısa kollarının kaybı ve uzun kollarının sentromer bölgesinin yakınlarında birleşmesi sonucu oluşmaktadır (Neto et al., 2016).

##### *2.6.1.1.3 Inversiyon*

Otozomal inversiyonlar genetik materyal kaybına neden olmayan yapısal kromozom anomalileridir. İversiyon sırasında genetik materyal kaybı

veya artışı yoksa (dengeli) klinik olarak önemli sonuçlar karşımıza çıkmaz. Bu durumlarda genelde ters dönen gen diziliminde çok büyük farklılıklar olmamaktadır. Eğer yeni gen dizilimi bir artış veya eksilme ile sonuçlanmışsa (dengesiz), hastalarda ciddi klinik tablo izlenebilir. Perisentrik inversiyon segregasyon çalışmalarında dengesiz anomali taşıyan sperm oranının %1 ile %54 arasında olduğu bildirilmiştir (Karkucak M., 2016). İnversonlar, mayoz bölünmede homolog kromozomların eşleşmesi sırasında delesyon ve duplikasyon oluşumuna yol açarak germ hücre arresti veya yüksek oranda anöploid sperm hücrelerinin oluşumuna neden olmaktadır (Anton, Blanco, Egozcue, & Vidal, 2005).

Kromozom 9 inversiyonları erkek taşıyıcılarda azospermi, oligozoospermi, astenozoospermi veya normozoospermiye neden olabilir. Ayrıca bu anomaliye sahip bireylerde sperm anöploidi insidansı daha yüksektir (Csilla Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

#### *2.6.1.1.4 46,XX kromozom kuruluşlu erkek sendromu*

46, XX erkek sendromu (aynı zamanda de la Chapelle sendromu olarak da bilinir), Genetics Home Reference'a göre iyirmi bin çocukta 1 görülme sıklığına sahiptir (Csilla Krausz & Riera-Escamilla, 2018). SRY geninin X kromozomuna translokasyonu, bu sendromun %80-90'ından sorumludur (Bashamboo & McElreavey, 2016; Zenteno-Ruiz, Kofman-Alfaro, & Méndez, 2001). Y kromozomu ile X kromozomu arasında bir translokasyon gerçekleşmesi sonucunda SRY içeren parçanın X kromozomuna geçmesiyle karyotipi 46,XX olan fakat erkek fenotipinde gelişen bireyler ortaya çıkar (Dündar, 2016). SOX9 geni, SRY geninin doğrudan bir hedefidir ve aşırı ekspresyonu, SRY geninin yokluğunda erkek gelişimini taklit edebilir. SRY negatif XX erkeklerde mutasyonlar ve SOX9 geninin yukarı yönlü regülasyon bölgesinin küçük duplikasyonları gösterilmiştir (Zorrilla & Yatsenko, 2013). Bu sendromu taşıyan erkeklerde Klinefelter sendromlu erkeklere göre jinekomasti insidansı daha yüksektir ve istisnasız azospermiklerdir (Vorona, Zitzmann, Gromoll, Schüring, & Nieschlag, 2007).

#### *2.6.1.2 Sayısal kromozom anomalileri*

Ebeveynlerdeki germ hücre oluşumu sırasında mayotik bölünmede ayrılama (non-disjunction) nedeniyle sayısal kromozom anomalileri oluşabilir. Bu anomaliler, infertil erkeklerde fertil erkeklere göre 8 kat daha fazla görülmektedir (Bourke, Herlihy, Snow, Metcalfe, & Amor, 2014; Poongothai et al., 2009).

### 2.6.1.2.1 Klinefelter sendromu

Azospermik hastaların %11'inin ve infertil erkeklerin %3'ünün etyolojisinde Klinefelter sendromunun rol oynadığı saptanmıştır. Hastalarda görülen fazladan X kromozomu, genellikle gametogenez esnasında ovum ya da spermin normal seks kromozomu yanında fazladan X kromozomu taşıması ile oluşur. Zigot oluştuktan sonraki mitoz evrelerindeki hatalardan kaynaklanarak gelişen Klinefelter sendromlu olgular daha nadirdir (Peynirci & Erturk, 2013).

### 2.6.1.2.2 XYY erkekleri

XYY sendromu bin canlı erkek doğumdan birinde ortaya çıkan bir cinsiyet kromozom anöploidisidir. Bu anomaliye sahip kişiler sıklıkla uzun boylu, agresif olabilirler ve davranış bozuklukları sergileyebilirler. Bunların yanısıra bu hastalarda iskelet bozuklukları ve zihinsel hastalıklarda görülebilir (Ross et al., 2012).

### 2.6.1.2.3 Miks gonadal disgenezi

Fenotipik olarak, karışık gonadal disgenetik hastalar erkek, kadın veya belirsiz cinsiyete sahip olabilirler. Bu hastaların yaklaşık % 33'ünde normal karyotip görülmektedir (Ceylan & Ceylan, 2015). Geri kalan hastalarda iki veya üç farklı hücre dizini oluşur: 45,X/, 46,XY/, 47,XYY ve bunlardan 47,XYY genellikle sonraki bölünmelerde kaybolabilir (Farrugia et al., 2013). Bu hastalarda Y kromozomunun yeniden düzenlenmeleri görülebildiği ve bu oranın %32-63 dolaylarında olduğu bildirilmiştir (Lindhardt Johansen et al., 2012).

## 2.6.1.3 Y kromozomu yapısal bozuklukları

### 2.6.1.3.1 İzodisentrik Y kromozomu

İzodisentrik Y (idicY) kromozomu insanda en sık bildirilen Y kromozomunun aberasyonlarından biridir (DesGroseilliers, Beaulieu Bergeron, Brochu, Lemyre, & Lemieux, 2006). İzodisentrik kromozom oluşumunun en olası mekanizmasının izokromatitte bir kırılma ve ardından U-tipi bir değişim olduğu bilinmektedir (Bouayed Abdelmoula & Amouri, 2005).

1. idicYq kromozomu: Y kromozomunun kısa kollarının kırılması ve uzun kollarının sentromer bölgesinde birleşmesi ile sonuçlanır.

2. idicYp kromozomu: Y kromozomunun uzun kollarının kırılması ve kısa kollarının sentromer bölgesinde birleşmesi sonucunda meydana gelir. Bu

kırılma AZF bölgesini içerebilir. Delesyon veya yeniden düzenlenmeye neden olabilir. Bunun yanısıra bu olgularda çeşitli düzeylerde spermatogenik yetmezlik izlenebilir (DesGroseilliers et al., 2006; Faure et al., 2007).

## 2.6.2 Y kromozomu ve infertilite

Y kromozomu mikrodelsyonları, azosperminin en yaygın nedenidir ve azospermik infertil erkeklerin % 5-15'inde görülmektedir. Y kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan AZF bölgesi, sperm gelişimi ve farklılaşmasından sorumludur (Poongothai ve ark., 2009). AZF bölgesi çoklu gen aileleri, AZFa, AZFb, AZFc bölgelerini içermektedir (Ferlin ve ark., 2007).

### 2.6.2.1 Y kromozomu yapısı ve özellikleri

İnsanda Y kromozomu tüm genomun yaklaşık %2-3'ünü oluşturur. Kısa kolu Yp ve uzun kolu Yq olarak adlandırılır. Y kromozomu psödootozomal, heterokromatin ve ökromatin bölgelerden oluşur. Psödootozomal bölgeler (PARs) Yp'nin (PAR1) ve Yq'nun (PAR2) uç kısımlarında bulunur (Şekil 2.3). Bu bölgeler, mayoz esnasında X kromozomunun psödootozomal bölgeleriyle rekombinasyona girerler. Psödootozomal bölgede bulunan genler aynı otozomal genler gibi kalıtılır (Nailwal & Chauhan, 2016). Y kromozomunun çoğunu (%95) rekombinasyona girmeyen bölge (NRY) olarak adlandırılan kromozomun heterokromatin ve ökromatin bölgeleri oluşturur. Heterokromatin bölge Yq'nun distalinde bulunur ve genetik olarak etkisiz kabul edilen bu bölgenin çoğunluğunu tekrar dizileri (DYZ1 ve DYZ2) oluşturur. Ökromatin bölge ise PAR1'in distalinde yer alır ve Yp ve Yq'nun parasentromerik bölgeleri ile sentromer bölgesini oluşturur. Cinsiyetin belirlenmesi, gonadoblastom, boy kontrolü ve spermatogenezden sorumlu tüm aktif genler bu bölgede lokalize olmuştur (Yiğın & Gökçe). Tekrar dizilerinin fazla olmasından dolayı Y kromozomunda delesyonlar sık görülür (Griffin & Finch, 2005).



Şekil 2.3 Y kromozomu üzerindeki ökromatin, heterokromatin ve psödootozomal bölgeler (Hawley, 2003)

## SRY geni (Sex Region of Y)

Bipotansiyel gonadın testis yönüne farklılaşması için gerekli olan gen SRY'dir (Maan et al., 2017). Y kromozomunun kısa kolundaki (Yp) genler (SRY) testis gelişiminde, uzun kolundaki (Yq) genler ise spermatogenezde rol alırlar (Yiğın & Gökçe).

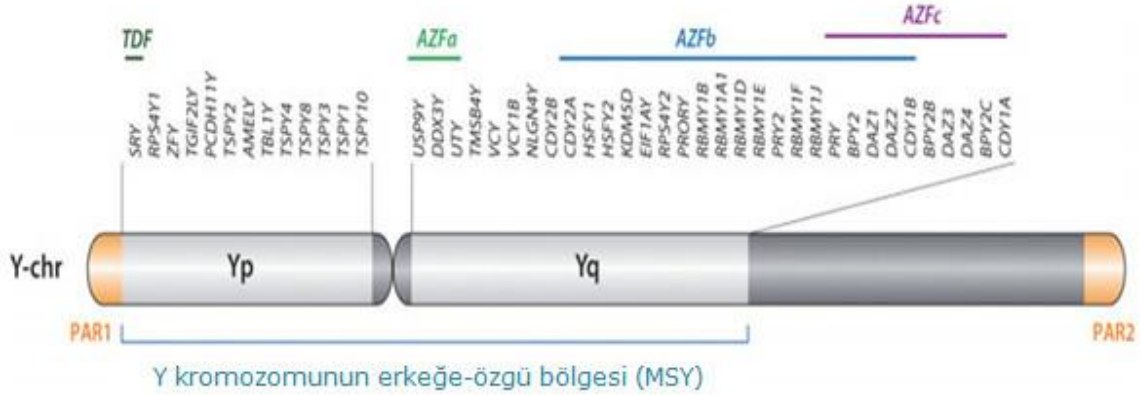
Yp11.3 bandında tanımlanan ve intronsuz olan SRY'nin tek ekzonunun oluşturduğu 1,1 kb boyutundaki transkriptlerin ürettiği proteinler, iki yüz dört aminoasit uzunluğundadır ve HMG-BOX'a (high mobility group) ait homolog diziler içerir (Şekil 2.4). HMG-BOX, ileri düzeyde korunan DNA bağlayıcı, yetmiş dokuz aminoasitlik bir motiftir. DNA'nın kıvrılmasına yardımcı olarak, hedef genin aktivasyonu veya supresyonunu ve gendeki transkripsiyonunun hızlanması veya yavaşlamasını sağlar (Girardi, Mielnik, & Schlegel, 1997; Hucklenbroich et al., 2005; Lipshultz, Howards, & Niederberger, 2009; Özdiler & Aydos, 2000).



Şekil 2.4 SRY geni ve HMG kutusu (Harley, Clarkson, & Argentaro, 2003)

### 2.6.2.2 Azospermi faktörü ve Y mikrolelesyonları

Azospermik erkeklerin bir kısmında, Y kromozomunun uzun kolunda (Yq11) delesyonların saptanması üzerine spermatogenezin bu bölgeden regüle edildiği tahmin edilmiş ve bu bölge azospermi faktör bölgesi (AZF) olarak tanımlanmıştır. AZF bölgesindeki genler yalnız spermatogenezle ilgili genlerdir. Bu nedenle bu bölgedeki delesyonlar fenotipik bozukluk yapmadan izole spermatogenez defektine (şiddetli oligospermi ya da azospermiye) neden olur (Koşar & Özçelik, 2007). Y kromozomunun uzun kolunda bulunan AZF bölgesi, AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd bölgelerine ayrıştırılmaktadır (Şekil 2.5). AZF genleri bu bölgelerde bulunmaktadır (Küçükaslan et al., 2013; Simoni, Bakker, & Krausz, 2004). AZFb ve AZFc bölgelerinde oluşan delesyonların etkisi fenotipik olarak farklı olsada, dizileri Yq bölgesinde çakışmaktadır. Bu tip delesyonlar AZF b+c delesyonu olarak adlandırılır (Yiğın & Gökçe).



Şekil 2.5 Y kromozomu üzerinde protein kodlayan genleri içeren MSY (male specific region) bölgesinin, AZFa, AZFb, AZFc bölgeleri; PAR1 ve PAR2 bölgelerinin şematik görünümü (Kido & Lau, 2015)

### 2.6.2.2.1 AZFa bölgesi

Y kromozomunun AZFa bölgesinde yer alan genler spermatogenezde rol oynarlar. AZFa bölgesinin parsiyel delesyonları hipospermatogenez ile sonuçlanmaktadır. Bu bölgede oluşan komplet delesyonları ise seminifer tubüllerde germ hücre üretimi ve olgunlaşmasını inhibe eder. AZFa bölgesinde bulunan aday genler USP9Y, DBY ve UTY'dir (Majdic et al., 1998; Suganthi, Vijesh, Vandana, & Benazir, 2014).

AZFa mikrolelesyonları SCOS (sadece Sertoli hücresi sendromu) ile ilişkilendirilmiştir (Poongothai et al., 2009). Parsiyel AZFa delesyonlarının bildirilen prevalansı geniş bir aralıkta (%0,2-11) yer almaktadır (Kleiman et al., 2012).

#### USP9Y (Ubiquitin Specific Protease 9, Y Chromosome)

USP9Y geni 46 ekzondan ve 159 kb genomik DNA'dan oluşur. USP9Y geni ubiquitine özgü bir proteazı kodlar ve peptidaz C19 ailesine aittir (Sun et al., 1999). USP9Y normal spermatogenez için gerekli değildir, ancak AZFa bölgesindeki diğer potansiyel aday genler ile kombinasyon halinde fertilitte üzerinde etki gösterdiği düşünülmektedir (Foresta, Ferlin, & Moro, 2000).

#### DBY (Dead/H box-3, Y-linked)

Özellikle testis dokusunda ifade edilen DBY geni 16 kb uzunluğundadır ve 17 ekzondan oluşur (Foresta et al., 2000). Bu gen, adenozin trifosfata (ATP) bağımlı bir ribo nükleik asit (RNA) helikaz'la DEAD (asp-glu-ala-asp) kutusu proteinini kodlar ve spermatogenez öncesi mayotik spermatogonia



fazında önemli bir rol oynar (Vineeth & Malini, 2011). Moleküler analizler, infertil hastalarda DBY geninde saptanan delesyon veya mutasyon oranının USP9Y ve UTY genlerine göre daha yüksek olduğunu ortaya çıkardı (Foresta et al., 2000).

UTY (Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat Containing, Y-Linked)

UTY geni 30 ekzonludur ve X kromozomunda homologu vardır. UTY tetratrikopeptid tekrarları bakımından zengin bir proteini kodlar. Bu gen AZFa bölgesine karşılık gelen 5C aralığında yerleşmektedir (Greenfield et al., 1998).

TB4Y (Thymosin, beta-4, Y chromosome)

TB4Y, insan Y kromozomunun uzun kolunda 5D bölgesine yerleşmektedir ve 2 ekzonludur (Yang et al., 2018). TB4Y geninin testiküler fonksiyonlara katılımı bilinmemektedir (Colaco & Modi, 2018).

#### 2.6.2.2.2 AZFb bölgesi

AZFb lokusu Yq11 merkez bölgesinde bulunur ve 3,3 Mb'lık alanının AZFc lokusunun 1,5 Mb'lık alanı ile örtüşmektedir (Colaco & Modi, 2018). AZFb bölgesi spermatozoid olgunlaşmasında gerekli olan bölge olarak bilinmektedir (Kichine et al., 2011). AZFb bölgesi delesyonlarına sahip hastalarda AZFa delesyonlarının aksine normal spermatogonyum ve primer spermatozoid oluşumu vardır. Ancak pre-mayotik spermatogonyum duraklama ya da SCO sonucunda azospermi görülür. Bu bölge çok kopyalı gen aileleri içerir. (C Krausz, Hoefsloot, Simoni, & Tüttelmann, 2014).

RBM1A1 (RNA binding motif protein, Y-linked, family 1, member A1)

RBM1A gen ailesinin bir üyesidir ve erkek germ hücrelerinde eksprese olur (Yiğın & Gökçe). RBM1A1, N terminalinde bir RNA bağlama motifi ve C-terminalinde dört SRGY (serin, arginin, glisin, tirozin) kutuları içerir (Kleiman et al., 2012). Bu gendeki değişiklikler AZFb mikrodelsyonu fenotipinde önemli rol oynamaktadır (Elliott, 2000).

RPS4Y2 (Ribosomal protein S4, Y linked)

RPS4Y1 testiste ve prostat dokularında eksprese edilir ve spermatogenez sırasında daha fazla ifade edilir. Ribozoma bağlanan mRNA için gerekli olan yapısal olarak korunmuş bir ribozomal protein alt birimini kodlar ve spermatogonyum sürecin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynar (Colaco & Modi, 2018; Lopes et al., 2010).

EIF1AY (Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A, Y linked)

Translasyon başlatıcı bir faktörü kodlamaktadır. Homoloğu X kromozomu üzerinde yer alan eIF-1A'nın Y izoformunu kodlar. Spermatogenezdeki rolü henüz belirlenememiştir (Yu, Wei, Jiang, & Zhang, 2015).

KDM5D (alias SMCY)

Dört proteinli KDM5 ailesinin bir üyesidir ve her iki cinsiyet genomlarında korunmuştur. KDM5D, mayoz sırasında kromozom yoğunlaşmasında önemli bir rol oynar ve böylece AZFb delesyonlarına bağlı spermatozoid aşamasında gözlemlenen olgunlaşma tutukluğunu açıklar (Li et al., 2016).

XKRY (X linked Kell Blood group precursor, Y linked)

XKRY geni, insan Y kromozomunun uzun kolunda 5L bölgesinde yerleşmektedir ve iki kopya halinde bulunur (Yang et al., 2018). XKRY geni, spesifik olarak testiste eksprese edilir, ancak spermatogenezde rol oynayabileceği düşünülmüyor (Navarro-Costa, Plancha, & Gonçalves, 2010).

HSFY (Heat Shock transcription factor, Y linked)

HSFY geni HSF (heat shock factor) gen ailesinin üyesi olarak bilinir. Sertoli hücrelerinde ve testisteki spermatogenezde bulunduğu ve spermatogenezde rol oynadığı bilinmektedir (Bağcı & Yüksel).

PRY (PTPN13-like Y linked)

AZFb bölgesinde PRY1, PRY2 ve AZFc bölgesindeki PRY3, PRY4 fonksiyonel kısımları PRY geni tarafından kodlanır. PRY1 ve PRY2, testise özgü ifadeyi gösterir, ancak germ hücrelerinde bu ifade düzensizdir ve sadece bazı sperm ve spermatoidlerde saptanmıştır. PRY-pozitif hücrelerin yaklaşık %40'ı DNA fragmentasyonu gösterdiğinden PRY geninin erkek germ hücre apoptozisinde rol oynadığı öne sürülmüştür (Stouffs et al., 2001; Stouffs et al., 2004).

#### *2.6.2.2.3 AZFc bölgesi*

AZF bölgeleri arasında delesyonlar en sık AZFc bölgesinde görülmekte ve bunun sonucu olarak hipospermatogenez meydana gelmektedir. AZFc bölgesinin delesyonları nonobstruktif azospermili erkeklerde yaklaşık %12

iken, ciddi oligospermisi olan erkeklerde ise yaklaşık %6 oranında görülmektedir (Foresta, Moro, & Ferlin, 2001). AZFc lokusu Yq'nun distal kısmında yer almaktadır ve 4,5 Mb'lık alan kapsamaktadır. AZFc lokusu iyirmi bir aday gen ve özellikle testiste eksprese olan on bir transkripsiyon ailesinin ünitelerini kodlamaktadır (Yu et al., 2015).

#### DAZ (Deleted in Azoospermia)

DAZ, infertil erkeklerin Y kromozomunda sıklıkla delesyona uğrayan bir gen olarak bilinmektedir (Colaco & Modi, 2018). Bu gen grupları AZFc lokusunun distalinde yer alan, ardışık tekrarlanan iyirmi dört aminoasitlik 7-11 kopyadan oluşan bir proteini kodlarlar. DAZ gen grupları AZFc lokusunun 42 kb'lık bir bölgesini kapsarlar. DAZ genlerinin dört kopyası var, birinci kümede DAZ1 ve DAZ2, ikinci kümede DAZ3 ve DAZ4 olmak şeklinde iki kümede oluşmaktadır. Dört DAZ geninin tamamı (>%99.9) aynı DNA dizisine sahiptir (Saxena et al., 2000). DAZ geninin kopyaları spermatogonialarda eksprese olurlar ve spermatogenez için önemli olan RNA – bağlayıcı proteini kodlarlar (Alechine & Corach, 2014). DAZ gen ailesinden herhangi bir kopyasında kayıp oluştuğunda infertil erkeklerin, azospermiye veya şiddetli oligozoospermiye çok yatkın olabildiği bilinmektedir (Lu et al., 2014; Sen et al., 2015). DAZ gen ailesi, germ hücre gelişimi için kritik ve önemli rol aldığı kabul edilmektedir (Colaco & Modi, 2018).

#### CDY (Chromodomain Protein Y linked)

AZFc bölgesi CDY geninin iki identik (CDY1A ve CDY1B) kopyasını kendinde barındırıyor. Bunun yanı sıra P5 palindromunda bir çift (CDY2A ve CDY2B) gibi yakından ilişkili genlere sahiptir. CDY1 geni, N-terminal kromatin-bağlayıcı bölge içeren gen ekspresyonunda, kromatin yeniden düzenlenmesinde bir proteini kodlar (Lahn et al., 2002; Vogt, 2005).

#### BPY2 (Basic Protein Y linked, 2)

BPY2 geni, spermatositlerin çekirdeğinde, yuvarlak spermatidlerde ve spermatogoniumlarda lokalize olur. Spesifik olarak testiste eksprese edilir ve protein ürünü erkek germ hücre gelişiminde rol oynamaktadır. Bu genin neredeyse identik olan kopyaları (BPY2A, BPY2B ve BPY2C) Y kromozomu üzerinde mevcuttur (Tse et al., 2003). BPY2 geninin, küçük pozitif yüklü protein kodladığı ve spermatogenezin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Singh et al., 2015). BPY2 genindeki bazı genetik varyantlar SCO'larla ilişkilidir (Choi et al., 2007).

## TTY4 (Testis-Specific Transcript, Y-Linked 4)

TTY4 geninin üç kopyası vardır, TTY4A, TTY4B ve TTY4C. Bu gen proteini kodlamayan bir RNA olarak düşünülmektedir, fakat ayrıntılı olarak incelenmemiştir (Repping et al., 2002; Repping et al., 2004). Ancak, 2018 yılında yapılan bir çalışmada, bir veya daha fazla TTY4C geninin kopyasının kaybı, erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Colaco & Modi, 2018).

### 2.6.2.2.4 AZFd bölgesi

AZFd lokusu ilk defa multipleks PCR reaksiyonları kullanılarak tanımlanmıştır. AZFb ve AZFc arasında yer alabileceği düşünülmüştür (Kent-First et al., 1999). AZFd bölgesi son yıllarda yapılan çalışmalara göre, ayrı bir gen bölgesi olarak AZFb ve AZFc bölgeleri arasında yer aldığı bilinmektedir.

AZFd delesyonlu hastalar hafif oligozospermisi veya normal sperm sayısı olmasına rağmen anormal sperm morfolojisine sahip olabilirler (Lahn, Pearson, & Jegalian, 2001). Ayrıca, infertil erkeklerde AZFd delesyonlarını bildiren yeni çalışmalar, erkek fertilitesinde AZFd lokusunun önemli rolünün olabileceğine daha fazla güven katmaktadır (Al-Achkar, Wafa, & Moassass, 2013; Hussein, Vasudevan, Patimah, Prashant, & Nora, 2015).

### 2.6.2.2.5 Y mikrolelesyon mekanizması

Y kromozom mikrolelesyonları, homolog rekombinasyondaki hatalardan dolayı meydana gelir.

AZFa delesyonları, proksimal Yq11 bölgesinde yer alan iki insan endojen retroviral sekansı olan HERV15yq1 ve HERV15yq2 arasındaki homolog intra-kromozomal rekombinasyondan kaynaklanır (Sun et al., 2000). AZFb delesyonları ise, Yq kolunda yer alan palindrom P5 ve palindrom P1'in proksimal kolu arasında oluşan homolog rekombinasyondan kaynaklanır (Repping et al., 2002). AZFc delesyonlarının, P3 ve P1 palindromlarında yer alan b2 ve b4 sub-amplikonlar arasındaki homolog rekombinasyondan kaynaklandığı gösterilmiştir. AZFc bölgesinin Yq12 heterokromatik bölgeye yakın yerleşmesi, aynı zamanda, eşit olmayan intra-kromozomal rekombinasyon yüzdesini de tetikleyerek AZFc delesyonunu artırır (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Suganthi et al., 2014).

### 2.6.2.3 Y kromozom parsiyel delesyonları

Komplet AZFc, parsiyel AZFa veya parsiyel AZFb delesyonunun varlığı durumunda başarılı TESE prosedürü (testisten matür sperm elde edilmesi)

uygulanabilmektedir. Bu nedenle Y kromozom delesyonunun yerinin ve delesyon büyüklüğünün saptanması büyük önem taşımaktadır (komplet ya da parsiyel). Y kromozom delesyonlarının rutin olarak taranması intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) tedavisi öncesinde önemlidir (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2015).

AZFc bölgesi amplikonlara sahip geniş alanlardan oluşmaktadır. Beş adet geniş ve ters yönde yerleşmiş palindromik dizilim bulunur: b1, b2, b3, b4 ve gr/gr. Bu dizilimler çeşitli büyüklükte delesyonlara yatkınlık oluşturur. (Dündar, 2016). AZFc bölgesindeki önemli gen kaybına neden olan parsiyel delesyonların (yani b1/b3, b2/b3 ve gr/gr delesyonları) infertilite üzerinde etkisi belirsizdir (Hucklenbroich et al., 2005). Gr/gr delesyonları, AZFc bölgesi içinde yer alan 1,6 kb'lık bir bölgenin delesyonu olarak bilinmektedir. Her zaman azospermi ya da oligospermiye yol açmayan bu delesyonların semen kalitesini düşürdüğü, subfertiliteye ya da infertiliteye yol açan bir risk faktörü olduğu yapılan bir meta-analizle gösterilmiştir (Dündar, 2016).

Parsiyel AZFb delesyonları, olguların %50'sinde sperm geri kazanımı ile ilişkili iken, tam AZFb tam AZFb delesyonu olan bir hastada, olgun spermatozoa bulunma olasılığı çok düşüktür (Csilla Krausz, Quintana-Murci, & McElreavey, 2000).

#### *2.6.2.4 Y kromozom mikrolelesyon tayin yöntemi*

##### *2.6.2.4.1 Multipleks PCR yöntemi*

Devyser AZF kiti kullanılarak yapılan diagnostik testler Y-kromozomunun AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerinin sekans etiketli bölgelerinin (STS - sequence-tagged sites) PCR amplifikasyonuna dayanır. Bir STS markerinin başarılı amplifikasyonu, analiz edilen bölgenin varlığını gösterirken, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonunun gerçekleşmemesi ise delesyon varlığının göstergesidir (Şekil 2.6). Toplam on dört marker için primerler bir multipleks PCR reaksiyonunda birleştirilir (Devyser AZF, Instructions for Use, 7-A101-En, Jan-2012 © Devyser AB 2009-2012) (Şekil 2.7).

STS Marker	Lokus	Haritada pozisyonu	Marker uzunluğu ( $\pm 2,5$ bp)
sY255**	DAZ1-4	13	123 bp
sY131	DYS222	10	169 bp
sY90	DYS278	8	175 bp
sY81	DYS271	3	208 bp
sY625	G65849	5	254 bp
sY127**	DYS218	9	273 bp
sY157	DYS240	14	290 bp
sY134**	DYS224	11	304 bp
sY86**	DYS148	4	318 bp
sY84**	DYS273	6	329 bp
sY254**	DAZ1-4	12	376 bp
M259	DDX3Y	7	396 bp
ZFY/ZFX	ZFY / ZFX	2	432/433 bp
sY14 (SRY)	SRY	1	464 bp

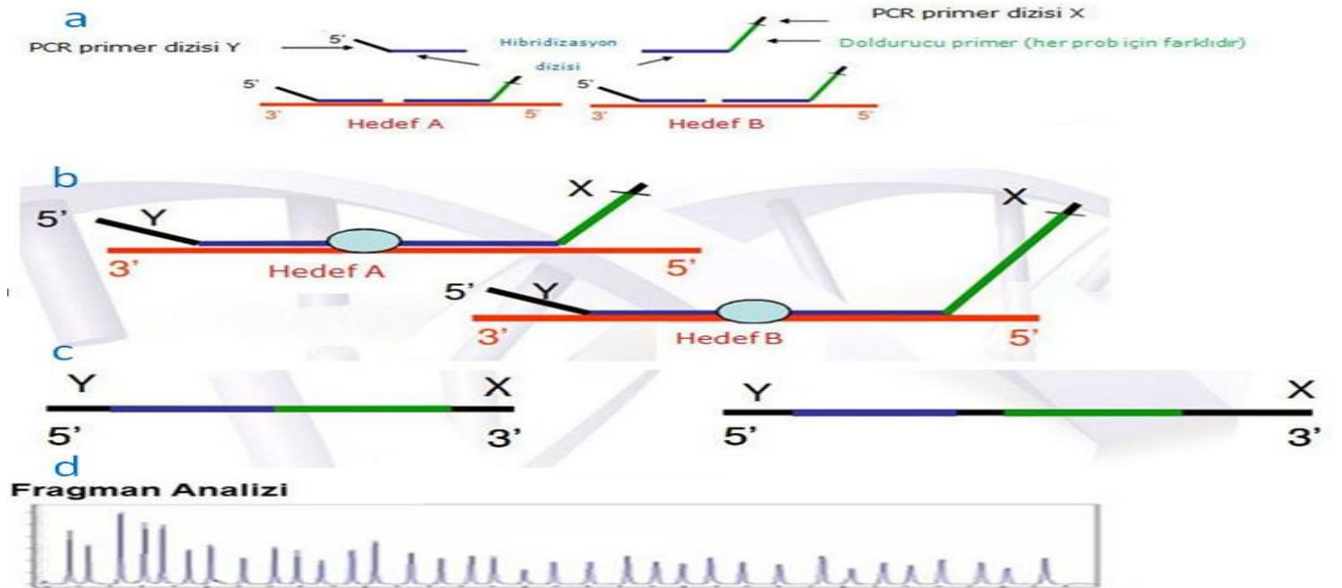
Şekil 2.6 STS primer seti (Devysler AZF, Instructions for Use, 7-A101-En, Jan-2012 © Devysler AB 2009-2012)

Harita	STS	Lokus	Bölge
1	sY14	SRY	Yp11.3
2	ZFY	ZFY	
3	sY81	DYS271	Yq11.21
4	sY86	DYS148	AZFa
5	sY625	G65849	
6	sY84	DYS273	
7	M259	DDX3Y	
8	sY90	DYS278	Yq11.221
9	sY127	DYS218	AZFb
10	sY131	DYS222	
11	sY134	DYS224	
12	sY254	DAZ1-4	AZFc
13	sY255	DAZ1-4	
14	sY157	DYS240	

Şekil 2.7 Y kromozomundaki marker pozisyonlarının şematik görünümü (Devysler AZF, Instructions for Use, 7-A101-En, Jan-2012 © Devysler AB 2009-2012)

#### 2.6.2.4.2 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi 2002'de Schouten ve arkadaşları tarafından tanımlanarak relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tariflenmiştir (Schouten et al., 2002). MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) tek bir nükleotid değişikliği olan dizilerin dahi ayrımını sağlayacak şekilde, elliye kadar farklı genomik DNA veya RNA dizisindeki normal olmayan kopya sayısının tespitini sağlayan bir multipleks PCR yöntemidir. MLPA için tipik olan hedeflenen dizilerin değil, MLPA problemlerinin hedef diziyile hibridizasyonun çoğaltılmasıdır. MLPA tekniği, kullanımı daha hızlı, ucuz, kolay ve birçok laboratuvarında uygulanması mümkün olan bir tekniktir. MLPA çalışması için sadece bir termalcykler ve kapiler elektroforez cihazına ihtiyaç duyulur. Standart multipleks PCR'a karşın, MLPA amplifikasyonu için bir çift PCR primeri kullanılır. Aynı anda 96 numuneyi 24 saat içinde sonuç alacak şekilde işleme tabi tutmak mümkündür. SALSA MLPA kiti ile amplifiye edilen ürünler 130 ile 480 nt arasındaki uzunluklarda değişir ve kapiler elektroforez ile analizi yapılabilir. Elde edilen pik paterninin referans örnek ile karşılaştırılması hangi dizilerin normal olmayan kopya sayısını gösterdiğini belirler. MLPA yöntemi; hedef DNA denatürasyonu ve problemlerin hibridizasyonu, ligasyon (bağlanma) reaksiyonu, PCR reaksiyonu, amplifiye ürünün elektroforez ile ayrıştırılması, verilerin analizi olmak üzere 5 basamakta gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.8) (<https://www.mlpa.com>).



Şekil 2.8 MLPA yönteminin basamakları: a) probun hedef diziyeye hibridizasyon aşaması; b) probun iki parçasının termostabil ligaz tarafından hedef dizilerine birleştirilmesi (ligasyon) aşaması; c) PCR amplifikasyon aşaması; d) analiz aşaması (<https://www.mlpa.com>)

## **3 - GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **3.1 - Örneklerin Eldesi**

Çalışma grubumuz ESOGÜ Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvurup, klinik olarak azospermi tanısı almış ve Tıbbi Genetik Anabilim dalı Tıbbi Genetik polikliniğimize yönlendirilen hastalar arasından seçilerek oluşturulmuştur. Çalışmaya dahil edilecek hastalar, detaylı öykü alımı, fizik muayene, sperm ölçümleri ve sitogenetik incelemeleri yapıldıktan sonra herhangi bir ek sağlık problemi olmayan, normal karyotipe sahip olup sadece infertilite şikayeti olan hastalar arasından seçilmiştir. Multipleks PCR yöntemiyle analiz sonucunda Y mikrolelesyonu saptanmayan elli infertil birey hasta grubumuzu, on beş fertil birey ise kontrol grubumuzu oluşturmuştur. MLPA analizi çalışma yöntemine göre gerekli sayıda fertil olan bireylerin DNA'ları referans olarak kullanılmıştır. Tüm hastalardan ve kontrollerden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

### **3.2 - Gereçler**

MLPA analizinde kullanılan cihaz ve sarf malzemeler aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

#### ***3.2.1. Kullanılan gereçler***

Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Nanodrop 1000 (peqLab)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

PCR tüpleri (0,2 ml)

Ependorf Tüpü (1,5 ml'lik)

Mikro pipet takımı (2-20-100-1000 µl) (Gilson)

Vorteks (Heidolph)

Thermal cycler (PE GeneAmp PCR System 9700)

3130 Applied Biosystems Multiwell 96-well plate

3130 Applied Biosystems Multiwell 96-well septa



Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI Prizm 3130)

Su banyosu

Buzdolabı (Arçelik)

Derin dondurucu (Arçelik)

### **3.2.2 Kullanılan kimyasal malzemeler**

DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen p/n 69504)

SALSA MLPA Y-Chromosome Microdeletions probemix (SALSA P360-A1 - MRC Holland)

Performans Optimize Edici Polimer 7 (POP7 TM) (ABI)

10X EDTA'lı Buffer (ABI)

Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)

Hi-Di Formamide (ABI)

Mineral Yağ (Roche)

Proteinaz K (Qiagen)

Distile Su

Etanol (95%) (Tekel)

### **3.2.3 SALSA MLPA P360-A1 (lot A1-1011) ve prob kiti**

P360-A1 Y-Kromozom Mikrodelesyonları probemix kiti, 136 ila 500 nükleotid (nt) arasında olan 53 MLPA probu içermektedir. İlave olarak içerdiği 120 nt'den küçük dokuz kontrol probunun dördü 64-70-76-82 nt olan miktar fragmentleri (Q-fragments), üç tanesi 88-92-96 nt olan DNA denatürasyon kontrol fragmentleri, biri 100 nt olan X fragmenti ve 105 nt olan Y fragmentidir. Bu P360-A1 probemix kiti, AZFc bölgesi içinde bulunan sekansları tespit eden 13 prob içermektedir. Bu problemlerin 5'i AZFc bölgesinin 2 defa ifade edilen dizisini, iki prob AZFc içinde bulunan 3 hedefi tespit ederken, bir prob AZFc bölgesinde 2 hedefi ve AZFb bölgesinde 1 hedefi tespit etmektedir.

AZFb bölgesinde 2 hedefi tespit eden 3 prob ve AZFb'de bir kere ifade edilen diziyi tespit eden 1 prob , bunun yanısıra AZFc'de iki kere ve AZFb'de bir defa ifade edilen diziyi tespit eden 1 prob dahil olmak üzere toplamda AZFb'yi tespit eden 16 prob içermektedir. AZFa bölgesinin dizilerini tespit eden 14 prob içermektedir (Tablo 3.1, Tablo 3.2) (<https://www.mlpa.com>).

Tablo 3.1 SALSA MLPA P360-A1 prob kitinin bölgeleri (<https://www.mlpa.com>)

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA prob	Kromozomdaki yeri		Saptanan dizi sayısı (UCSC Genome Browser'e esasen)
		referans	hedef-spesifik	
64-70-76-82	Q-fragmanları: DNA miktarı; sadece 100 ng'dan az olan DNA örneğinde görülebilir.			
88-92-96	D-fragmanları: 88 veya 96 nt'lik fragmanların düşük sinyali tamamlanmamış denatürasyonu gösterir			
100	X-fragmanı: X kromozomuna özgü			
105	Y fragmanı: Y kromozomuna özgü			
136	<b>EIF1AY probe</b> 11734 - L12517		Yq11.222	1
142	<b>PPP1R12BP1 probe</b> 12733 - L14796		Yq11.23	1
147	<b>RBMV2CP probe</b> 11804 - L12599		Yq11.223 / Yq11.23	2
153	Referans prob 12212-L13140	<b>3p21</b>		1
160	<b>CDY2B probe</b> 15236-L17486		Yq11.221	1
166	<b>BPY2 probe</b> 11739-L13811		Yq11.223	1
178	<b>BPY2 probe</b> 11740-L14251		Yq11.223	1
184	<b>VCY1B probe</b> 15238-L17485		Yq11.221	1
190	Referans prob 06378-L05844	<b>6p25</b>		1
196	Referans prob 08170-L08050	<b>5q22</b>		1
202	<b>KDM5D probe</b> 11744-L13987		Yq11.222	1
208	<b>KDM5D probe</b> 11747-L12530		Yq11.222	1
215	<b>UTY probe</b> 11812-L13342		Yq11.21	1
223	<b>CDY2A probe</b> 11749-L18625		Yq11.221	1
228	<b>RPS24P1 probe</b> 15239-L18627		Yq11.21	1
234	<b>CDY2A probe</b> 15245-L18626		Yq11.221/Yq11.223/Yq11.23	3
241	<b>KDM5D probe</b> 11754-L12537		Yq11.222	1
247	<b>ARSEP</b> prob 11818-L17483		Yq11.21	1
252	<b>KDM5D probe</b> 11756-L13817		Yq11.223	1
259	<b>RBMV1J probe</b> 11757-L13818		Yq11.223	1
265	<b>DAZ2 probe</b> 11758-L12541		Yq11.223 / Yq11.23	2
271	Referans prob 14361-L00694	<b>4q35</b>		1
276	<b>SRY probe</b> 01023-L15420		Yp11.31	1
283	<b>DAZ2 probe</b> 12738-L12543		Yq11.223 / Yq11.23	2

Tablo 3.1 SALSA MLPA P360-A1 prob kitinin bölgeleri (devamı)  
(<https://www.mlpa.com>)

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA prob	Kromozomdaki yeri		Saptanan dizi sayısı (UCSC Genome Browser'e esasen)
		referans	hedef-spesifik	
64-70-76-82	Q-fragmanları: DNA miktarı; sadece 100 ng'dan az olan DNA örneğinde görülebilir.			
88-92-96	D-fragmanları: 88 veya 96 nt'lik fragmanların düşük sinyali tamamlanmamış denatürasyonu gösterir			
100	X-fragmanı: X kromozomuna özgü			
105	Y fragmanı: Y kromozomuna özgü			
288	<b>CDY2B probe</b> 11759-L14252	Yq11.221 / Yq11.222		2
292	Referans prob 08790-L11322	<b>10q21</b>		1
301	<b>DAZ2 probe</b> 11761-L12544	Yq11.223 / Yq11.23		2
307	<b>DPY19L2 probe</b> 17170-L20718	<b>12q14.2</b>		1
312	<b>UTY probe</b> 11824-L20831	Yq11.21		1
319	<b>RPS24P1 probe</b> 11825-L20832	Yq11.21		1
327	<b>USP9Y probe</b> 11826-L12621	Yq11.21		1
333	Referans prob 01790-L10676	<b>13q14</b>		1
342	<b>VCY1B probe</b> 15243-L15069	Yq11.221		1
347	<b>UTY probe</b> 11828-L19232	Yq11.21		1
355	<b>VCY1B probe</b> 15240-L18629	Yq11.221		1
361	<b>CDY1B probe</b> 15246-L12554	Yq11.223 / Yq11.23		2
366	<b>USP9Y probe</b> 15244-L12618	Yq11.21		1
373	<b>BPY2 probe</b> 11768-L14716	Yq11.223 (2x)/ Yq11.23 (1x)		3
380	<b>DPY19L2 probe</b> 17171-L20390	<b>12q14.2</b>		1
389	<b>RBMV2DP probe</b> 15241-L12617	Yq11.23		1
396	<b>HSFY1 probe</b> 15247-L18630	Yq11.222 (2x)		2
402	<b>VCY1B probe</b> 11852-L18631	Yq11.221		1
409	<b>HSFY1 probe</b> 11772-L12555	Yq11.222		1
418	<b>BPY2 probe</b> 11773-L12556	Yq11.223		1
427	<b>RBMV1J probe</b> 11774-L12557	Yq11.223		1
436	<b>HSFY1 probe</b> 12740-L18632	Yq11.222 (2x)		2
445	<b>KDM5D probe</b> 11776-L12559	Yq11.222		1
454	<b>USP9Y probe</b> 11836-L12631	Yq11.21		1
463	<b>NLGN4Y probe</b> 11853-L12650	Yq11.221		1
472	Referans prob 14160-L20657	<b>2p25</b>		1
486	<b>BPY2 probe</b> 15248-L19234	Yq11.221/Yq11.223/ Yq11.23		3
490	<b>EIF1AY probe</b> 15249-L12560	Yq11.222		1
500	Referans prob 12462-L19605	<b>22q12</b>		1

Tablo 3.2 SALSA MLPA P360-A1 kitinin Y kromozom lokasyonuna göre düzenlenmiş probları  
(<https://www.mlpa.com>)

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA prob	HG19 prob başlangıcı	AZF lokusu	Parsiyel dizi (ligasyon bölgesine 24 nt yakın)	Sonraki proba olan mesafe
276	SRY prob 01023-L15420	2655484		GCACTGAAAGCT-GTAACTCTAAGT	11671.5 kb
319	RPS24P1 prob 11825-L20832	14326976	AZFa	TTACAGAAGGTA-TGTCCTTGCACT	28.2 kb
228	RPS24P1 prob 15239-L18627	14355188	AZFa	TCCCTAGTGCTA-CTGCCTCACTTA	127.7 kb
247	ARSEP probe 11818-L17483	14482862	AZFa	ACCTTCCCAGCA-AGCCGCCTTGAA	145.6 kb
366	USP9Y probe 15244-L12618	14628475	AZFa	ATCATGTGGCAT-TACCTCATTGTC	138.8 kb
	sY85 STS marker	14638000			
327	USP9Y probe 11826-L12621	14767317	AZFa	GAAAGGCAAGGA-CTTTACCTTAAA	160.8 kb
454	USP9Y probe 11836-L12631	14928146	AZFa	CTGTTCTGATA-GAAGGAATCATG	431.9 kb
	G34990 STS marker	15032000			
347	UTY probe 11828-L19232	15360054	AZFa	GTACTIONTCTCA-TGCATTATTGCA	54.7 kb
312	UTY probe 11824-L20831	15414769	AZFa	ATTGGTCCAGGA-GATTGTGAATGG	301.5 kb
215	UTY probe 11812-L13342	15716249	AZFa	AGGATCCTGGAT-ATTCCACTACCA	159.0 kb
342	VCY1B probe 15243-L15069	15875243	AZFa	TCCCTTTCTACA-CTTAGATCTCTG	161.4 kb
184	VCY1B probe 15238-L17485	16036660	AZFa	GCATATTGAGTA-GATCATTCTAG	153.7 kb
402	VCY1B probe 11852-L18631	16190399	AZFa	CACGTTGCTCA-GTTCTCACTGAT	159.0 kb
355	VCY1B probe 15240-L18629	16349354	AZFa	GGAGTAGACCAA-GAGAGGAATATA	209.5 kb
463	NLGN4Y probe 11853-L12650	16558890	AZFb	TTCTGCGTGGCA-TCACAGTCTTCC	3007.7 kb
160	CDY2B probe 15236-L17486	19566622	AZFb	TTCCAGCCAGGA-CACATCTGGAAA	5.1 kb
288	CDY2B probe 11759-L14252	19571702	AZFb	CTTCTGGCTGAA-CTGCGGCACCAA	492.7 kb
223	CDY2A probe 11749-L18625	20064415	AZFb	GGCTGTTAATGA-ATTCGTTAATGC	0.1 kb
234	CDY2A probe 15245-L18626	20064544	AZFb	ATTTTCTGTTAA-CCTTAGTGTA	543.5 kb
288	CDY2B probe 11759-L14252	20607999	AZFb	CTTCTGGCTGAA-CTGCGGCACCAA	97.1 kb
396	HSFY1 probe 15247-L18630	20705073	AZFb	ATTTGATGATGA-AGATTTAGCAGA	84.4 kb
436	HSFY1 probe 12740-L18632	20789494	AZFb	AAAGAACACATA-CCAATATAGCTG	21.1 kb
409	HSFY1 probe 11772-L12555	20810589	AZFb	CTGGACTATGGA-TGCAACTTCCGA	44.0 kb
436	HSFY1 probe 12740-L18632	20854606	AZFb	AAAGAACACATA-CCAATATAGCTG	84.4 kb
396	HSFY1 probe 15247-L18630	20939031	AZFb	ATTTGATGATGA-AGATTTAGCAGA	555.3 kb
241	KDM5D probe 11754-L12537	21494326	AZFb	CCAACAAAGTCT-TACAATTATACT	16.1 kb
202	KDM5D probe 11744-L13987	21510472	AZFb	CAATTTTGTCCA-TACTTTTGGTTA	571.7 kb
445	KDM5D probe 11776-L12559	22082204	AZFb	CTGATTGGAGCA-CTCAGCCTAAAC	77.9 kb
208	KDM5D probe 11747-L12530	22160145	AZFb	GACCAGGTTTCAAT-GCCAATATATTT	19.6 kb
252	KDM5D prob 11756-L13817	22179719	AZFb	GATCTGAAGTTA-CTGATGAATCTG	465.4 kb
	sY127 STS marker	22570000	AZFb		
490	EIF1AY probe 15249-L12560	22645153	AZFb	ACTTTCTAAATG-TTCTTGAATGTA	24.1 kb
136	EIF1AY probe 11734-L12517	22669283	AZFb	CCTGATTCTCCA-ATGGCTTCATAG	1756.1 kb
	sY133 STS marker	23978000			
	sY1258 STS marker	24239000			
	sY133 STS marker	23978000			
	sY1258 STS marker	24239000			
427 $\Delta$	RBMY1J probe 11774-L12557	24425431	AZFb	TGGCAAATCCAT-AATATTACAACA	6.4 kb
259 $\Delta$	RBMY1J probe 11757-L13818	24431853	AZFb	TACAACCAGAGA-TAATGTAAATAG	441.1 kb
	sY1197 STS marker	24872000			
	sY1197 STS marker	24872000			
418 $\Delta$	BPY2 probe 11773-L12556	24873002	AZFc	TTTACATGGTAA-ATTGATGTGCTT	0.5 kb
166 $\Delta$	BPY2 probe 11739-L13811	24873540	AZFc	TAGGAGAAAATA-ACAAAATAATGA	1.7 kb
178 $\Delta$	BPY2 probe 11740-L14251	24875225	AZFc	CACAGAAATATA-TACACTGTTTGA	42.6 kb
	sY1191 STS marker	24876000			

Tablo 3.2 SALSA MLPA P360-A1 kitinin Y kromozom lokasyonuna göre düzenlenmiş problemleri (devamı) (<https://www.mlpa.com>)

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA prob	HG19 prob başlangıcı	AZF lokusu	Parsiyel dizi (ligasyon bölgesine 24 nt yakın)	Sonraki proba olan mesafe
<b>486</b>	BPY2 prob 15248-L19234	24917874		TCTTTGTATTCA-TGCCAAGAAACG	49.2 kb
<b>373</b>	BPY2 prob 11768-L14716	24967068		TCATATGTCTGA-AGTCAGAACTTG	555.1 kb
	sY254 STS marker 1 kopya	25316000			
	sY254 STS marker 2 kopya	25373000			
	sY1291 & sY1189 STS markerları	25505000			
<b>283</b>	DAZ2 prob 12738-L12543			GTTTCAGCTGGCA-AGCTAGCTGTGC	48.3 kb
<b>147</b>	RBM2CP prob 11804-L12599			TTGCAATGCCAA-TGCAATCCCACA	49.7 kb
<b>301</b>	DAZ2 prob 11761-L12544			AGTATATTCCCA-TTCCTAATAATG	242.0 kb
<b>265</b>	DAZ2 prob 11758-L12541			CAGTGCTTCTGA-ATGATTTTCAGT	196.1 kb
<b>361</b>	CDY1B prob 15246-L12554			CCTTACTGCTTA-AGGCCGTATTTTC	193.1 kb
<b>234</b>	CDY2A prob 15245-L18626			ATTTTCTGTAA-CCTTAGTGTA	300.3 kb
	sY1206 STS marker 1 kopya				
<b>486</b>	BPY2 prob 15248-L19234	26551617		CCTTACTGCTTA-AGGCCGTATTTTC	49.2 kb
<b>373</b>	BPY2 prob 11768-L14716	26600816		TCATATGTCTGA-AGTCAGAACTTG	760.7 kb
	sY254 STS marker 3 kopya	26952000			
	sY254 STS marker copy 4	26987000			
<b>373</b>	BPY2 prob 11768-L14716	27361515		TCATATGTCTGA-AGTCAGAACTTG	49.2 kb
<b>486</b>	BPY2 prob 15248-L19234	27410721		TCTTTGTATTCA-TGCCAAGAAACG	300.3 kb
<b>234</b>	CDY2A prob 15245-L18626	27711031		ATTTTCTGTAA-CCTTAGTGTA	193.1 kb
<b>361</b>	CDY1B prob 15246-L12554	27904086		CCTTACTGCTTA-AGGCCGTATTTTC	196.0 kb
<b>265</b>	DAZ2 prob 11758-L12541	28100127		CAGTGCTTCTGA-ATGATTTTCAGT	242.6 kb
<b>301</b>	DAZ2 prob 11761-L12544	28342689		AGTATATTCCCA-TTCCTAATAATG	49.7 kb
<b>147</b>	RBM2CP prob 11804-L12599	28392357		TTGCAATGCCAA-TGCAATCCCACA	48.3 kb
<b>283</b>	DAZ2 probe 12738-L12543	28440706		GTTTCAGCTGGCA-AGCTAGCTGTGC	41.1 kb
	sY1201 STS marker	28458000			
<b>142</b>	PPP1R12BP1 prob 12733-L14796	28481778		AGCATTTGGAGA-TGCTCCAGAAGA	88.4 kb
<b>389</b>	RBM2DP prob 15241-L12617	28570146		CACTGAATGGAA-AAGTACAGCTGG	

### 3.3 – Yöntemler

#### 3.3.1 Qiagen® ekstraksiyon kiti ile periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesi

Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde Qiagen® Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır:

- Su banyosunun sıcaklığı 56 °C'ye getirilmiştir.
- Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 1,5 ml ependorf tüp strafora konulup üzerine protokol numarası yazılmıştır.
- 20 µl proteinaz K ependorf tüpünün dibine konmuştur.
- 100 µl hasta kan örneği ependorf tüpüne eklenmiştir.
- PBS tamponu çalkalanıp karıştırıldıktan sonra ependorf tüpüne 120 µl eklenmiştir.
- Bu karışım 15 sn. vortekslenmiştir.
- 56 °C'de 10 dk. inkübe edilmiştir.
- Çok kısa süreli santrifüj edilmiştir.
- %96-100'lük etanolden 200 µl örneğe eklenip 15 sn. vortekslenmiştir.
- Filtreli tüpün kapağına protokol numarası yazılmıştır.
- Ependorf tüpündeki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarılmıştır.
- 8000 devir/dk'da 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konulup, filtratlı tüp atılmıştır (Filtreli tüp tamamen boşalamadığı zaman tam devirde tekrar santrifüjlenmiştir) .
- 500 µl Buffer AW1 dikkatlice filtreli tüpe konulmuştur. 8000 devir/dk'da 1 dk süreyle santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp ikinci yeni toplama tüpüne konulup filtratlı tüp atılmıştır.

- Filtreli tüpe 500 µl Buffer AW2 konulmuştur.
- 14.000 devir/dk'da 3 dk santrifüj edilip filtratlı tüp atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni ependorf tüplerine aktarılıp tam devirde 1 dk santrifüjlenmiş, ependorf tüpü atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni ependorf tüpüne aktarılıp üzerine 200 µl Buffer AE eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 8000 devir/dk'da 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp atılıp DNA içeren sıvı ependorf tüpü içinde -20 °C'ye kaldırılmıştır.

### **3.3.2 İzole edilen DNA örneklerinin MLPA yöntemiyle analizi**

DNA örnekleri Salsa MLPA P360-A1 kitinin problemleri ile bir gece boyunca hibridize edildi. Hibridizasyonun ardından, bir ligasyon reaksiyonu ve PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri ABI 3130 cihazına yüklenerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlanılmıştır.

#### *3.3.2.1 DNA denatürasyonu ve SALSA MLPA P360-A1 probe karışımları ile hibridizasyonu*

- 1) DNA örnekleri 50-200 ng olacak şekilde, 5 µl hacminde Tris EDTA (TE) ile dilüe edilmiştir.
- 2) Dilüe edilen örnekler 98°C de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA'nın denatürasyonu sağlanmıştır. Sonrasında örnekler 25 °C'ye soğutulmuştur.
- 3) 25 °C'deki DNA örneğinin üzerine 1,5 µl SALSA Probe Miks (P360-A1) ve 1,5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edilmiştir.
- 4) Daha sonra örnekler 95 °C'de 1 dk. inkübe edilip 60 °C de 17,5 saat hibridizasyona bırakılmıştır.

#### *3.3.2.2 Ligasyon ve dijasyon reaksiyonu*

- 1) Hibridizasyon süresinin sonunda termal cycler cihazının sıcaklığı 54 °C'ye düşürülmüştür.

- 2) PCR tüpleri 54 °C'de hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 karışımı (25 µl steril su, 3 µl Ligaz-65 Buffer A, 3 µl Ligaz-65 Buffer B, 1 µl Ligaz-65) ilave edilmiştir.
- 3) 54 °C'de 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır.
- 4) Daha sonra ligaz inaktivasyonu için 98 °C'de 5 dk. bekletilmiştir.
- 5) Sıcaklık 4 °C'ye düşürülerek sabitlenmiştir.

### 3.3.2.3 PCR amplifikasyonu

Ligasyon reaksiyonu ürünleri bulunan strip tüplerine, hazırlanmış olan polimeraz karışımından (7,5 µl steril su, 2 µl SALSA PCR primer, 0,5 µl SALSA polimeraz) oda sıcaklığında 10 µl eklenerek pipetaj yapıldı ve PCR başlatılmıştır.

PCR şartları:

Denatürasyon 95 °C 30 sn.	}	35 döngü
Annealing 60 °C 30 sn.		
Ekstansiyon 72 °C 60 sn.		

Son Ekstansiyon 72 °C 20 dk.

Daha sonra 15 °C'de beklemeye alınmıştır.

### 3.3.2.4 ABI 3130 cihazına yükleme

- PCR bitiminde elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 0,7 µl alınarak ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine aktarılmıştır.

- Daha sonra üzerlerine: 0,2 µl internal size standart (Rox 500) ve 9 µl formamid eklenerek pipetajla homojenize edilmiştir.

- Örnekler 86°C'de 3 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlanmıştır.

- Devamında örnekler +4 °C'de 2 dk. bekletilmiştir.

- ABI 3130 cihazında; 36 cm kapillerlere 1,6 kV de 15 saniye enjeksiyon zamanı, 60 °C ve 10 kV de 30 dakika yürütme zamanı şartları sağlanmıştır.



- Daha sonra ABI 3130 cihazına yüklenerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlanmıştır.

- Her örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edilmiştir.

### *3.3.2.5 Değerlendirme*

Multipleks PCR yöntemi ile Gene Mapper programında analiz edilen, Y mikrodelsiyon analizi için gönderilen hasta örnekleriyle çalışma yapılmıştır. Gelen örnekler MLPA tekniği ile çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi, Coffalyser MLPA analiz programıyla gerçekleştirilmiştir. Her yüklemde karşılaştırma yapılması amacıyla analiz yöntemi gereğince fertil olan 3 örnek referans olarak kullanılmıştır. Değerlendirme yapılırken, çalışılan problemlerden elde edilen sinyaller ile referans örneklerinden elde edilen sinyallerin oranına bakılmıştır. Eğer bu oran 1,3-1,5 aralığındaysa hedef bölgede duplikasyon, 0-0,5 aralığındaysa ise delesyon söz konusudur. Eğer bu oran 1 ise hedef bölgede herhangi bir gen delesyonu veya duplikasyonu söz konusu değildir. MLPA ürünlerindeki problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları bu programla değerlendirilmiştir. Sağlıklı kontrollerle pik alanları ve boyları karşılaştırıldı. Ratio değeri <0,5 olan değerlerde delesyon olduğuna >1,3 olan değerlerde ise duplikasyon olduğu şeklinde değerlendirme yapılmıştır.

## 4 - BULGULAR

Çalışma grubumuzu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvurup, klinik olarak azospermi tanısı almış ve Tıbbi Genetik polikliniğimize yönlendirilen hastalar arasından seçilen olgular oluşturmaktadır. Çalışmaya dahil edilecek hastalar, detaylı öykü alımı, fizik muayene, sperm ölçümleri ve sitogenetik incelemeleri yapıldıktan sonra herhangi bir ek sağlık problemi olmayan, normal karyotipe sahip olup sadece infertilite şikayeti olan hastalar arasından seçilmiştir. Bölümümüzün moleküler departmanında yapılan analiz sonucunda Y mikrolelesyonu saptanmayan elli infertil birey üzerinde MLPA analizleri yapılmıştır.

### 4.1 - Araştırma Grubu Olgularının MLPA Bulguları

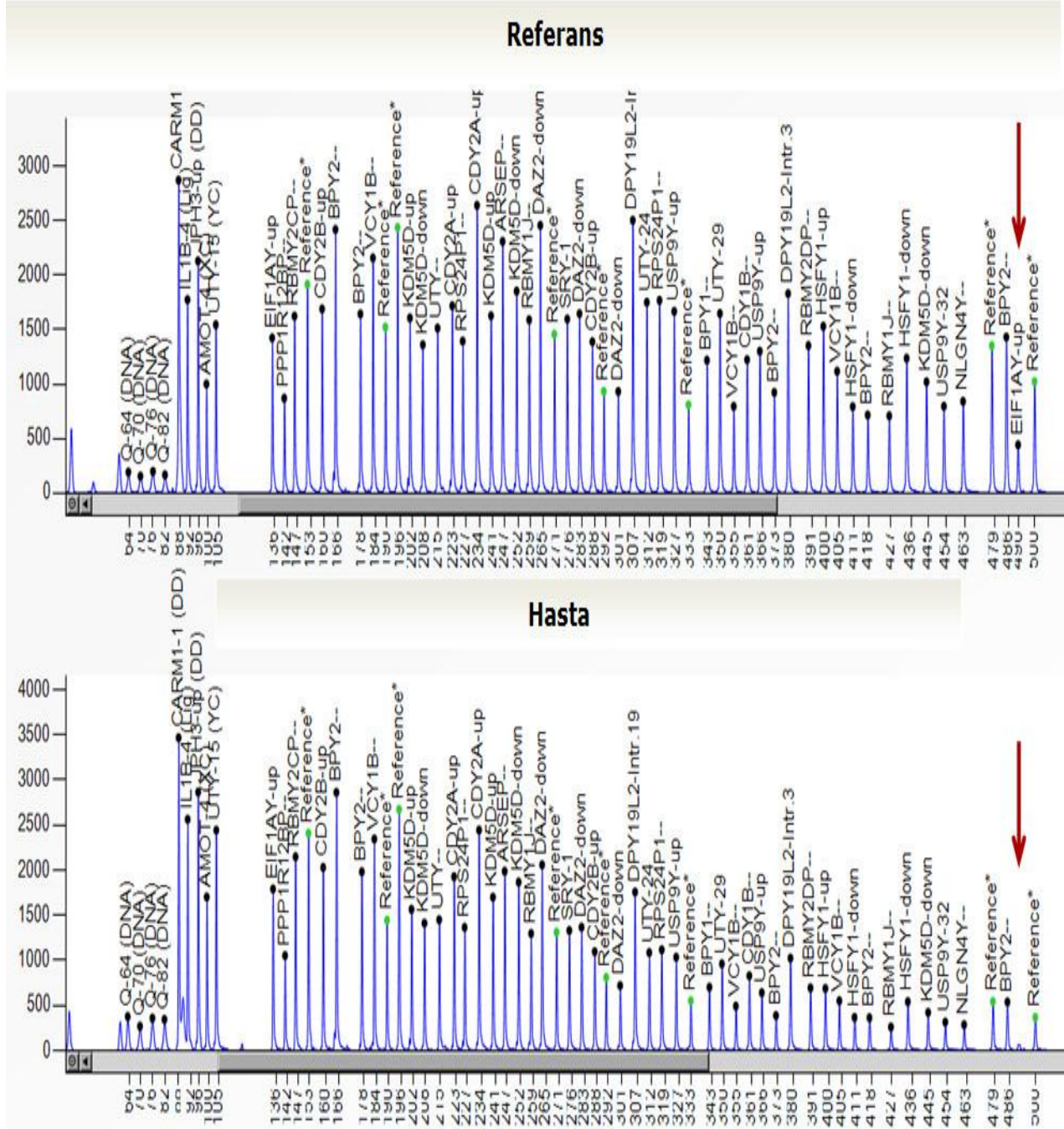
DNA örnekleri Salsa MLPA P360-A1 kitinin problemleri ile bir gece boyunca hibridize edildi. Hibridizasyonun ardından, bir ligasyon reaksiyonu ve PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri ABI 3130 cihazına yüklenerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlandı. Coffalyser programı kullanılarak alınan sonuçlar, fertil olan on beş bireyden oluşan kontrol grubumuzun örnekleri aynı zamanda referans olarak kullanıldı ve değerlendirilerek karşılaştırılmıştır. Aşağıdaki tabloda elli infertil bireyin üzerinde yapılan MLPA ve mPCR yöntemiyle Y mikrolelesyon çalışmasına ait sonuçlar verilmiştir (Tablo 4.1). Kontrol grubu olarak kullanılan bireylerin hiçbirinde AZF mikrolelesyonu saptanmamıştır.

Tablo 4.1 İnfertil erkek örneklerine ait daha önce yapılan multipleks PCR analiz sonuçlarının ve çalışmamızda kullanılan MLPA yönteminin sonuçlarının confirmasyonu

Sonuçlar	Çalışılan yöntem	
	Multipleks PCR (n=50)	MLPA (n=50)
Normal	50	42
Delesyon	-	8

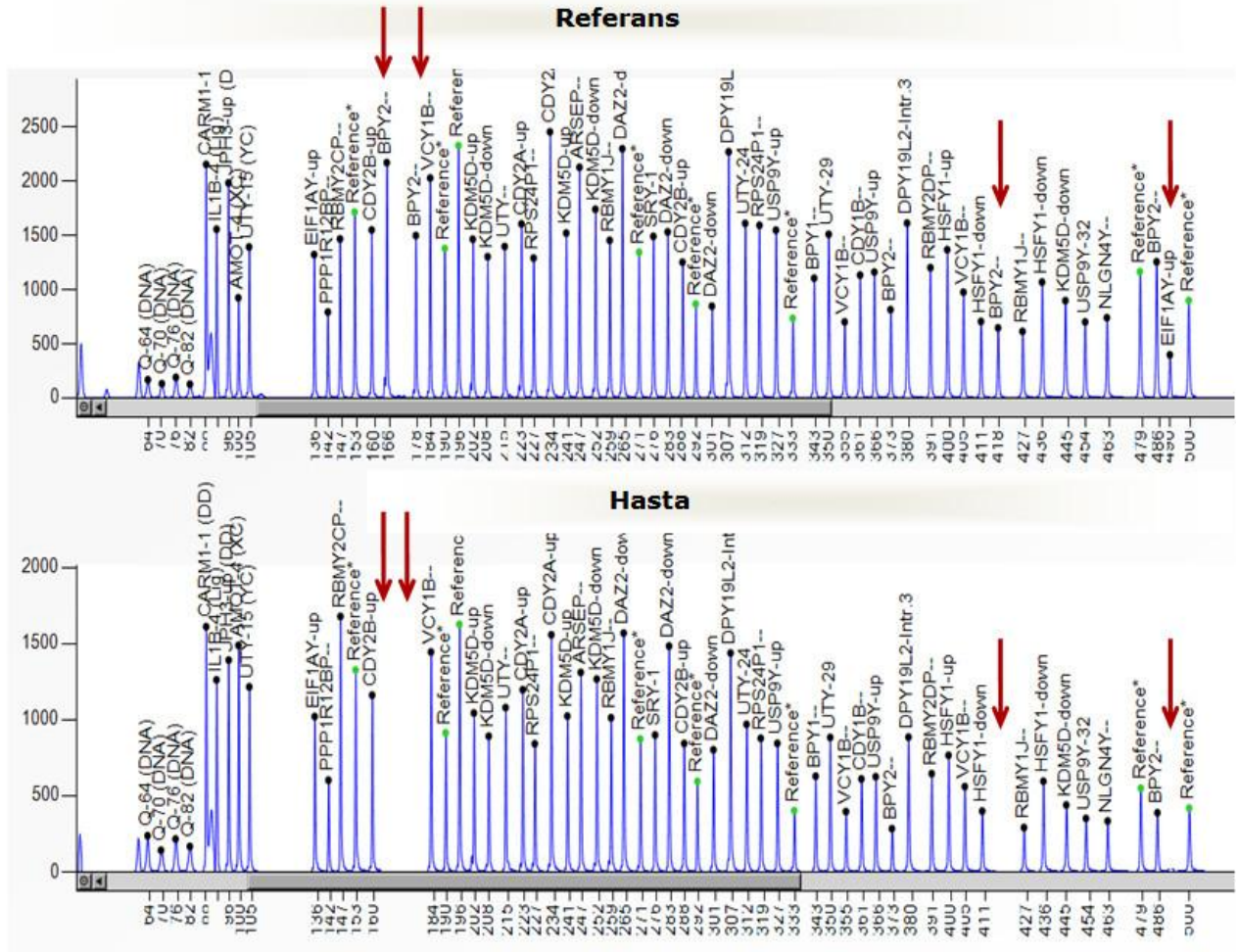
Daha önce multipleks PCR analiz yöntemiyle delesyon saptanılmayan 50 infertil erkek örneğinin 8' inde (%16 oranında) MLPA tekniği ile AZFc ve AZFb bölgelerine ait parsiyel delesyonlar saptanmıştır. AZFb bölgesinde yerleşen EIF1AY geninde delesyon 2 hastada (Şekil 4.1), AZBb+c bölgesindeki EIF1AY ve BPY2 genine ait parsiyel delesyonlar ise sadece 1 hastada görülmüştür (Şekil 4.2). Bunun yanısıra yine 5 hastada AZFc

bölgesinde yerleşen BPY2 geninde parsiyel delesyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Çalışma sonuçlarının detayları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.



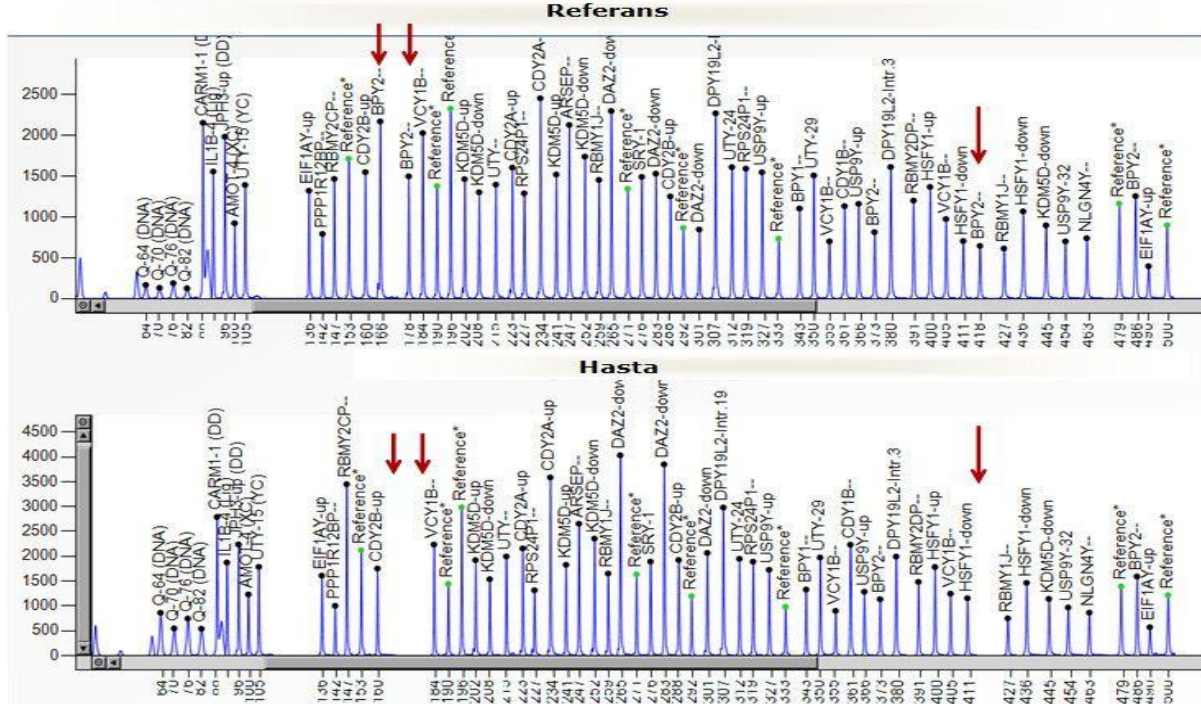
Şekil 4.1 1 ve 5 no'lu hastalarda AZFb bölgesinde yerleşen EIF1AY geninin 490 nükleotit uzunluğu olan hedef dizisinde saptanan parsiyel delesyon görüntüsüyle referans olarak kullanılan örneğin analiz görüntülerinin karşılaştırılması. İlk dört pik Q fragmenti, sonraki üç pik D fragmentleri ve sonraki iki pik cinsiyet fragmentleri (100 nt X fragmenti, 105 nt Y fragmenti)

AZFb bölgesinde saptanan subdelesyon hastaların %4'de görülmüştür.



Şekil 4.2 4 no'lu hastada AZFb bölgesinde yerleşen EIF1AY geninin ve BPY2 geninin hedef dizilerinde saptanan delesyonlar görüntüsüyle referans olarak kullanılan örneğin analiz görüntülerinin karşılaştırılması. İlk dört pik Q fragmenti, sonraki üç pik D fragmentleri ve sonraki iki pik cinsiyet fragmentleri (100 nt X fragmenti, 105 nt Y fragmenti)

AZBb+c bölgelerini içeren parsiyel delesyonlar %2 oranında görülmüştür.



Probe target info		Height	Area	Intra...	Pre r...	Final...	Stdev	RefP...	Sam...	d(nt)	Width
SRY-1	Y-002.715484	1893	10642	1.07	0.98	1.04	0.08	Equal	Equal	-0.22	36
DBPS24P1--	Y-012.836971	1891	11344	0.96	0.9	0.92	0.06	Equal	Equal	-0.24	43
DBPS24P1--	Y-012.865189	1316	7609	0.85	0.77	0.84	0.07	Equal	Equal	-0.38	39
ARSEP--	Y-012.992866	2656	14435	1.04	0.95	1.03	0.08	Equal	Equal	-0.34	42
USP9Y-up	Y-013.138483	1286	7986	0.88	0.87	0.86	0.06	Equal	Equal	0.02	38
USP9Y-up	Y-013.276711	1728	9992	0.93	0.89	0.91	0.07	Equal	Equal	-0.15	46
USP9Y-32	Y-013.437540	968	7780	1.02	1.11	1.02	0.07	Equal	Equal	-0.03	62
UTY-29	Y-013.869448	1976	11986	1.07	1.03	1.03	0.07	Equal	Equal	-0.2	35
UTY-24	Y-013.924163	1949	11055	1	0.97	1	0.09	Equal	Equal	-0.4	38
UTY--	Y-014.225643	1997	10193	1.19	1.07	1.18	0.09	Equal	Equal	-0.29	25
BPY1--	Y-014.384639	1330	7953	0.98	0.96	0.96	0.07	Equal	Equal	-0.38	32
VCY1B--	Y-014.546054	2236	11540	0.92	0.81	0.92	0.07	Equal	Equal	-0.26	35
VCY1B--	Y-014.699793	1247	8048	1	1.04	1	0.08	Equal	Equal	-0.13	44
VCY1B--	Y-014.858748	902	5902	1.03	1.02	1.01	0.08	Equal	Equal	-0.18	43
NLGN4Y--	Y-015.068284	865	6468	0.86	0.99	0.9	0.07	Equal	Equal	-0.03	38
CDY2B-up	Y-018.076016	1754	9191	0.93	0.82	0.95	0.07	Equal	Equal	-0.35	33
CDY2B-up	Y-019.067387	1924	11593	1.27	1.19	1.24	0.1	Equal	Equal	-0.22	46
CDY2A-up	Y-018.573809	2157	11634	1.12	0.99	1.09	0.07	Equal	Equal	-0.29	31
CDY2A-up	Y-018.573938	3588	20104	1.23	1.12	1.23	0.11	Equal	Equal	-0.36	54
HSFY1-up	Y-019.164461	1784	11875	1.02	1.06	1.02	0.08	Equal	Equal	-0.01	55
HSFY1-down	Y-019.248882	1464	10641	1.01	1.11	1.03	0.07	Equal	Equal	0.23	53
HSFY1-down	Y-019.269977	1155	7836	1.26	1.29	1.23	0.09	Increases	Equal	0.08	54
KDM5D-up	Y-019.953712	1828	10217	1.02	0.92	1	0.08	Equal	Equal	-0.41	42
KDM5D-down	Y-019.969860	1922	10981	1.09	0.97	1.08	0.09	Equal	Equal	-0.35	46
KDM5D-down	Y-020.541592	1142	8585	0.95	1.04	0.96	0.06	Equal	Equal	0.04	50
KDM5D-down	Y-020.619533	1538	8371	1	0.89	0.99	0.08	Equal	Equal	-0.29	38
KDM5D-down	Y-020.639107	2356	13434	1.13	1.03	1.1	0.08	Equal	Equal	-0.34	39
EIF1AY-up	Y-021.054536	570	4404	1.02	1.19	1.06	0.08	Equal	Equal	-0.02	28
EIF1AY-up	Y-021.078671	1610	8630	1.01	0.87	1.01	0.07	Equal	Equal	-0.3	36
RBM1J--	Y-022.834819	750	5422	0.93	1.01	0.94	0.08	Equal	Equal	0.05	54
RBM1J--	Y-022.841239	1653	9275	0.94	0.87	0.93	0.07	Equal	Equal	-0.27	37
BPY2--	Y-023.282390	0	0	0	0	0	0	<<<	<<<	0	0
BPY2--	Y-023.282929	0	0	0	0	0	0	<<<	<<<	0	0
BPY2--	Y-023.284612	0	0	0	0	0	0	<<<	<<<	0	0
BPY2--	Y-023.327257	1592	11625	0.9	1.03	0.93	0.07	Equal	Equal	0.07	32

Şekil 4.3 2, 3, 6, 7 no'lu hastalarda AZFc bölgesinde yerleşen BPY2 geninin hedef dizilerinde saptanan delesyonların MLPA profilleri

AZFc bölgesinde parsiyel delesyon %10 oranında görülmüştür.

Tablo 4.2 MLPA yöntemiyle yapılan Y mikrodelsiyon taramasının analiz sonuçları özeti

Hasta №	Delesyon tipi	Aday genler	SALSA MLPA prob uzunlukları (nt) ve delesyonlar
1	AZFb	EIF1AY	EIF1AY prob 15249-L12560 / 490 nt
2	AZFc	BPY2	BPY2 prob 11739-L13811 / 166 nt
			BPY2 prob 11740-L14251 / 178 nt
			BPY2 prob 11773-L12556 / 418 nt
3	AZFc	BPY2	BPY2 prob 11739-L13811 / 166 nt
			BPY2 prob 11740-L14251 / 178 nt
			BPY2 prob 11773-L12556 / 418 nt
4	AZFb+c	EIF1AY	EIF1AY prob 15249-L12560 / 490 nt
		BPY2	BPY2 prob 11739-L13811 / 166 nt
			BPY2 prob 11740-L14251 / 178 nt
			BPY2 probe 11773-L12556 / 418 nt
5	AZFb	EIF1AY	EIF1AY probe 15249-L12560 / 490 nt
6	AZFc	BPY2	BPY2 probe 11739-L13811 / 166 nt
			BPY2 probe 11740-L14251 / 178 nt
			BPY2 probe 11773-L12556 / 418 nt
7	AZFc	BPY2	BPY2 probe 11739-L13811 / 166 nt
			BPY2 probe 11740-L14251 / 178 nt
			BPY2 probe 11773-L12556 / 418 nt
8	AZFc	BPY2	BPY2 probe 11739-L13811 / 166 nt
			BPY2 probe 11740-L14251 / 178 nt
			BPY2 probe 11773-L12556 / 418 nt

## 5- TARTIŞMA

İnfertilite korunmasız cinsel ilişkidenden bir yıl sonra gebe kalma yetersizliği olarak tanımlanmaktadır. Dünya genelinde evli çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkilemekte ve %50 oranında erkek faktöründen kaynaklandığı düşünülmektedir (Bushnik, Cook, Yuzpe, Tough, & Collins, 2012; Y.-S. Zhang et al., 2013). İnfertil erkeklerin % 5-15'inde görülen azosperminin en yaygın nedeni Y kromozomu mikrolelesyonları olarak bilinmektedir. Y kromozomunun uzun kolu üzerinde bulunan AZF bölgesi, sperm gelişimi ve farklılaşmasından sorumludur (Poongothai ve ark., 2009). AZF bölgesi çoklu gen aileleri olan AZFa, AZFb, AZFc bölgelerini içermektedir (Ferlin ve ark., 2007). İnfertilite tanısı konulan hastalarda rutin olarak ilk önce semen analizleri yapılmaktadır. Semen analizi sonucuna göre sırasıyla hormon analizleri, sitogenetik ve Y mikrolelesyon testleri yapılmaktadır (Oates, 2012). Spermatogenez ve erkek gonadların gelişimi için ciddi önem taşıyan genler içerdiğinden, Y kromozom mikrolelesyonlarının erkek infertilitesi ile ilişkisi üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Tahmasbpour et al., 2014).

AZF delesyonlarının tanımlanması için en iyi yöntem multipleks PCR olarak gösterilmiştir. Avrupa Androloji Akademisi ve Avrupa Moleküler Genetik Kalite birliği 2004 yılında AZF delesyonu araştırması için STS panelini kılavuz olarak yayınlanmıştır (Simoni et al., 2004). Yayınlanan bu panelde ZFX/ZFY genleri, PCR amplifikasyonunun internal kontrolü olarak kullanılmaktadır. Bu primerlerle, hem Y (ZFY) hem de X kromozomuna (ZFX) özgü fragmanlar çoğaltılmaktadır. Bunun yanı sıra, SRY geni, Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki TDF için bir kontrol olarak kullanılmaktadır. ZFY geni yokluğunda Y'ye özgü sekansların varlığının belirlenmesi için de (ör; XX erkeklerde) kontrol olarak dahil edilmektedir. AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerinin mikrolelesyon tespitinde multipleks PCR reaksiyonlarında kullanılması gereken PCR primer setinin sY14 (SRY), ZFX/ZFY, sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 bölgelerini içermesi en iyi seçenek olarak belirlenmiştir. Bu primer setinin kullanılmasındaki amaç, hem klinik olarak ilişkili olabilecek hemen hemen tüm delesyonları tespit edebilmesi hem de literatürde bildirilen delesyonların %95'inden fazlasının saptanmasına olanak tanınmasıdır (Krausz et al., 2014; Simoni et al., 2004; Skaletsky et al., 2003). Laboratuvarımızda rutin olarak kullandığımız multipleks PCR analiz yöntemiyle yukarıda belirtilen gen bölgelerinin yanı sıra AZF bölgesine ait diğer alanlarında (sY81, sY625, sY90, sY131, sY127) analizi yapılabilmektedir (Şekil 2.6).

Genel olarak Y kromozom mikrolelesyonlarının sıklığı %0,5-%44 arasında değişmektedir. Y kromozom mikrolelesyon insidansının bu kadar farklı olmasının nedeni olarak; etnik farklılıklar, hasta seçim kriterlerinin farklılığı ve kullanılan STS'lerin farklılığı olduğu düşünülmektedir (Österlund,

Segersteen, Arver, & Pousette, 2000). Literatürde farklı ülkelerde yapılmış çalışmalarda bildirilen infertil erkeklerde Y kromozom mikrolelesyonlarının sıklığı Tablo 5.1’de verilmiştir (Hammami et al., 2014).

Tablo 5.1. Farklı ülkelerde tespit edilen infertil erkeklerde Y kromozom mikrolelesyonlarının sıklığı (Hammami et al., 2014)

Referans	Bölgeler	Hastalar		Çalışma grubu		Karyotip
		Toplam	AZF delesyonu %	AZF delesyonunun her grupta görülme oranı	Her grupta AZF delesyon tipi	
Sargin et al. 2004	<b>Türkiye (Antalya)</b>	60	2 (%3,33)	Azo: %4,25 (2/47) Oligo: %0 (0/13)	Azo: 1 AZFb, 1(AZFb, AZFc) -	Normal karyotip
Imken et al. 2007	<b>Fas</b>	127	4 (%3,15)	Azo: %8,33 (4/48) OAT: %0 (0/ 79)	Azo: 2 AZFc, 2 AZFb+c -	-
Song et al. 2007	<b>Çin (Nanjing)</b>	62	12 (%19,35)	Azo: %27,27 (9/ 33) Ş.Oligo: %10,34 (3/29)	Azo: 8 AZFc, 1 AZFb Ş.Oligo: 1 AZFc, 1 AZFb+c, 1 AZFb	Normal karyotip
Ristanovic et al. 2007	<b>Sırbistan</b>	90	14(%15,55)	Azo: %15,52 (9/58)  Ş.Oligo:%15,62(5/32)	Azo: 1 AZFa, 5 AZFc, 2 (AZFa+partial AZFb), 1 (partialAZFb+AZFc) Ş.Oligo: 5 AZFc	Normal karyotip
Elhawary et al. 2010	<b>Mısır</b>	49	18 (%36,73)	Azo: %39,29 (11/28)  Ş.Oligo: %33,33 (7/21)	Azo: 2 partial AZFa, 1 AZFb, 4 partial AZFb, 2 (AZF partial a+partial b), 1 (AZF partial a+partial c), 1 (AZF partial b+partial c)  Ş.Oligo: 6 partial AZFb, 1 (AZF partial b+partial c)	Normal karyotip
Alkhalaf et al. 2010	<b>Kuveyt</b>	116	9 (%7,75)	Azo: - Ş.Oligo: -	Azo: 1AZFa, 3 AZFc, 3 AZFa-c Ş.Oligo: 2 AZFc	Normal karyotip
Behulova et al. 2011	<b>Slovenya</b>	226	8 (%3,54)	Azo: %3,54 (8/226)	Azo: 4 AZFc, 1 AZFb+c, 1 AZFa+b+c, 2 partial AZFa	Normal karyotip
Sun et al. 2012	<b>Çin (Şangay)</b>	507	45 (%8,87)	Azo: %9,32 (33/354)  Ş.Oligo : %7,84(12/153)	Azo: 23 AZFc, 3 AZFb, 3 AZFb+c, 2AZFa, 2 AZFa+b+c Ş.Oligo: 12 AZFc	Normal karyotip
Wettasinghe et al. 2012	<b>Sri Lanka</b>	207	3 (%1,45)	Azo: %1,96 (3/153) Ş.Oligo: %0 (0/54)	Azo: 1 AZFc, 2 partial AZFc. -	Normal karyotip
Saliminejed et al. 2012	<b>İran</b>	115	2 (%1,74)	Azo: %2,13 (2/ 94) Ş.Oligo: %0 (0/21)	Azo: 1 AZFc, 1 AZFb+c -	Normal karyotip
Cavkaytar et al. 2012	<b>Türkiye (Ankara)</b>	332	24 (%7,23)	Azo: %10,71 (21/196) Ş.Oligo: %2,20 (3/136)	Azo: 7 AZFc, 6 AZFb, 5 AZFa, 2 AZFb,c, 1 AZFa,b, Ş.Oligo: 3 AZFc	Normal ve anormal karyotip
Chellat et al. 2013	<b>El-Cezire</b>	80	1 (%1,25)	Azo: %2.04 (1/49) OAT: %0 (0/31)	Azo: 1 AZFc -	-



Tablo 5.1 Farklı ülkelerde tespit edilen infertil erkeklerde Y kromozom mikrodelesyonlarının sıklığı (devamı) (Hammami et al., 2014)

Yazarlar	Bölgeler	Hastalar		Çalışma grubu		Karyotip
		Toplam	AZF delesyonu %	AZF delesyonunun her grupta görülme oranı	Her grupta AZF delesyon tipi	
Hammami et al. 2014	<b>Tunus</b>	105	2 (%1,90)	Azo: %2,70 (2/74) S.Oligo: %0 (0/31)	Azo: 2 AZFc -	Normal karyotip
Çalışmamız	<b>Türkiye (Eskişehir)</b>	50	8 (%16)	Azo: %16 (8/50)	Azo: 5 partial AZFc, 2 partial AZFb, 1 (AZF partial b+partial c)	Normal karyotip

Çalışmamızda, literatürde yayınlanan çalışmalarda da saptanan parsiyel delesyonların varlığını görebilmekteyiz. Özellikle, parsiyel delesyonların azospermi tanısında daha sık saptanması ve oranların çalışmamızda bulduğumuz parsiyel delesyon oranlarına (8 hastada/%16 oranında) göre farklılık göstermesi dikkat çekmektedir. Çeşitli popülasyonlarda yapılan çalışmalar sonucunda farklı oranlar elde edilmiştir. Çalışma sonuçlarından yola çıkarak, Y kromozom komplet ve parsiyel delesyonlarının görülme oranındaki farklılıkların coğrafi ve etnik faktörlere bağlı değişkenlik gösterebileceğini düşünmekteyiz.

AZF mikrodelesyonlarının yanı sıra parsiyel delesyonların da infertiliye neden olabileceği çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir. Örneğin, Fernandes ve ark.'nın yaptıkları çalışmada AZF parsiyel delesyonlarının sperm sayısının azalmasından sorumlu olduğu ve dolayısıyla infertiliye neden olabileceği sonucuna varmışlardır (Fernandes et al., 2002). Hucklenbroich ve ark.'ı yaptığı çalışmada sadece infertil erkeklerde bulunan yeni delesyon paternlerinin, henüz keşfedilmemiş parsiyel delesyonların spermatogenik yetmezliğe sebep olabileceğini bildirmişlerdir (Hucklenbroich et al., 2005). Çeşitli parsiyel AZFc delesyon tiplerinin farklı spermatogenik etki göstermesi, AZFc gen kopyaları arasındaki fonksiyonel farktan dolayı kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, parsiyel AZFc delesyon paternlerinin spermatogeneze farklı etki edebileceği sonucuna varmışlardır (F. Zhang et al., 2006).

Son zamanlarda moleküler teknikler gelişmesiyle birlikte AZF bölgesinin parsiyel mikrodelesyonlarını tespit edilebilmiştir. Bunyan ve ark.'nın yaptıkları çalışmada belirttiklerine göre, Androloji Akademisi ve Avrupa Moleküler Genetik Kalite birliğinin (EAA/EMQN) yayınladığı kılavuzları tarafından önerilen standart Y-mikrodelesyon testi (Simoni et al., 2004), Bunyan ve ark.'ına göre AZFc'nin en çok saptanan parsiyel delesyonlarını tespit edememektedir. Parsiyel AZF delesyonlarının genotip/fenotip korelasyonları ile ilgili daha ileri çalışmalar yapılması planlandığında, efektif ve daha kolay analiz yöntemi olması gerekmektedir. Bu yöntem çalışmaya sarf edilen

zamanı ve harcanan maliyeti en aza indirmek için farklı boyutlardaki mikrolelesyonları tek bir reaksiyonda doğru tespit edebilmelidir (Bunyan, Callaway, & Laddach, 2012).

Jiang ve ark.'nın azospermi ve oligozoospermi tanılı 147 bireyden oluşan hasta grubu üzerinde yaptıkları çalışmada sonucunda STS delesyonu 22 hastada %15 oranında saptanırken, kontrol grubunda her hangi bir delesyon saptanmamıştır. Aynı hasta grubunu MLPA yöntemiyle çalıştıklarında ise, AZF bölgesinde 40 hastada %27,2 oranında Y mikrolelesyonu, 20 fertil birey içeren kontrol grubunda ise delesyon saptanmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre MLPA yöntemi multipleks PCR yöntemine göre Y mikrolelesyonu saptama oranı daha yüksektir. Bunun yanısıra, bozulmuş spermatogenezin etiyolojik mekanizmasının belirlenebilmesinde katkı sağlayabileceği sonucuna varmışlardır. Ancak, AZFc bölgesindeki polimorfizm, bazı MLPA problemlerinde spesivite eksikliğine neden olabileceğini bildirmişlerdir (Jiang et al., 2012).

Çalışmamızda daha önce multipleks PCR yöntemiyle analiz edilen ve herhangi bir Y mikrolelesyonu saptanmayan 50 hasta MLPA yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonucunda 8 hastada %16 oranında AZF bölgesine ait parsiyel delesyonlar saptanmıştır. Yine MLPA yöntemiyle analiz ettiğimiz 15 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubumuzda ise her hangi bir delesyon saptanmamıştır. Dolayısıyla, multipleks PCR ile karşılaştırıldığında, MLPA yönteminin AZF mikrolelesyonlarını tespit etmede daha duyarlı olduğunu düşünmekteyiz. Jiang ve ark.'nın yaptığı çalışmadan farklı olarak hasta grubumuzda daha düşük oranda delesyon gözlenmiştir. Buradaki temel sebebin hasta grubumuzu sadece azospermi tanılı hastaların oluşturması olabilir. Bununla birlikte daha geniş hasta popülasyonu kullanılarak yapılacak çalışmalarla verilerimizin desteklenmesi daha net sonuçlar ortaya koyabilecektir.

Bunyan ve ark.'rı MLPA analiz yönteminin parsiyel AZF delesyonlarının tespiti için iyi bir yöntem olup olmadığını belirlemek için yaptıkları çalışmaya, daha önce Simoni ve ark.'ı tarafından multipleks PCR yöntemiyle Y kromozom mikrolelesyonu analizi yapılan ve delesyon saptanmayan infertilite tanılı hasta grubunu dahil etmişlerdir (Simoni et al., 2004). P360 Y mikrolelesyon MLPA prob miks kiti ile yapılan çalışma sonucunda infertil erkeklerde %8 oranında AZFc bölgesinin parsiyel mikrolelesyonu, %2 oranında ise AZFc bölgesinde mikroduplikasyon saptanmıştır. Kontrol grubunda ise herhangi bir mikrolelesyon/mikroduplikasyon görülmemiştir. Ancak 2 bireyde (%4 oranında) AZFc mikroduplikasyon saptanmıştır. Bunyan ve ark.'rı Y mikrolelesyon çalışmalarının sonuçlarını göz önünde bulundurarak ve yaptıkları araştırma sonucuna dayanarak AZFc bölgesinde saptanan parsiyel delesyonların toplam hareketli sperm sayısını

etkileyebileceğini belirtmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, yayınlanmış diğer sonuçlarla karşılaştırıldığında, 4/50 infertil erkekte parsiyel AZFc delesyonunun saptanması (%8 oranında), bu görüşü önemli derecede desteklemektedir (Bunyan et al., 2012). Saptanan parsiyel AZFc delesyon oranının, sayıca daha fazla hasta grubu olan çalışmalarda görülen mikrodelesyon sonucuyla (%5 oranında) uyumlu bulunmuştur (Giachini et al., 2008; Noordam et al., 2011). WRGL (Wellington Regional Genetics Laboratory) laboratuvarında elde edilen veriler, MRC-Holland test laboratuvarında elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. PCR-temelli mikrodelesyon saptama yöntemleri genellikle gr/gr veya b2/b3 delesyonları gibi yaygın Y mikrodelesyonlarının her biri için ayrı bir teste ihtiyaç duyar ve bu Y mikrodelesyon araştırmasına dayanan çalışmaların çok azı tüm olası delesyonları analiz edebilmektedir. Bunyan ve ark.'nın yaptıkları çalışmada elde edilen sonuçlara göre, P360 MLPA prob miksinin, konvansiyonel multipleks PCR ile saptanamayan delesyonları hızlı ve basit bir şekilde tespit edilebileceğini göstermektedir (Bunyan et al., 2012).

Yaptığımız çalışmada, daha önce multipleks PCR yöntemiyle analiz edilen ve herhangi bir Y mikrodelesyonu saptanmayan 50 hasta MLPA yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonucunda 8 hastada %16 oranında AZF bölgesine ait parsiyel delesyonlar saptanmıştır. İki hastada (%4 oranında) EIF1AY geninde AZFb parsiyel delesyonu, 1 hastada (%2 oranında) EIF1AY ve BPY2 genlerini içeren AZBb+c parsiyel delesyonları ve 5 hastada (%10 oranında) BPY2 geninde AZFc parsiyel delesyonu saptanmıştır. Bunyan ve ark.'nın yaptıkları çalışma sonuçlarının aksine, bizim çalışmamızın kontrol grubunda her hangi bir mikrodelesyon/mikroduplikasyon saptanmamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar AZFc bölgesi parsiyel delesyonu açısından literatürle uyumlu bulunmuştur.

AZFb bölgesinde oluşan delesyonlar primer spermatosit evresinde spermatogenezin durmasına neden olur ve dolayısıyla bu bölgenin fertilité için gerekli olduğunu gösterir (O'Brien, Varghese, & Agarwal, 2010).

AZFb bölgesindeki genler spermin olgunlaşmasını ve büyümesini desteklemekle birlikte yine spermatositin mayoz aşamasından spermiyogenezise doğru ilerlemesinde önemli derecede rol alır (Colaco & Modi, 2018).

Bunyan ve ark.'nın yaptıkları çalışmada AZFc parsiyel delesyon dışında her hangi bir genomik kopya sayısı değişikliği tespit edilmemiştir. Ancak, çalışmamızda AZFc parsiyel delesyonların yanısıra, hem AZFb hemde AZFb+c parsiyel delesyonları saptanmıştır. Bunyan ve ark.'nın yaptıkları çalışmada farklı infertilite tanısı almış hasta grubunu analiz ettiklerini belirtmişlerdir (Bunyan et al., 2012). Bizim hasta grubumuzun ise sadece azospermi tanısı almış bireylerden oluşması sonuçlarımızın farklı olmasına sebebiyet verebilir.

Dolayısıyla azospermik bireylerde farklı delesyonlar görülebilir. Buna sebep olarak ise, azospermi hastalarının AZF bölgesinde daha çok genetik değişikliklerin meydana gelmesinden kaynaklı olduğunu düşünebiliriz. Böylelikle azospermi hasta grubunda sadece AZFc delesyonlarının değil, aynı zamanda diğer bölgelere ait delesyon görülebilir. O'Brien ve ark.'ının ve Colaco ve ark.'ının da çalışmalarında belirttiği gibi AZFb bölgesinin ve burada yerleşen bazı genlerin sperm olgunlaşmasında ve büyümesinde önemli rol alması ve çalışmamızda da diğer parsiyel delesyonların AZFb bölgesinde saptanılmasının infertilite açısından anlamlı olabileceğini düşündürmektedir.

Kleiman ve ark.'nın yaptıkları çalışmada EIF1AY geninin eksprese olamamasının azospermiye sporadik olarak katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir (Kleiman et al., 2012).

Çalışmamızda saptanan parsiyel AZFb delesyonu EIF1AY geni üzerinde bulunmaktadır. EIF1AY geni translasyon başlatıcı bir faktörü kodlamaktadır (Yu et al., 2015). Kleiman ve ark.'nın çalışma sonucuna dayanarak, EIF1AY geninin ekspresyon analizinin de, bu genin infertiliteye etkisinin bulunması açısından destekleyici yöntem olabileceği sonucuna varılabilir (Kleiman et al., 2012).

Saeed ve ark.'nın Mısır popülasyonunda 74 idiyopatik infertil bireylerden oluşan hasta grubuyla yapılan çalışma sonucuna göre, saptanan diğer delesyonların yanısıra AZFb delesyonu 16 hastada saptanmıştır. AZFb delesyonu içeren 16 hastadan sadece 1'inde (%6,25 oranında) tek başına EIF1AY geni delesyonu görülmüştür. Bu bulguların, literatürde belirtilen EIF1AY geninin çelişkili rolüne rağmen, AZFb delesyonlarının oluşmasında ve erken spermatosit arrestininde güçlü bir sebep olarak kabul edilebileceğini belirtmişler (Saeed, Neamattallah, Zaghloul, Elmolla, & Moustafa, 2013).

Çalışmamızın bulgular bölümünde belirtildiği üzere 2 hastada (%4 oranında) tek başına EIF1AY geninde AZFb parsiyel delesyonu görülürken, 1 hastada (%2 oranında) yine EIF1AY ve BPY2 genlerini içeren AZBb+c parsiyel delesyonları saptanmıştır. Bu oranları göz önünde bulundurulduğunda ve yukarıda gösterilen çalışma sonuçlarını ile karşılaştırıldığında, oranların birbirine yakın olduğunu görülmektedir. Ancak EIF1AY genin azospermiye neden olup olmadığını belirlemek için daha fazla hasta sayısı ve daha detaylı çalışmalarla araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Daha önce belirttiğimiz gibi, parsiyel delesyon saptadığımız diğer bölge AZFc bölgesidir. AZFc delesyonlarının sperm üretimi ile uyumlu (düşük seviyelerde de olsa) olduğu ve eşey hücrelere aktarılabilmesi gösterilmiştir. Daha spesifik olarak, AZFc delesyonları, testis tübüllerinde karışık bir germ

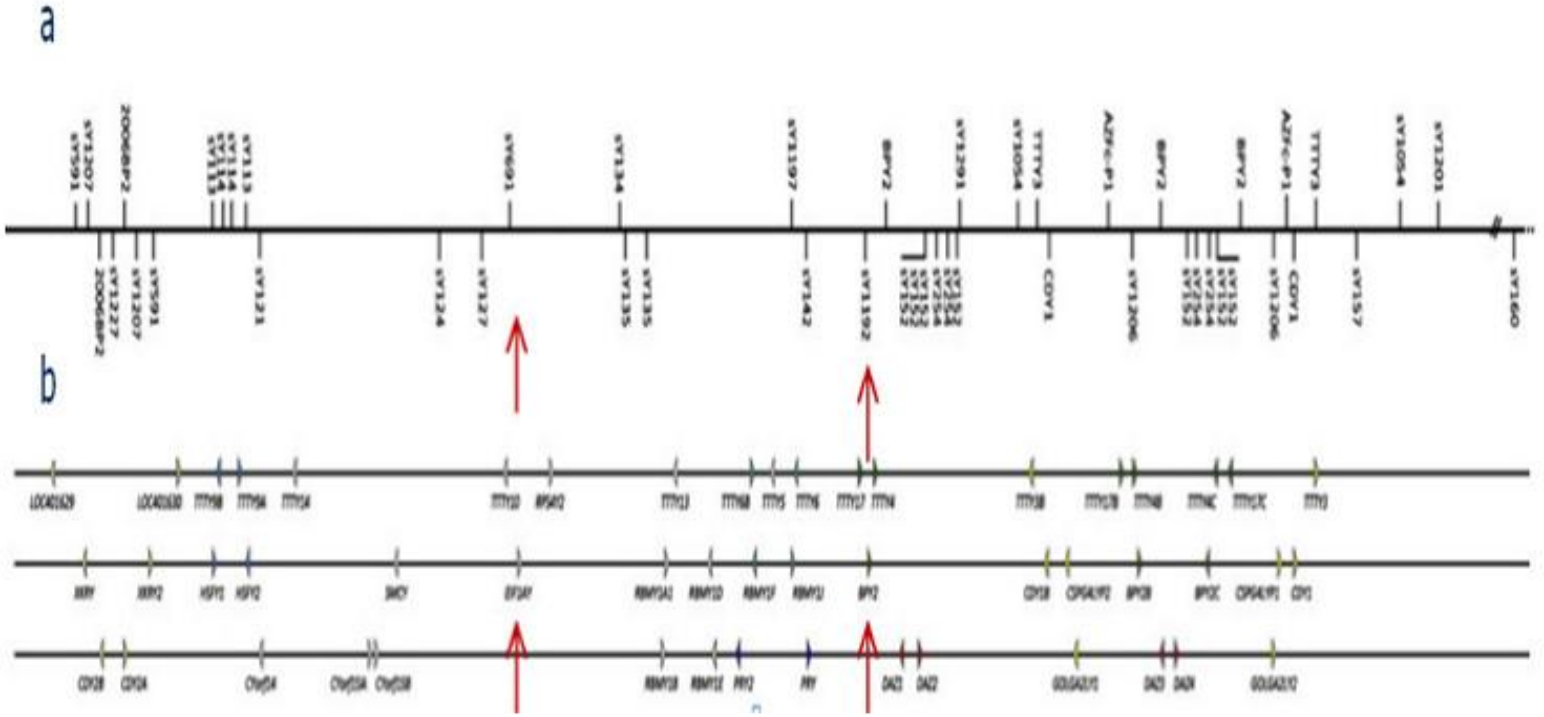
hücre atrofisinden kaynaklanan hipospermatogenez (anormal derecede azalmış sperm üretimi) ile ilişkilendirilmiştir (Navarro-Costa et al., 2010).

Bulgularımıza dayanarak (5 hastada (%10 oranında AZFc parsiyel delesyonu)) AZFc parsiyel delesyonlarının etkisinin yukarıda verilen çalışmalarda belirtildiği gibi hipospermatogeneze neden olup olmasını araştırılması için multidisipliner olarak araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. AZF bölgelerinin parsiyel delesyonlarının, hastaların semen analizi sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmesi araştırma çalışmasının daha anlamlı kılacağını düşündürmektedir. Normozoospermik bireylerin çalışma grubu olarak eklenmesi, yine parsiyel delesyonların sperm üretimine etkisini açıklayabilmek için katkı sağlayabilir.

Bulgular bölümünde belirttiğimiz gibi, çalışmamızda görülen diğer parsiyel delesyonlar BPY2 geninde saptanmıştır. BPY2 geni spesifik olarak testiste, protein ürünü ise erkek germ hücrelerinin gelişiminde fonksiyon gösterir.

Çin popülasyonunda yapılan bir çalışma sonucuna göre infertil erkeklerde BPY2 geni kopya sayısı değişikliklerinin sıklığının anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirmişlerdir (Lu et al., 2014). Hindistan popülasyonunda da yapılan benzer çalışmada yine aynı sonuca varmışlardır (Colaco & Modi, 2018). Choi ve ark.'ının yaptığı çalışmada ise BPY2 genindeki bazı genetik varyantların SCO'larla ilişkili olduğu bildirmişlerdir (Choi et al., 2007).

Yukarıda gösterilen tüm bilgileri dikkate alırsak ve çalışmamızda saptanan parsiyel delesyonlarının daha önce multipleks PCR yöntemiyle saptanmadığını göz önünde bulundurursak MLPA yönteminin daha hassas olduğunu söyleyebiliriz. MLPA yöntemiyle saptadığımız parsiyel delesyonların multipleks PCR analiz yöntemiyle tespit edilememesini, bakılan STS bölgelerinin arasında bu gen bölgelerinin olmaması ile ilişkilendirebiliriz (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Y kromozom görüntüsü: a) kırılma noktalarının sekans etiketli bölgelerin/tek nükleotid varyantlarının (STS/SNV) lokalizasyonu; b) AZFb ve AZFc bölgelerinin genetik yapısı

MLPA tekniğinin PCR tabanlı yöntemlere göre birçok avantajı vardır. Potansiyel Y kromozom mikrolezyonlarının ve mikroduplikasyonlarının tek bir reaksiyonda tespitini sağlayabilmektedir.

Çok sayıda yayında, MLPA'nın otozomal veya cinsiyet kromozomlarının, tek kopya delesyonlarının veya duplikasyonlarının saptamasının yanısıra, ikiden fazla kopya sayısı bulunan genlerdeki dozaj farkını tespit edebilmektedir (Bunyan et al., 2012).

Sonuç olarak, komplet ve parsiyel AZF delesyonlarını saptayabilmemiz için rutin olarak daha hassas ve pratik yöntem gereklidir. Elde ettiğimiz sonuçlar, P360 MLPA prob miksinin konvansiyonel multipleks PCR ile tespit edilemeyen parsiyel delesyonları hızlı ve basit bir şekilde saptadığını göstermektedir. MLPA prob miksinin AZF bölgelerinin tamamını kapsadığı için, parsiyel delesyonların saptanması, daha büyük AZF bölgesi delesyonlarının saptanmasıyla eşzamanlı olarak gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla bu analiz yöntemiyle Y kromozom delesyonlarını tek bir reaksiyonda tanımlayabilir.

Bu yöntem; daha geniş bölgeleri kapsayan mikrodelesyon/mikroduplikasyon analizinin yapılabilmesine ve bunun yanısıra detaylı genotip/fenotip korelasyonlarının kurulmasına yardımcı olacaktır. AZF bölgelerinin parsiyel ve komplet delesyonların erkek infertilitesine etkilerinin araştırılması açısından mPCR yöntemine kıyasladığımızda MLPA yönteminin daha elverişli olduğunu düşünmekteyiz. Bunun sebebi ise, saptanılacak bazı delesyonların olduğu bölgelerin rutinde kullanılan mPCR yöntemiyle bakılan bölgeler arasında olmaması ile ilişkilendirilebilir. Multipleks PCR yöntemi ile çalışıldığı zaman bu bölgelere özgü primerlerin dizayn edilmesi gerekirken, MLPA yöntemiyle tek prob miksle analiz edilebilmektedir.



## 6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Yöntem karşılaştırması amacıyla planladığımız bu çalışmamızda; sitogenetik analiz sonrasında normal karyotipe sahip olduğu belirlenen ve multipleks PCR ile yapılan moleküler analiz sonucunda normal olarak değerlendirilen 50 azospermik bireyden oluşan hasta grubumuz ve 15 fertil bireyden oluşan kontrol grubumuz MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) yöntemiyle analiz edilmiştir.

MLPA tekniği ile hasta grubumuzun 8 bireyinde %16 oranında AZFc ve AZFb bölgelerine ait parsiyel delesyonlar saptanmıştır. AZFb bölgesinde yerleşen EIF1AY geninde 2 hastada parsiyel delesyon, AZBb+c bölgesindeki EIF1AY ve BPY2 genine ait parsiyel delesyonlar ise sadece 1 hastada görülmüştür. Bunun yanısıra yine 5 hastada AZFc bölgesinde yerleşen BPY2 geninde parsiyel delesyonlar tespit edilmiştir. Fertil bireylerden oluşan kontrol grubumuzda her hangi bir delesyon/duplikasyon saptanmamıştır.

Çalışmamızın sonucunda, konvansiyonel multipleks PCR ile karşılaştırdığımızda MLPA yöntemiyle, daha önce tespit edilemeyen parsiyel delesyonları hızlı ve basit bir şekilde tespit edilebilmiştir. Bu yöntem sayesinde PCR temelli analiz yöntemleriyle tespit edilemeyen komplet veya parsiyel delesyonları tespit edilebileceğini, bununla da infertilitede henüz etkisi bilinmeyen bölgelerin ve genlerin anlamını ortaya konabileceği saptanmıştır. Bunun yanısıra detaylı genotip/fenotip korelasyonlarının yapılabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonuçları, literatürde yer alan benzer araştırmaların sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir. MLPA yöntemiyle yapılan diğer çalışmalarda daha hassas ve güvenilir sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir. Biz de bu sonuçları göz önünde bulundurarak, Y kromozomunun mikroduplikasyon/mikrodelesyonların saptanmasında MLPA analiz yönteminin daha duyarlı olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak, hasta ve kontrol gruplarını daha fazla birey sayısı ile oluşturmak daha güvenilir sonuçlar elde etmemize yardımcı olabilir. MLPA yöntemiyle yapılan çalışmalara sadece azospermik bireyler değil, diğer infertilite tanılı bireylerin de eklenmesi ile daha geniş bir spektrumda araştırılması, yöntemin güvenilirliğini desteklemek açısından önemli olabilir. Dolayısıyla parsiyel delesyonların azospermi dışında infertilite tanısı almış bireylerdeki durumun belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Parsiyel delesyonların literatürde gösterildiği gibi hipospermatogenez ile ilişkisinin kurulması ve Türk popülasyonundaki etkisinin tanımlanması için çalışmalara semen analiz verilerini ekleyerek, bunun yanısıra normozoospermik bireyleri de dahil ederek multidisipliner araştırmalarla daha önemli veriler elde edilebileceği düşünülmüştür. Böylelikle hem MLPA yönteminin güvenilirliği hem de parsiyel delesyonların



infertilitede etkisi tespit edilebilir. Y mikrolelesyonlarının etnik ve coğrafik farklılık gösterdiğini göz önünde bulundurursak, bu yöntemle sadece mikrolelesyonları değil, parsiyel delesyonların da Türk popülasyonunda görülme oranı ve etkisi saptanabilir.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Achkar, W., Wafa, A., & Moassass, F. (2013). Cytogenetic abnormalities and Y-chromosome microdeletions in infertile Syrian males. *Biomedical reports*, 1(2), 275-279.
- Alechine, E., & Corach, D. (2014). High-throughput screening for spermatogenesis candidate genes in the AZFc region of the Y chromosome by multiplex real time PCR followed by high resolution melting analysis. *PLoS one*, 9(5), e97227.
- Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J., & Vidal, F. (2005). Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenetic and genome research*, 111(3-4), 297-304.
- Association, M. I. B. P. P. C. o. t. A. U., & Medicine, P. C. o. t. A. S. f. R. (2006). Report on evaluation of the azoospermic male. *Fertility and sterility*, 86(5), S210-S215.
- Bağcı, H., & Yüksel, S. (2016). İdiyopatik infertilite tanılı Türk erkeklerinde HSFY geni mutasyonlarının araştırılması. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 1-14
- Bartke, A. (1999). Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction: What are we learning from transgenic and knock-out animals? 1. *Steroids*, 64(9), 598-604.
- Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2016). Mechanism of sex determination in humans: insights from disorders of sex development. *Sexual Development*, 10(5-6), 313-325.
- Bergmann, M. (2006). Physiology of spermatogenesis. In *Andrology for the Clinician* (pp. 272-281): Springer.
- Bouayed Abdelmoula, N., & Amouri, A. (2005). *Les chromosomes Y dicentriques première partie: Les aspects cytogénétiques et moléculaires*. Paper presented at the Annales de biologie clinique. 63 (3), 263-78.
- Bourke, E., Herlihy, A., Snow, P., Metcalfe, S., & Amor, D. (2014). Klinefelter syndrome: a general practice perspective. *Australian family physician*, 43(1/2), 38.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bundak, R., Darendeliler, F., Günöz, H., Baş, F., Saka, N., & Neyzi, O. (2008). Puberty and pubertal growth in healthy Turkish girls: no evidence for secular trend. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 1(1), 8.
- Bunyan, D. J., Callaway, J. L., & Laddach, N. (2012). Detection of partial deletions of Y-chromosome AZFc in infertile men using the multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Assay. *Journal of reproduction & infertility*, 13(3), 174.
- Bushnik, T., Cook, J. L., Yuzpe, A. A., Tough, S., & Collins, J. (2012). Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Human reproduction*, 27(3), 738-746.
- Canto, P., Munguia, P., Söderlund, D., Castro, J., & Mendez, J. (2009). Genetic analysis in patients with Kallmann syndrome: coexistence of mutations in prokineticin receptor 2 and KAL1. *Journal of andrology*, 30(1), 41-45.
- Ceylan, G. G., & Ceylan, C. (2015). WJCU. *World*, 4(1), 38-47.
- Choi, J., Koh, E., Suzuki, H., Maeda, Y., Yoshida, A., & Namiki, M. (2007). Alu sequence variants of the BPY2 gene in proven fertile and infertile men with Sertoli cell-only phenotype. *International journal of urology*, 14(5), 431-435.
- Colaco, S., & Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 14.
- DesGroseilliers, M., Beaulieu Bergeron, M., Brochu, P., Lemyre, E., & Lemieux, N. (2006). Phenotypic variability in isodicentric Y patients: study of nine cases. *Clinical genetics*, 70(2), 145-150.
- Dohle, G., Halley, D., Van Hemel, J., Van Den Ouwel, A., Pieters, M., Weber, R., & Govaerts, L. (2002). Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human reproduction*, 17(1), 13-16.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Durak Aras, B., Aras, I., Can, C., Toprak, C., Dikoglu, E., Bademci, G., . . . Artan, S. (2012). Exploring the relationship between the severity of oligozoospermia and the frequencies of sperm chromosome aneuploidies. *Andrologia*, 44(6), 416-422.
- El-Gehani, F., Zhang, F.-P., Pakarinen, P., Rannikko, A., & Huhtaniemi, I. (1998). Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biology of reproduction*, 58(1), 116-123.
- Elliott, D. J. (2000). RBMY genes and AZFb deletions. *Journal of endocrinological investigation*, 23(10), 652-658.
- Farrugia, M., Sebire, N., Achermann, J., Eisawi, A., Duffy, P., & Mushtaq, I. (2013). Clinical and gonadal features and early surgical management of 45, X/46, XY and 45, X/47, XYY chromosomal mosaicism presenting with genital anomalies. *Journal of pediatric urology*, 9(2), 139-144.
- Faure, A., Akinin-Seifer, I., Satre, V., Amblard, F., Devillard, F., Hennebicq, S., . . . Rousseaux, S. (2007). Fine mapping of re-arranged Y chromosome in three infertile patients with non-obstructive azoospermia/cryptozoospermia. *Human reproduction*, 22(7), 1854-1860.
- Fernandes, S., Huellen, K., Goncalves, J., Dukal, H., Zeisler, J., Rajpert De Meyts, E., . . . Sousa, M. (2002). High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 8(3), 286-298.
- Fichna, P., Fichna, M., Żurawek, M., & Nowak, J. (2011). Hypogonadotropic hypogonadism due to GnRH receptor mutation in a sibling. *Endokrynologia Polska*, 62(3), 264-267.
- Foresta, C., Ferlin, A., & Moro, E. (2000). Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Human molecular genetics*, 9(8), 1161-1169.
- Foresta, C., Moro, E., & Ferlin, A. (2001). Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine reviews*, 22(2), 226-239.
- Giachini, C., Laface, I., Guarducci, E., Balercia, G., Forti, G., & Krausz, C. (2008). Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Human genetics*, 124(4), 399-410.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Girardi, S., Mielnik, A., & Schlegel, P. (1997). Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(8), 1635-1641.
- Greenfield, A., Carrel, L., Pennisi, D., Philippe, C., Quaderi, N., Siggers, P., . . . Willard, H. F. (1998). The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Human molecular genetics*, 7(4), 737-742.
- Griffin, D. K., & Finch, K. A. (2005). The genetic and cytogenetic basis of male infertility. *Human Fertility*, 8(1), 19-26.
- Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., & He, Z. (2014). *The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology, 66-75.
- Hammami, W., Kilani, O., Khelifa, M. B., Ayed, W., Abdelhak, S., Bouzouita, A., . . . Amouri, A. (2014). *Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile Tunisian men*. Paper presented at the Annales de biologie clinique, 6(2), 134-159.
- Hardelin, J.-P., & Dodé, C. (2008). The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al. *Sexual Development*, 2(4-5), 181-193.
- Harley, V. R., Clarkson, M. J., & Argentaro, A. (2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocrine reviews*, 24(4), 466-487.
- Hawley, R. S. (2003). The human Y chromosome: rumors of its death have been greatly exaggerated. *Cell*, 113(7), 825-828.
- Hucklenbroich, K., Gromoll, J., Heinrich, M., Hohoff, C., Nieschlag, E., & Simoni, M. (2005). Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Human reproduction*, 20(1), 191-197.
- Hussein, A., Vasudevan, R., Patimah, I., Prashant, N., & Nora, F. (2015). Association of azoospermia factor region deletions in infertile male subjects among Malaysians. *Andrologia*, 47(2), 168-177.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Jiang, Y., Wang, W., Guo, Q., Sha, Y., Ouyang, H., & Zhou, Y. (2012). Multiplex ligation-dependent probe amplification for detecting AZF microdeletions on the Y chromosome in infertile men with azoospermia or severe oligozoospermia. *Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology*, 18(2), 115-121.
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., & Krausz, C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*, 62(2), 324-332.
- Kent-First, M., Muallem, A., Shultz, J., Pryor, J., Roberts, K., Nolten, W., . . . Jorgensen, L. (1999). Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molecular reproduction and development*, 53(1), 27-41.
- Kichine, E., Roze, V., Di Cristofaro, J., Taulier, D., Navarro, A., Streichemberger, E., . . . Chiaroni, J. (2011). HSFY genes and the P4 palindrome in the AZFb interval of the human Y chromosome are not required for spermatocyte maturation. *Human reproduction*, 27(2), 615-624.
- Kido, T., & Lau, Y.-F. C. (2015). Roles of the Y chromosome genes in human cancers. *Asian journal of andrology*, 17(3), 373.
- Kleiman, S. E., Almog, R., Yogev, L., Hauser, R., Lehavi, O., Paz, G., . . . Botchan, A. (2012). Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? *Fertility and sterility*, 98(1), 43-47. e42.
- Koşar, P. A., & Özçelik, N. (2007). Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 14(4).
- Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 25(2), 271-285.
- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., & Tüttelmann, F. (2014). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2(1), 5-19.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Krausz, C., Quintana-Murci, L., & McElreavey, K. (2000). Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Human reproduction*, 15(7), 1431-1434.
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*, 1.
- Küçükaslan, A. Ş., Çetintaş, V. B., Altıntaş, R., Vardarlı, A. T., Mutlu, Z., Ulukuş, M., . . . Eroğlu, Z. (2013). Identification of Y chromosome microdeletions in infertile Turkish men. *Turkish journal of urology*, 39(3), 170.
- Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., . . . Rozen, S. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature genetics*, 29(3), 279.
- Lahn, B. T., Pearson, N. M., & Jegalian, K. (2001). The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nature Reviews Genetics*, 2(3), 207.
- Lahn, B. T., Tang, Z. L., Zhou, J., Barndt, R. J., Parvinen, M., Allis, C. D., & Page, D. C. (2002). Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8707-8712.
- Lee, J. Y., Dada, R., Sabanegh, E., Carpi, A., & Agarwal, A. (2011). Role of genetics in azoospermia. *Urology*, 77(3), 598-601.
- Lee, P. A., & Houk, C. (2007). Puberty and its disorders. *Pediatric endocrinology*, 2, 273-304.
- Li, N., Dhar, S. S., Chen, T.-Y., Kan, P.-Y., Wei, Y., Kim, J.-H., . . . Lee, M. G. (2016). JARID1D is a suppressor and prognostic marker of prostate cancer invasion and metastasis. *Cancer research*, 76(4), 831-843.
- Lindhardt Johansen, M., Hagen, C. P., Rajpert-De Meyts, E., Kjærgaard, S., Petersen, B. L., Skakkebaek, N. E., . . . Juul, A. (2012). 45, X/46, XY mosaicism: phenotypic characteristics, growth, and reproductive function—a retrospective longitudinal study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(8), E1540-E1549.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lipshultz, L. I., Howards, S. S., & Niederberger, C. S. (2009). *Infertility in the Male*: Cambridge University Press, 31-48.
- Lopes, A. M., Miguel, R. N., Sargent, C. A., Ellis, P. J., Amorim, A., & Affara, N. A. (2010). The human RPS4 paralogue on Yq11. 223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. *BMC molecular biology*, 11(1), 33.
- Lu, C., Jiang, J., Zhang, R., Wang, Y., Xu, M., Qin, Y., . . . Zhao, Y. (2014). Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Molecular human reproduction*, 20(9), 836-843.
- Maan, A. A., Eales, J., Akbarov, A., Rowland, J., Xu, X., Jobling, M. A., . . . Tomaszewski, M. (2017). The Y chromosome: a blueprint for men's health? *European Journal of Human Genetics*, 25(11), 1181.
- Majdic, G., Saunders, P. T., & Teerds, K. J. (1998). Immunoeexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17  $\alpha$ -hydroxylase, C17, 20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biology of reproduction*, 58(2), 520-525.
- Martin, R. H. (2008). Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reproductive biomedicine online*, 16(4), 523-531.
- Nacar, E., & Nacar, A. (2010). Spermatogenik Hücrelerde Beta1 İntegrin Ve Fibronektin Dağılımı. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 1(2), 43-48.
- Nailwal, M., & Chauhan, J. B. (2016). Genetic investigation at azoospermia factor region for male infertility. *Indo American Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 3(12), 1498-1510.
- Navarro-Costa, P., Plancha, C. E., & Gonçalves, J. (2010). Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in) fertility? *BioMed Research International*, 2010.
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Genetics of male infertility. *Current urology reports*, 17(10), 70.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Noordam, M. J., Westerveld, G. H., Hovingh, S. E., van Daalen, S. K., Korver, C. M., van der Veen, F., . . . Repping, S. (2011). Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. *Human molecular genetics, 20*(12), 2457-2463.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2015). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book*: Elsevier Health Sciences, 88-91.
- O'Brien, K. L. F., Varghese, A. C., & Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and sterility, 93*(1), 1-12.
- O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. (2002). Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. *Human reproduction, 17*(6), 1565-1570.
- Oates, R. (2012). Evaluation of the azoospermic male. *Asian journal of andrology, 14*(1), 82.
- Oleszczuk, K., Giwercman, A., & Bungum, M. (2011). Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples. *Human reproduction, 26*(12), 3244-3248.
- Österlund, C., Segersteen, E., Arver, S., & Pousette, Å. (2000). Low number of Y-chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish andrology centre. *International journal of andrology, 23*(4), 225-229.
- Özdiler, E., & Aydos, K. (2000). Klinik Androloji. *Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi*.
- Peynirci, H., & Erturk, E. (2013). Klinefelter Sendromu: klinefelter syndrome. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism, 17*(3), 63-68.
- Piomboni, P., Stendardi, A., & Gambera, L. (2014). Chromosomal aberrations and aneuploidies of spermatozoa. In *Genetic Damage in Human Spermatozoa* (pp. 27-52): Springer.
- Poongothai, J., Gopenath, T., & Manonayaki, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Med J, 50*(4), 336-347.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Repping, S., Skaletsky, H., Lange, J., Silber, S., van der Veen, F., Oates, R. D., . . . Rozen, S. (2002). Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *The American Journal of Human Genetics*, 71(4), 906-922.
- Repping, S., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Brown, L. G., Marszalek, J. D., Gianotten, J., . . . Page, D. C. (2004). A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics*, 83(6), 1046-1052.
- Ross, J. L., Roeltgen, D. P., Kushner, H., Zinn, A. R., Reiss, A., Bardsley, M. Z., . . . Tartaglia, N. (2012). Behavioral and social phenotypes in boys with 47, XYY syndrome or 47, XXY Klinefelter syndrome. *Pediatrics*, 129(4), 769-778.
- Rowe, P. J., & Comhaire, F. H. (2000). *WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male*: Cambridge University Press, 14-54.
- Saeed, H., Neamattallah, H., Zaghloul, T., Elmolla, K., & Moustafa, A. (2013). Detection of the Microdeletions on Yq Chromosome in Egyptian Population with Idiopathic Male Infertility. *Life Science Journal*, 10(4), 1191-1199.
- Satar, D. A., & Gençdal, S. (2013). Sperm değerlendirilmesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4).
- Saxena, R., de Vries, J. W., Repping, S., Alagappan, R. K., Skaletsky, H., Brown, L. G., . . . Page, D. C. (2000). Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics*, 67(3), 256-267.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*, 30(12), e57-e57.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sen, S., Ambulkar, P., Hinduja, I., Zaveri, K., Gokral, J., Pal, A., & Modi, D. (2015). Susceptibility of gr/gr rearrangements to azoospermia or oligozoospermia is dependent on DAZ and CDY1 gene copy deletions. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(9), 1333-1341.
- Shah, K., Sivapalan, G., Gibbons, N., Tempest, H., & Griffin, D. K. (2003). The genetic basis of infertility. *Reproduction*, 126(1), 13-25.
- Sigman, M., Boyle, K., & Jarow, J. P. (2008). Prevalence of sperm in the post-ejaculatory urine of fertile and subfertile men. *Urology*, 71(1), 110-112.
- Simoni, M., Bakker, E., & Krausz, C. (2004). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *International journal of andrology*, 27(4), 240-249.
- Singh, I., Ozturk, N., Cordero, J., Mehta, A., Hasan, D., Cosentino, C., . . . Carraro, G. (2015). High mobility group protein-mediated transcription requires DNA damage marker  $\gamma$ -H2AX. *Cell research*, 25(7), 837.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., . . . Bieri, T. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423(6942), 825.
- Stouffs, K., & Lissens, W. (2012). X chromosomal mutations and spermatogenic failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1864-1872.
- Stouffs, K., Lissens, W., Van Landuyt, L., Tournaye, H., Van Steirteghem, A., & Liebaers, I. (2001). Characterization of the genomic organization, localization and expression of four PRY genes (PRY1, PRY2, PRY3 and PRY4). *Molecular human reproduction*, 7(7), 603-610.
- Stouffs, K., Lissens, W., Verheyen, G., Van Landuyt, L., Goossens, A., Tournaye, H., . . . Liebaers, I. (2004). Expression pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 10(1), 15-21.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Suganthi, R., Vijesh, V. V., Vandana, N., & Benazir, J. F. A. (2014). Y chromosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *International journal of fertility & sterility*, 7(4), 253.
- Sun, C., Skaletsky, H., Birren, B., Devon, K., Tang, Z., Silber, S., . . . Page, D. C. (1999). An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nature genetics*, 23(4), 429.
- Sun, C., Skaletsky, H., Rozen, S., Gromoll, J., Nieschlag, E., Oates, R., & Page, D. C. (2000). Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Human molecular genetics*, 9(15), 2291-2296.
- Tahmasbpour, E., Balasubramanian, D., & Agarwal, A. (2014). A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(9), 1115-1137.
- Tse, J., Wong, E., Cheung, A., O, W., Tam, P., & Yeung, W. (2003). Specific expression of VCY2 in human male germ cells and its involvement in the pathogenesis of male infertility. *Biology of reproduction*, 69(3), 746-751.
- Vineeth, V., & Malini, S. S. (2011). A journey on Y chromosomal genes and male infertility. *International Journal of Human Genetics*, 11(4), 203-215.
- Vogt, P. H. (2005). AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Human reproduction update*, 11(4), 319-336.
- Vorona, E., Zitzmann, M., Gromoll, J. r., Schüring, A. N., & Nieschlag, E. (2007). Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46, XX male syndrome, compared with 47, XXY Klinefelter patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(9), 3458-3465.
- Weidner, W., Colpi, G., Hargreave, T., Papp, G., Pomerol, J., & Infertility, E. W. G. o. M. (2002). EAU guidelines on male infertility. *European urology*, 42(4), 313-322.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2010). Physiology of testicular function. In *Andrology* (pp. 11-59): Springer.
- World Health Organization, D. (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human sperm. *World Health Organiz.*
- Wosnitzer, M., Goldstein, M., & Hardy, M. P. (2014). Review of azoospermia. *Spermatogenesis, 4*(1), e28218.
- Yang, X., Leng, X., Tu, W., Liu, Y., Xu, J., Pei, X., . . . Yang, Y. (2018). Spermatogenic phenotype of testis-specific protein, Y-encoded, 1 (TSPY1) dosage deficiency is independent of variations in TSPY-like 1 (TSPYL1) and TSPY-like 5 (TSPYL5): a case-control study in a Han Chinese population. *Reproduction, Fertility and Development, 30*(3), 555-562.
- Yiğın, U. D. A. K., & Gökçe, A. Y kromozomu mikrolelesyonları ve erkek infertilitesi, *18*(65), 126-129.
- Yu, X.-W., Wei, Z.-T., Jiang, Y.-T., & Zhang, S.-L. (2015). Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *International journal of clinical and experimental medicine, 8*(9), 14634.
- Zenteno-Ruiz, J. C., Kofman-Alfaro, S., & Méndez, J. P. (2001). 46, XX sex reversal. *Archives of medical research, 32*(6), 559-566.
- Zhang, F., Li, Z., Wen, B., Jiang, J., Shao, M., Zhao, Y., . . . Lu, D. (2006). A frequent partial AZFc deletion does not render an increased risk of spermatogenic impairment in East Asians. *Annals of human genetics, 70*(3), 304-313.
- Zhang, Y.-S., Dai, R.-L., Wang, R.-X., Zhang, H.-G., Chen, S., & Liu, R.-Z. (2013). Analysis of Y chromosome microdeletion in 1738 infertile men from northeastern China. *Urology, 82*(3), 584-588.
- Zhao, L., Bakke, M., Krimkevich, Y., Cushman, L. J., Parlow, A., Camper, S. A., & Parker, K. L. (2001). Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development, 128*(2), 147-154.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)**

Zorrilla, M., & Yatsenko, A. N. (2013). The genetics of infertility: current status of the field. *Current genetic medicine reports*, 1(4), 247-260.



## Özgeçmiş

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : KÖNÜL HAZİYEVA  
Doğum tarihi ve yeri : 22.01.1989 / Azerbaycan  
Uyruğu : Azerbaycanlı  
Medeni durumu : Bekar  
İletişim adresleri : konul.haziyeva@gmail.com

### Eğitim Durumu

(Tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru ilköğretim, lise, üniversite, yabancı dil / diller)

Orta okul/Lise : 221 N°'lu Khatai rayonu. 1996 - 2007

Lisans : Bakü Devlet Üniversitesi Üniversitesi Biyoloji Fakültesi, 2008-2012

Yüksek Lisans : ESOGU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD. 2014-2018

**Yabancı Dil** : İngilizce, Rusça

### Mesleki Deneyim

Biyolog : Bakı Kimya-Teknoloji Laboratuvarı

### Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

#### Yayımlar:

Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.

1. Cilingir, O., Aras, B. D., Ansari, S. K., Aynaci, S., Haziyeva, K., Arslan, S., ... & Ozdemir, M. (2017, June). Correlation between cytogenetic and molecular genetic analysis in infertile males with azoospermia. in molecular cytogenetics (vol. 10). 236 grays inn rd, floor 6, london wc1x 8hl, england: biomed central ltd.

2. Cilingir, O., Bulur, I., Aras, B. D., Kutlay, O., Erzurumluoglu, E., Haziyeva, K., ... & Artan, S. The Relationship between Glutathione-S-Transferases Polymorphisms and Lichen Planus Susceptibility. International Journal of Research Studies in Medical and Health Sciences Volume 3, Issue 1, 2018, PP 15-22 ISSN : 2456-6373

3. Cilingir, O., Saracoglu, N., Aras, B. D., Haziyeva, K., Kutlay, Ö., Erzurumluoglu, E., ... & Artan, S. Glutathione S-Transferases M1/T1 and P1 Polymorphisms in Patients with Alopecia Areata. International Journal of Research Studies in Medical and Health Sciences Volume 3, Issue 2, 2018, PP 1-8 ISSN : 2456-6373

### **Bilimsel Etkinlikler**

Burslar :  
Ödüller :  
Projeler :  
Sözlü Konferans veya Seminerler :  
Kurslar ve Eğitim Programları :

