

TC
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE Y KROMOZOMU ÜZERİNDEKİ
SUBDELESYONLAR

UZMANLIK TEZİ

Dr. C. Cengiz BEYAZ

Danışman: Prof.Dr. Ramazan AŞCI

Samsun
Temmuz-2014

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında konunun belirlenmesinden tez yazımına kadar danışmanlığımı yapan ve hiç bir konuda yardımını esirgemeyen Prof.Dr.Ramazan Aşçı Hocama, çalışmanın genetik ayağının yürütülmesinde büyük emekleri olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Doç.Dr. Sezgin Güneş Hocama ve Uzman Biyolog Tuba Kulaç'a, kontrol grubunun oluşturulmasında ve tüm semen analizlerinin değerlendirilmesinde emeği olan Biyolog Gökhan Zengin'e, olguların Üremeye Yardımcı Tedavi sonuçlarının toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Tüp Bebek Merkezi çalışanlarına, hasta dosyalarının toplanmasında emekleri olan Üroloji poliklinik ve servis sekreterleri ile personellere, verilerin istatistiksel analizinde büyük katkısı olan Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç, Dr. Kadir Önem Hocama, testiküler histopatoloji örnekleri için Patoloji Bölümünden Dr.Hülya Savaş Mutlu'ya, gönüllü olarak kontrol grubuna dahil olarak çalışmamıza destek veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi çalışanlarına, üroloji eğitimimde ve pratiğimde katkısı olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve tez süreci boyunca destekleri olan Üroloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine teşekkürlerimi borç bilirim.

Tezimi destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Tezleri Destekleme Programına (PYO.TIP.1904.12.04) ve Proje Yönetim Ofisi Çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu tez aileme ve üzerimde emeği olan tüm hocalarıma adanmıştır.

ÖZET

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE Y KROMOZOMU ÜZERİNDEKİ SUBDELESYONLAR

Amaç: Kısırlık yakınmalı erkek olguların yaklaşık %30'unda bir neden bulunamamaktadır. Son yıllarda Y kromozomunun subdelesyonlarının (parsiyel delesyon) da testiküler yetmezliğe yol açarak kısırlık nedeni olabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada açıklanamayan infertilite nedeniyle değerlendirilen erkek olgularda Y kromozomu üzerindeki AZFc subdelesyonları ve klinik yansımaları araştırılacaktır.

Olgular ve Yöntem: Çalışma, 2008-2012 yılları arasında infertilite tanısı konulmuş, non-obstrüktif azospermi (NOA) veya şiddetli oligozoospermi (sperm konsantrasyonu <5 milyon/ml) nedeniyle sitogenetik ve Y kromozom mikroddelesyon analizi yapılmış 390 ve kontrol grubu olarak 65'i çocuk sahibi toplam 87 normospermik olguyu kapsamıştır. Y kromozomunun AZFc bölgesindeki gr/gr ve b2/b3 subdelesyon analizi için sY1191 ve sY1291 markerları Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile genotiplendirilip agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. Olguların demografik, laboratuvar ve Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYT) sonuçlarından elde edilen verileri ile subdelesyonlar arasındaki araştırıldı.

Bulgular: NOA'lı 9 (%4,1), Oligoasthenoteratozoospermik (OAT) 8 (%7) ve kontrol grubunda 11 (%12,6) olguda gr/gr delesyonu izlenirken, b2/b3 delesyonu NOA'lı 15 (%6,9), OAT'li 12 (%10,4) ve kontrol grubunda 9 (%10,3) olguda saptandı. Kontrol grubunda gr/gr delesyonu anlamlı yüksek bulundu ($p=0,026$). Gruplar arasında b2/b3 delesyonu açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,437$). Subdelesyonlar ile sperm konsantrasyonu ve ÜYT (cerrahi sperm eldesi oranları, embriyo gelişimi, gebelik ve testis histolojisi) sonuçları arasında istatistiksel ilişki saptanmadı.

Sonuç: Türkiye'de ilk kez Orta Karadeniz Bölgesi'nde gerçekleştirilen bu çalışmada AZFc bölgesi subdelesyonları ile erkek infertilitesi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi; AZFc; gr/gr; b2/b3; Y kromozom subdelesyonları

ABSTRACT

Y CHROMOSOME SUBDELETIONS IN MALE INFERTILITY

Aim: Approximately thirty percent of male infertility is still idiopathic. It is asserted that Y chromosome subdeletions (partial deletion) can be a reason of male infertility due to causing testicular failure. We aimed to investigate AZFc region subdeletions on Y chromosome and its clinical effects in patients with idiopathic infertility.

Patients and Method: A total of 390 male patients with infertility and 87 control were enrolled the study between 2008 and 2012. Infertile group include patients with non obstructive azoospermia and severe oligozoospermia (sperm concentration < 5mil./ml). Karyotype, Y chromosome microdeletion analysis and gr/gr, b2/b3 subdeletion were investigated in infertile group. gr/gr, b2/b3 subdeletions were searched in control group. The markers sY1191 and sY1291 were used to identify gr/gr and b2/b3 subdeletions with using Polymerase Chain Reaction and agarose gel electrophoresis. The demographic and laboratory data and Assisted Reproductive Technology (ART) outcomes were compared. SPSS 18 were used for statistical analysis.

Results: We observed nine gr/gr deletions in NOA group (4,1%), eight in OAT group (7%) and 11 in control group (12,6%). b2/b3 deletions were detected in 15 patients in NOA group (6,9%), 12 in OAT (10,3%) group and nine in control group (10,3%). gr/gr deletion were significantly higher in control group ($p=0,026$). There was no significant difference in b2/b3 subdeletion rates among groups ($p=0,437$). No statistical correlations between subdeletions and sperm concentration and ART outcomes (sperm retrieval, embryo development, pregnancy and testicular histology) were found.

Conclusion: Our data indicate that there was no significant correlation between AZFc region subdeletions and male infertility in our study which was performed first time in the Central Black Sea Region of Turkey.

Keywords: Male infertility; AZFc; gr/gr; b2/b3; Y chromosome subdeletions

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ABP: Androjen bağlayıcı protein
AR: Androjen reseptörü
ASRM: Amerikan Üreme Tıbbi Derneği
AUA : Amerikan Üroloji Derneği
AZF: Azoospermi faktörü
BKİ: Beden Kitle İndeksi
CBAVD: Konjenital bilateral vaz deferens agenezi
CFTR: Kistik Fibroz Transmembran Düzenleyici
DAZ: Deleted in Azoospermia
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
EAU : Avrupa Üroloji Derneği
E2: Östradiol
FSH: Folikül uyarıcı hormon
GnRH: Gonadotropin serbestleştirici hormon
HHG: Hipotalamo-hipofizer-gonadal
ICSI: İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu
LH: Luteinize edici hormon
NOA: non-obstrüktif azoospermi
OA: Obstrüktif azoospermi
OAT: oligoastenoteratozoospermi
OMÜ: Ondokuz Mayıs Üniversitesi
PRL: Prolaktin
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
SCO: Sertoli cell only
SRY: Cinsiyet Belirleyici Gen
TESE: Testiküler sperm ekstraksiyonu
TT: Total testosteron
ÜYT : Üremeye yardımcı tedavi

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Erkek Genital Sistem Embriyolojik Gelişimi	4
2.2 Erkek Genital Sistem Anatomisi	4
2.3. Erkek Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı	6
2.4. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi	7
2.4.1. Öykü ve fizik muayene	7
2.4.2. Laboratuvar ve Görüntüleme	7
2.4.3. Genetik İnceleme	9
2.5. SPERMATOGENEZ VE GENETİK KONTROL.....	9
2.5.1. Spermatogenezin Önemli Fazları	9
2.5.2. Spermatogenez Regüle Eden Genler	10
2.5.2.1. Primordial germ Hücrelerini/Gonositleri Regüle Eden Genler	10
2.5.2.2. Spermatogenezin İlerlemesi Üzerine Etkili Olan Genler.....	10
2.5.2.3. Spermiyogenez Üzerine Etkili Genler	11
2.6 Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri.....	13
2.6.1. Sayısal Kromozom Anomalileri	13
2.6.2 Yapısal Kromozomal Anomaliler	14
2.6.3. Y Kromozomu Yapısal Bozuklukları	16
2.6.4 X Kromozomuna Bağlı Bozukluklar	21
2.6.5. Otozomal Kromozomlardaki Yapısal Abnormaliteler	22
2.6.6. Kistik Fibroz Transmembran Düzenleyici (<i>CFTR</i>) Gen Mutasyonları.....	22
2.6.7. Mitokondriyal DNA Bozuklukları.....	22
3. OLGULAR VE YÖNTEM.....	23
3.1. Olgular ve Kontrol Grubu	23
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	25
3.3. Solüsyonların Hazırlanması	26
3.4. DNA İzolasyonu ve Kullanılan Solüsyon ve Tamponlar	27
3.5. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	29
3.6. sY1191 ve sY1291 bölgelerinin Multipleks PZR Yöntemi ile Genotiplenmesi	30
3.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	30

3.8. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR	43
EKLER.....	56

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) infertiliteyi, 12 ay veya daha uzun süre ile vajinal yoldan düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrasında klinik gebelik elde edememe durumu olarak tanımlamıştır[1]. Eşi normal olduğu halde, vajinal yoldan, normal sıklıkta ve hiç korunma yapmadıkları halde bir yıl içinde çocuk sahibi olamayan erkeklerde kısırlıktan söz edilir[2]. Fertilite tarih boyunca toplumlarca önemsenmiş, tarihi belgelerde buna ilişkin öyküler veya öğütler sunulmuştur. Bunların en eski örneklerinden biri olan ve insan üremesini anlatan Kahun Papirusu 4000 yıllıktır[3]. İnfertil çiftlerin yaklaşık yarısında erkeğe ait nedenler bulunmasına rağmen, infertilitenin kadına ait bir bozukluk olduğu önyargısı hala devam etmektedir[4]. İnfertilite tanımı için demografik, klinik ya da epidemiyolojik yaklaşımlar arasında farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Demograflar canlı doğum yapmamayı temel alırken, epidemiyologlar gebelik riskine maruz kalan kadınların gebe kalmak için sergilediği yaklaşımı (düzenli korunmasız cinsel ilişki) kriter almaktadır[5]. DSÖ, Avrupa Üroloji Derneği (EAU), Amerikan Üreme Tıbbi Derneği (ASRM) ile Amerikan Üroloji Derneği (AUA) çiftlerin bir yıllık korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememesini infertilite olarak tanımlamaktadır[6].

Son 25 yıl içinde kopyalama sonucu koyun Dolly'nin doğumu gibi üreme sağlığı konusunda önemli gelişmeler yaşandı. Yardımcı üreme yöntemleri ile yakın zamana kadar fertilizasyonu olanaksız olduğu düşünülen non-obstrüktif azoospermik (NOA) olgularda, yüksek maliyetler de olsa, testisten sperm eldesi ve intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile fertilizasyon sağlanabilmektedir.

Çin hariç, dünya genelinde infertilite sorunu olan 580 milyon insanın (çiftlerin %5-8'i) yaklaşık 372 milyonu gelişmekte olan ülkelerde bulunmaktadır [7]. On iki aylık infertilite prevalansı gelişmiş ülkelerde %3,5 ile %16,7 arasında değişirken, az gelişmiş ülkelerde %6,5 ile %9,3 arasında değişmektedir[8]. Erkek fertilitesindeki global eğilime bakıldığında sperm sayılarında azalmanın sürdüğü görülmektedir. Carlsen ve arkadaşları 1992 yılında yayımladıkları bir çalışmada 1938-1990 yılları arasında semen kalitesinde dünya çapında bir azalma olduğunu bildirmişlerdir[9].

Türkiye’de infertilitenin sorgulandığı 1990 nüfus sayım sonuçlarına göre 15-49 yaş arası evli kadınlarda infertilite oranı %8,5 olarak bulunmuştur[10]. Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması 2008 yılı verilerine göre 45-49 yaş grubu evli kadınlarda infertilite prevalansı %2’nin altında bulunmuştur[11].

En sık karşılaşılan infertilite nedenleri sperm anomalileri gibi erkeğe ait faktörler, ovulasyon bozuklukları ve tubal patolojiler gibi kadına ait nedenler, kadın ve erkeğe ait nedenlerin kombinasyonu ve hiçbir nedenin bulunamadığı idiyopatik faktörlerdir[12].

İnfertil erkeklerin yaklaşık %6’sında karyotip analizinde kromozomal defekt vardır ve sperm sayısı azaldıkça anomali oranı artmaktadır[13]. Sayısal (Klinefelter sendromu) ve yapısal (translokasyonlar) kromozom anomalileri, Y kromozomu yapısal bozuklukları (Y mikrolelesyonları), X kromozomuna bağlı bozukluklar (Kallmann sendromu), otozomal gen bozuklukları ve kistik fibroz transmembran düzenleyici (CFTR) gen mutasyonları infertil erkeklerde görülen başlıca genetik nedenlerdir[14]. Toplumlar arasında farklılık göstermekle birlikte azoospermik olgularda karyotip anomalileri %10-15 oranında bulunurken, oligozoospermiklerde bu oran %4-5 ve normozoospermiklerde %1 olarak saptanmıştır[15]. Y kromozom uzun kolunda mikrolelesyon olasılığı azoospermiklerde %13 ve oligozoospermiklerde ise %3-7 olarak bulunmuştur[16]. Üremeye yardımcı tedavi (ÜYT) yöntemi uygulama endikasyonu olan şiddetli oligozoospermik (<5 milyon) veya non-obstrüktif azoospermik olgulara mutlaka karyotip ve Y kromozom mikrolelesyon analizi önerilmektedir[17].

Günümüzde infertil erkek olguların %30’unda kısırlık nedeni idiyopatik olarak belirlenmektedir[17]. İdiyopatik nedenler içerisinde spermatozoa yapı ve işlevini etkileyen seminal enflamasyon ve oksidatif stres gibi, Y kromozom subdelesyonlarının (parsiyel delesyon) da testiküler yetmezliğe yol açarak kısırlık nedeni olabileceği öne sürülmüştür[18]. Bu subdelesyonların görülme oranı şiddetli oligozoospermik ve azoospermik olgularda ırklar arası farklılık göstermektedir. Japonya ve birkaç Avrupa ülkesinde AZFc bölgesindeki subdelesyonlar ile erkek infertilitesi arasında anlamlı birlikteliği gösteren çalışmalar vardır[19].

Bilgilerimiz ışığında, Türkiye’de Y kromozomu üzerindeki subdelesyonların araştırıldığı yayımlanmış bir araştırma yoktur. Bu çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi’nde üçüncü basamak sağlık hizmeti sunan OMÜ Tıp Fakültesi Üroloji-Androloji polikliniği ve Tüp Bebek Merkezinde erkek infertilitesi nedeniyle değerlendirilen olgularda Y kromozomu uzun kolu üzerinde yer alan AZFc gen bölgesindeki subdelesyonların görülme sıklığı ve klinik yansımaları araştırılacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sistem Embriyolojik Gelişimi

Genital sistemi oluşturan yapılar gonadlar, genital boşaltım kanalları ve dış genital organlar şeklinde ayrılmaktadır. Fertilizasyon sırasında oosit II'deki X kromozomuna spermden gelen bir X veya Y kromozomu bağlanması sonucu fenotipik özellikler ancak altıncı haftadan sonra belirmeye başlar. Üriner sisteme ait yapılar, gonadların bazı bölümleri ve erkek genital sisteminin boşaltım kanalları ara mezodermden gelişir. Paramezonefrik kanallar (Müller kanalları) ise gestasyonun 44. ile 48. günleri arasında karın boşluğunun iç yüzeyini döşeyen sölom epitelinin içeriye doğru kıvrılması ile oluşur[20-21].

Erkek genital sisteminin gelişiminde ilk basamak, SRY (Sex Determining Region of Y) proteininin ifade edilmesidir. SRY geni ifadesi gerçekleşmeyen embriyolar, Y kromozomu bulunsa bile dişi yönde gelişirler. Sertoli hücreleri, Mülleryan İnhibe Edici Madde ve Androjen Bağlayıcı Proteini (ABP) salgılayarak Leydig hücrelerine dönüşecek olan mezenkim hücrelerinin testise göçünü sağlar ve erkek germ hücrelerinin mayoz döngüsüne girmesini engeller. Leydig hücreleri ise testosteron üretimini sağlar. Testosteron, testis ve genital dokularda bol miktarda bulunan 5 α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülerek, erkek üretrası, prostat, penis, skrotum gelişmesini ve testislerin skrotuma inişini sağlar[22].

2.2 Erkek Genital Sistem Anatomisi

Erkek üreme sistemi organları dış ve iç genital organlar olarak ikiye ayrılır. Dış genital organlar penis ve skrotumdan oluşurken, iç genital organlar testis, epididim, spermatik kord, duktus deferens (vaz deferens), seminal keseler, ejakulator kanallar, prostat ve bulbouretral (Cowper) bezlerden oluşur[23].

Testislerin boyutları 4x2.5x3 cm ve bir testisin volümü ≥ 15 ml'dir. Testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücrelerini ve spermlerin beslenmelerini sağlayan, fagositoz yapan ve inhibin hormonunu salgılayan Sertoli hücrelerini içerir. Bu hücrelerin işlevleri hipofiz tarafından denetlenir[24]. Sertoli hücreleri seminifer tübüllerde germinal hücreler ile birlikte bulunurken, Leydig hücreleri tübüller arasındaki bağ dokuda (interstisyum) yerleşiktir. Kan-testis bariyerinin oluşumunda Sertoli hücreleri görev alır[25].

Epididim testisin üst-arka kenarında bulunur ve 4 cm uzunluğunda bir tunika içinde yer alan tek bir kanal yumağıdır. Yumak açıldığında uzunluğu insanlarda 3-4 m, ratlarda yaklaşık altı metredir. Epididimler spermlerin motilite, morfoloji ve fertilitte olgunlaşmasını sağlar. Olgunlaşan spermler epididim kuyruğunda depolanır[26].

Spermatik kord testisin vasküler yapılarını, sinirlerini ve duktus (vaz) deferensi içerir ve inguinal kanal ile testis arasında uzanır[27]. Duktus deferens inguinal kanaldan karın boşluğuna girer, seminal kesenin kanalı ile birleşerek ejakulator kanal adını alır ve prostatın santral zonundan prostatik üretraya açılır[28].

Seminal keseler, mesane arka alt tarafında yerleşik tubüler yapıda bir çift bezdir. Fruktoz, sitrik asit, fibrinojen, prostaglandinler ve spesifik proteinleri içeren salgıları ile ejakulatın koagülasyonunu, spermatozoa aktivasyonunu ve semenin bazik özelliğini sağlar. Fruktoz spermin temel besin kaynağıdır. Prostaglandinler ise servikal mukusla reaksiyona girerek sperm hareketleri için uygun ortam sağlamanın yanısıra, tuba uterina ve uterusu kasılmalar sağlayarak spermlerin ovuma ulaşmasını yardımcı olur[29].

Prostat bezi mesanenin altında ve rektumun önünde yer alır ve seminal PSA içeren asidik salgıları ile semenin likefaksiyonunu sağlar. Ejakulator kanallar prostat bezinin parankim dokusu içerisinden geçerek kollikulus seminalislerde prostatik üretraya açılır. Cinsel uyarı sırasında Cowper bezlerinde salgısı üretra içerisinde kalmış idrarı nötralize eder ve bazik ejakulatın üretradan geçişi ile cinsel ilişkiyi kolaylaştırır[30].

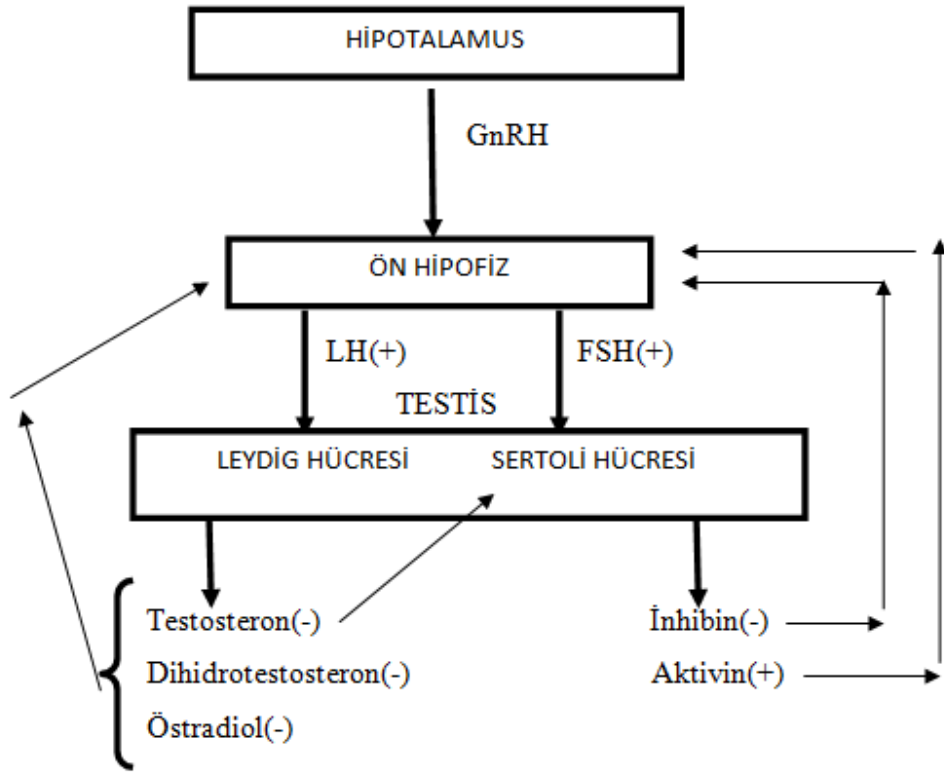
Prostat ve seminal keselerde salgının oluşmasında parasempatik ve nitriderjik (NA-NK) sistem etkili iken, epididimal içerik de dahil salgıların arka üretraya boşalmasında sempatik sistem etkilidir. Sempatik etki ile salgıların arka üretraya boşalması sırasında mesane boynu kapalı ve dış sfinkter gevşektir. Bulböz üretraya dolan salgı pudental sinir uyarımı ile dış sfinkterin ve bulboüretal kasların ritmik kasılmaları ile dışarı atılır[31].

Volümü 2-5 ml olan ejakulat (semen) 300-400 milyon sperm içerir. Semen %60'ını seminal keseler, %30'unu prostat ve %10'unu epididim ve diğer bez salgıları oluşturur[32].

2.3. Erkeklerde Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı

Erkeklerde hipotalamo-hipofizer-gonadal (HHG) aksın iki temel işlevi vardır. Bunlar üreme performansı için gerekli seks hormonlarının salınımı ve türün devamı için gerekli spermatogenetik hücrelerin sağlıklı gelişiminin sağlanmasıdır[33].

Hipotalamustan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salınır ve portal dolaşımdan geçerek yüksek konsantrasyonlarda ön hipofize gelir. Hipofizdeki gonadotropik hücrelerin reseptörlerine bağlanarak luteinize edici hormon (LH) ve follikül uyarıcı hormon (FSH) salgılatır. FSH ve LH sistemik dolaşım ile testise ulaşır. LH Leydig hücrelerine etki ederek testosteron üretimini sağlarken, FSH Sertoli hücrelerinden ABP, inhibin ve aktivin olmak üzere onlarca molekülün salgılanmasını sağlar. GnRH salınımı pulsatil olduğundan, FSH ve özellikle de LH salınımı da pulsatil bir şekilde olur[33-34]. HHG aksın düzenlenmesi şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1: Erkeklerde HHG aksı

2.4. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

İnfertilite nedeniyle başvuran erkeğin öyküsü, özgeçmişi ve soygeçmişi iyi sorgulanıp fizik muayenesi sistematik bir şekilde yapılmalıdır[17]. Tüm bunlardan elde edilecek bulgulara göre laboratuvar tetkikleri yapılmalı ve gerekirse görüntüleme yöntemleri uygulanmalıdır. EAU'nun Erkek İnfertilitesi Kılavuzunda infertilite nedenleri tablo I'de gösterilmiştir[17].

İnfertil erkeğin değerlendirilmesindeki temel amaçlar:

1. Düzeltilebilir durumları aydınlatmak
2. Erkek eşin spermi kullanılarak ÜYT ile tedavi edilebilen düzeltilemeyen durumları saptamak
3. Hiçbir teknik ile düzeltilemeyen sadece donör inseminasyon veya evlat edinme ile tedavi edilebilen durumları saptamak
4. Erkeklerde kısırlıkla birlikte olan önemli hastalıkları saptamak
5. Hastayı ve doğacak bebeği etkileyen kromozomal ve genetik anomalileri saptamak

2.4.1. Öykü ve fizik muayene

Hastanın kısırlık öyküsü, seksüel öykü, çocukluk çağı, tıbbi öykü, cerrahi öykü ve aile öyküsü detaylıca sorgulandıktan sonra fizik muayenede genel vücut görünümü, sekonder seks karakterleri, skrotum, testis volümleri, vaz deferens ve epididimler değerlendirilmelidir.

2.4.2. Laboratuvar ve Görüntüleme

İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde öykü ve fizik bakıdan sonra ilk istenecek laboratuvar testi semen analizidir. DSÖ 1999 ve 2010 yılı semen parametreleri referans değerleri tablo II'de gösterilmiştir. İlk semen analizi normal ise yeni bir semen analizine gerek yoktur, anormal ise bir ay sonra ikinci bir semen analizi yapılır[2]. HHG aksın değerlendirilmesi açısından sabah (saat 07-11 arasında) kanında FSH ve Total Testosteron (TT), gerektiğinde LH, Prolaktin (PRL) ve Estradiol (E2) düzeyleri ölçülmelidir. Öykü, fizik muayene ve laboratuvar bulgularından sonra gerektiğinde skrotal ultrasonografi (USG) ve transrektal ultrasonografi (TRUSG) gibi görüntüleme yöntemlerine başvurulur.

Tablo I: Erkek infertilitesiyle ilgili faktörlerin dağılımı[17].

Tanı	Olgular(tümü, n: 12.945)	Azoospermik olgular(n:1.446)
	%100	%11,2
Olası infertilite sebebi	42,6	42,6
İnmemiş testis	8,4	17,2
Varikosel	14,8	10,9
Sperm otoantikörleri	3,9	-
Testiküler tümör	1,2	2,8
Diğer	5,0	1,2
İdiopatik infertilite	30,0	13,3
Hipogonadizm	10,1	16,4
Klinefelter sendromu	2,6	13,7
XX male	0,1	0,6
Primer (testiküler)	2,3	0,8
Sekonder (hipogonadotropik)	1,6	1,9
Kallmann sendromu	0,3	0,5
İdiopatik hipogonadotropik	0,4	0,4
Hipofiz cerrahisi sonrası	<0,1	0,3
Diğer	0,8	0,8
Geç başlangıçlı hipogonadizm	2,2	-
Gecikmiş puberte (yapısal)	1,4	-
Sistemik hastalıklar	2,2	0,5
Malign hastalıklara bağlı krioprezervasyon	7,8	12,5
Testis tümörü	5,0	4,3
Lösemi	1,5	4,6
Lenfoma	0,7	2,2
Sarkom	0,6	0,9
Ereksiyon/ejekülasyon bozuklukları	2,4	-
Tıkanıklıklar	2,2	10,3
Vazektomi	0,9	5,3
Kistik fibroz (CBAVD)	0,5	3,1
Diğer	0,8	1,9

Tablo II: DSÖ 1999 ve 2010 yılı semen parametreleri referans değerleri[35]

Parametre	DSÖ-1999	DSÖ-2010
Semen hacmi (ml)	≥ 2	1,5
Toplam sperm (10^6 /ejakülat)	40	39 (33-46)
Sperm sayısı (10^6 /ml)	20	15 (12-16)
Motilite a+b (%)	> 50	40 (38-42)
Hızlı ileri hareketli (%)	25	32 (31-34)
Vitalite (%)	75	58 (55-63)
Morfoloji (%)		4 (3-4)
pH	$\geq 7,2$	$\geq 7,2$
Lökosit (10^6 /ml)	< 1	< 1

2.4.3. Genetik İnceleme

EAU, AUA, ASRM ve DSÖ kılavuzlarına göre sperm konsantrasyonu <5 milyon/ml olan olgular ile NOA'lı olgulara sitogenetik (karyotip) ve Y kromozom mikrolelesyon analizi istenmelidir[17].

2.5. SPERMATOGENEZ VE GENETİK KONTROL

Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerde gerçekleşir. Somatik Sertoli hücreleri hayat boyu sperm üretimi için gerekli mikroçevreyi oluşturur. Spermatogenez genetik olarak sıkı bir şekilde denetlenir. Spermatogenezin temel özellikleri tüm memelilerde aynıdır[36]. Fare ve insan spermatogenezini yakın benzerlik gösterdiği için farelerde yapılan çalışmalarla insan spermatogenezini daha iyi anlaşılmıştır. Leydig hücrelerindeki steroid sentezi de spermatogenezde kritik rol oynar[37].

2.5.1. Spermatogenezin Önemli Fazları

Spermatogenez kompleks bir olaydır ve üç kısımda incelenebilir:

1. Proliferatif faz: Olgun gametler oluşur.
2. Mayotik faz: Germ hücreleri bölünür ve haploid spermatidler oluşur.
3. Spermioyogenez fazı: Olgun spermatozoa oluşur.

Stem hücreler mitoz ile çoğalarak A tipi spermatogonyumlar olarak adlandırılan kök hücreleri ya da primer spermatositlere farklılaşan B tipi spermatogonyumları oluşturur[38]. Primer spermatositler diploid hücrelerdir ve birinci mayoz bölünme sonrası sekonder spermatositlere (haploid) dönüşür. Sekonder spermatositler de ikinci mayoz bölünme sonrası yuvarlak spermatidlere (haploid) dönüşür[39]. Spermiyogenezde ise spermatidler uzayarak elongated (uzamış) spermatid halini alır. Akrozom oluşumu, nükleus yoğunlaşması, kuyruk gelişimi ve sitoplazma kaybını takiben olgun spermatozoa oluşur[40].

2.5.2. Spermatogenezi Regüle Eden Genler

Bu başlık altındaki genler üç kriteri karşılamalıdır:

1. Endokrin bir eksiklik olmadan germ hücreleri üzerinde primer etkisinin olması
2. Spermatogenez üzerinde tanımlanmış bir morfolojik etkisi olması
3. Farelerde de bildirilmiş olması[37]

Spermatogenezi kontrol eden genler üç kısımda incelenir (Şekil 2);

- ✓ Primordial germ hücreleri üzerine etkisi olanlar
- ✓ Spermatogenezin ilerlemesi üzerine etkili olanlar
- ✓ Spermiyogenez üzerine etkili olanlar

2.5.2.1. Primordial germ Hücrelerini/Gonositleri Regüle Eden Genler

Primordial germ hücrelerinin ekstraembriyonel yolk salktan gonadal kabarıntıya göç ederken sayıları artar[41]. Seminifer kordların dışında primordial germ hücreleri gonositler olarak adlandırılır. Bu aşamadaki gen mutasyonları neonatal testislerde spermatogenetik hücreleri ortadan kaldırır[37]. Bu mutasyonlar; *An(Hertwig's anemi)*, *At(atricosis)*, *Sl(steel)*, *W(dominant spotting)* şeklindedir[42].

2.5.2.2. Spermatogenezin İlerlemesi Üzerine Etkili Olan Genler

Fl(Flipper arm): Spermatogenezi 7. basamaktan sonra etkiler. Mutasyonu sonucu elonge spermatidlerin yalnızca %50'si izlenir[42].

Hst-1(Hibrid Sterilite): Mutasyonu ile spermatogenez pakiten spermatosit evresinde bloke olur[42].

Jsd(Juvenil spermatogonial depletion): Mutasyonunda seminifer túbüllerde yalnızca sertoli hücreleri ve spermatogonya izlenir[43].

Sks(skeletal fusion with sterility): Mutasyonu sonucu yalnızca pakiten veya leptoten hücreleri izlenir. Spermatogenez bu aşamadan ileri gitmez[44].

Spy(Spermatogenesis gene on Y chromosome): Y kromozom sentromerinin yakınında bulunur. Normal spermatogenez için gerekli olduğu düşünülmektedir[45].

2.5.2.3. Spermiyogenez Üzerine Etkili Genler

Azh(abnormal spermatozoon head shape): Mutasyonu sonucu sperm başları anormal şekillenir. Flajellalar normaldir[46].

Bs(blind sterile): Mutasyonunda testiste normal germinal epitelyum, SCO veya hipoplastik germinal epitelyum görülebilir. Flajellum normaldir[42].

C(Albino): Spermiyogenez 13. basamakta bozular. Flajella izlenmez. Spermatozoanın hareketliliği azalmıştır[47].

Hop(Hop-sterile): Mutasyon varlığında spermatozoonlarda flajella izlenmez, varsa anormal yapıdadır[42].

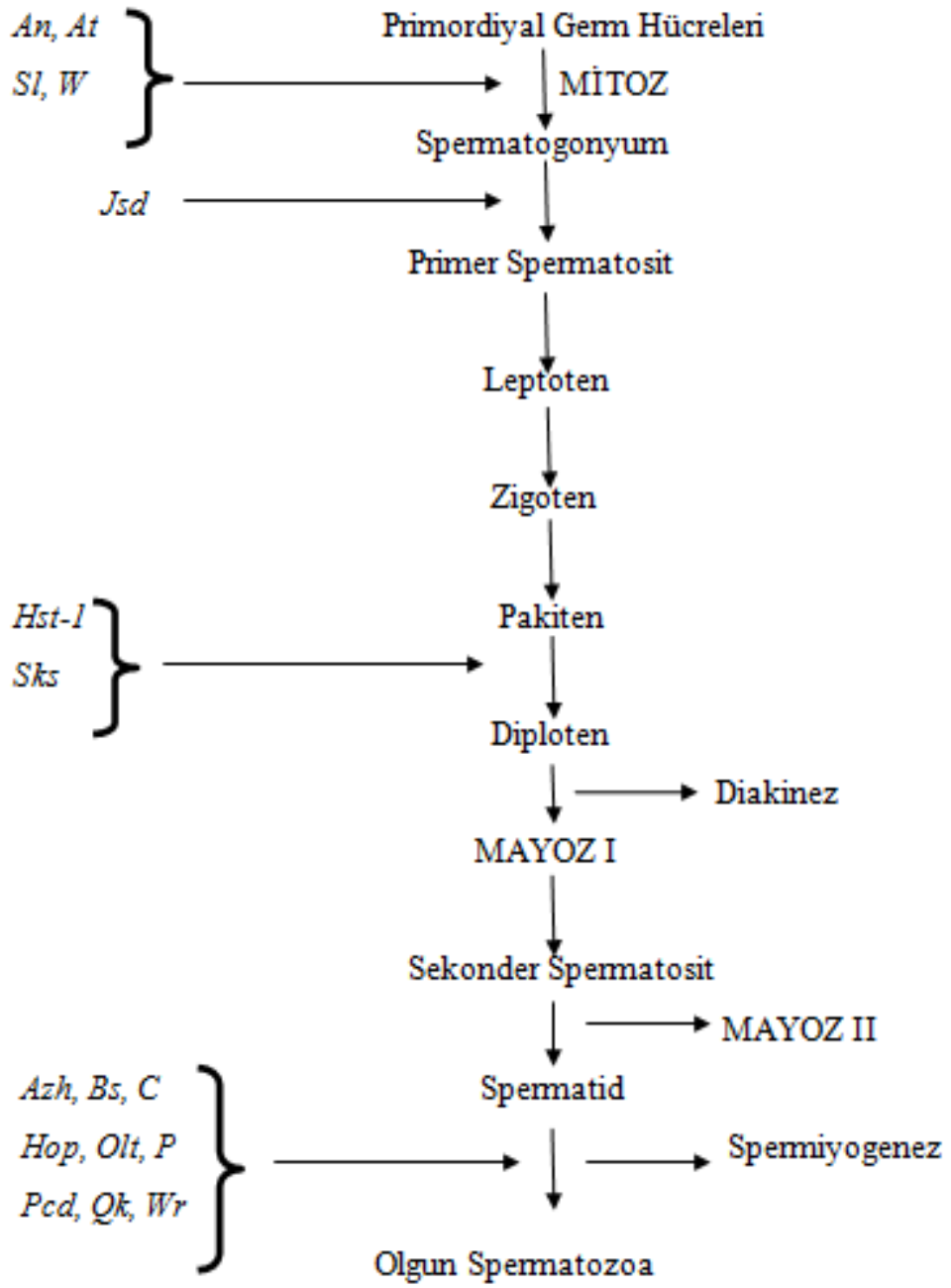
Olt(Oligotriche): Mutasyonunda flajella tümüyle kaybolur. Spermatogenez ve testiküler steroidegenез normaldir[48].

P(Pink-eyed dilution): Mutasyonunda spermiyogenezin erken evresinde akrozom formasyonu engellenir. Bu nedenle spermatozoa başları uygun şekilde gelişmez[49].

Pcd(Purkinje cell degeneration): Mutasyonu spermatid farklılaşmasını bozar. Geç spermiyogenez evresinde sperm başı anomalilerine neden olur[50].

Qk(Quaking): Mutasyon varlığında spermiyogenez kadar normal spermatogenez izlenir. Ancak sonrasında flajellada disorganizasyon izlenir[51].

Wr(wobbler): Spermiyogenez direkt etkilidir. Mutasyonunda erken spermatid döneminde golgi proakrozomal granülleri üretmez. Kromatin kondenzasyonu etkilenmez. Flajellum defekti %5 olguda izlenir[49].



Şekil 2: Spermatogenez kontrol eden genler ve etki yerleri.

2.6 Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri

Semen kalitesini ölçen testler infertilitenin heterojen bir doğasının olduğunu göstermektedir. Sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi tümüyle normal sınırlarda olmasına rağmen, bebek sahibi olamayan ve idiyopatik kabul edilen olgularda gametogenez ve fertilizasyonun genetik regülasyondaki sapmaların önemli yeri vardır[52-53]. Tiepolo ve Zuffardi, 1976'da ilk kez Y kromozom uzun kolundaki (Yq) mikrolelesyonlar ile spermatogenetik bozukluk arasındaki ilişkiyi gösterdi[54]. Daha sonra yapılan genetik araştırmalar infertil olgulara yaklaşımı şekillendirmiştir.

Spermatogenez, mayoz ve mitoz hücre bölünmesi ve sperm geçişini düzenleyen birçok gen ve sinyal yolağıyla kontrol edilmektedir[55]. Azoospermik erkeklerin yaklaşık %29'unda genetik bozukluklar görülebilir[56]. Toplumlar arasında farklılıklar olmasına rağmen karyotip anomalileri azoospermik olgularda %10-15, oligozoospermiklerde %4-5 ve normozoospermiklerde %1 oranında saptanmıştır[15]. Yq'deki mikrolelesyon oranları ise azoospermik olgularda %13 ve oligozoospermiklerde %3-7 olarak bulunmuştur[16].

Azoospermik erkeklerde çoğunlukla sayısal kromozomal anomaliler gözlenirken, oligozoospermiklerde genellikle yapısal anomaliler gözlenmektedir[57]. Türkiye'de 1214 NOA ve 721 şiddetli oligoastenoteratozoospermik (OAT) infertil erkeğin dahil edildiği bir çalışmada sitogenetik anomali sıklığı NOA erkeklerde %16,4, şiddetli OAT'li erkeklerde %5,8 olarak saptanmıştır[58].

Erkek infertilitesine yol açan kromozom anomalileri sayısal, yapısal ve Y kromozomu ve otozomal kromozom anomalileri şeklinde sınıflandırılabilir[59-60]. CFTR gen mutasyonları, X kromozomu üzerinde bulunan bazı genlerde görülen bozukluklar, sperm mitokondriyal DNA defektleri ve epigenetik faktörler de erkek infertilitesinde rol alan diğer etkenler arasındadır[55].

2.6.1. Sayısal Kromozom Anomalileri

Klinefelter Sendromu

Toplumda görülme sıklığı 500 erkek doğumda birdir. Erkek hipogonadizminin ve erkek infertilitesinin en sık görülen nedenlerindedir[61]. Olguların %80'inde konjenital sayısal kromozomal aberasyon (47,XXY) sorumlu iken, %20 olguda 46,XY/47,XXY mozaizmi veya 48XXYY gibi bir ya da daha fazla Y kromozomu görülür.

Sayısal aberasyonlar ebeveynlerdeki germ hücre oluşumu sırasında ortaya çıkan mayotik bölünmede ayrılmama (non-disjunction) nedeni ile oluşmaktadır[62]. İleri maternal yaş sorumlu tutulmasına rağmen, neden tam olarak ortaya konulamamıştır[61]. Bu oğuların doğumlarında testislerinde primordial germ hücreleri bulunmasına rağmen, bu hücreler hızla dejenere olur ve puberte yaşlarında ya hiç kalmaz ya da çok az miktarda kalır[63]. Spermatogenezin de bulunmaması ile testisler çok küçük kalır ve değişik oranlarda androjen eksikliği bulguları ortaya çıkar[64].

Klinefelter olguları puberte zamanına kadar genellikle tanınmadan gelebilirken, pubertede kendini Leydig hücre yetmezliği ile gösterebilir[65]. Puberte öncesinde inmemiş testis, yaş grubuna göre daha küçük testisler ve daha uzun bacak ve kollar gibi bazı fiziksel anomaliler görülebilir. Adölesan yaşta ise küçük testisler, infertilite ve androjen eksikliği belirtileri vardır[66]. Testis volümleri 1-3 ml arasında olup nadiren 4 ml üzerine çıkar. Olguların %60'ında penis boyutları normal sınırlardadır[67]. Klinefelter sendromunda birçok organ sisteminde morbidite ve mortalitenin artmış olduğu görülmektedir[68-69].

47, XYY Erkekler

Bin canlı erkek doğumda bir görülür. Erkekte mayoz II esnasında Y kromozomundaki ayrılmama nedeniyle oluşur. Bu olgular genellikle fertildirler[70].

45,X/46,XY Mozaizmi

İlk kez 1963 yılında Sohval tarafından tanımlanan bu sendromda 45,X hücre hattının yanısıra, normal veya anormal Y kromozomu taşıyan 46,XY hücre hattı da tespit edilmiştir[71]. Normal fenotipe sahip azospermik erkeklerde bu mozaizm, Y kromozom delesyonları/mikrodelesyonları ile sıklıkla birlikte görülmektedir[72-73].

2.6.2 Yapısal Kromozomal Anomaliler

Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar ve marker kromozomlar infertil erkeklerde en sık rastlanan yapısal kromozomal bozukluklardır[74]. Marker kromozomları fertil erkeklere göre infertillerde sekiz kat daha sık görülmektedir[75].

Robertsonian Translokasyonlar

İki akrosentrik kromozomun (13,14,15,21 ve 22) kısa kollarının kaybı ve uzun kollarının sentromer bölgesinin yakınlarında birleşmesi sonucu oluşmaktadır[76]. Robertsonian translokasyonları 13;14 ve 14;21 numaralı kromozomlar arasında daha sık görülmektedir[77]. Bu olguların kromozom sayıları 45'tir[78]. Oligozoospermik erkeklerde görülme sıklığı %1,5 iken, azoospermiklerde %0,2 olarak bildirilmiştir[79]. İnterkromozomal etkiye bağlı spermatogenezin etkilendiği düşünülmektedir[80].

Resiprokal Translokasyonlar

Homolog olmayan kromozomlar (otozomal kromozomlar veya cinsiyet kromozomları) arasında meydana gelen karşılıklı parça değişimi sonrasında oluşmaktadır[80]. Yenidoğanda görülme sıklığı %0,1'dir. Oligozoospermik erkeklerde, azoospermiklere ve genel popülasyona göre daha sık görülür[81]. Bu tip translokasyonlar mayozun bozulması sonucu spermatogenez sırasında maturasyon duraklamasına ve dengesiz gamet oluşumuna yol açmaktadır[74].

46,XX Male Sendromu

46,XX Cinsiyet Gelişiminin Testiküler Bozukluğu (46,XX Testicular DSD, 46,XX Erkek Sendromu) infertil erkeklerde nadir görülmektedir[82]. XX erkekler, dişi karyotipi gösterirler, ancak fenotipik olarak erkektirler. Dişi genital taşımazlar[83]. Bu genetik bozukluğun prevalansı 1:10.000-1:20.000 arasındadır. Rekombinasyon sırasında SRY, X kromozomuna yapıştığı için gonadlar testise dönüşür ancak azoospermi faktör (AZF) genleri Y kromozomu üzerinde kalacağı için XX erkekler azoospermiktir ve infertildir[84]. Klinik olarak Klinefelterli olgulara benzerler[85].

İnversiyonlar

Mayozda homolog kromozomların eşleşmesi sırasında delesyon ve duplikasyon oluşumuna yol açarak germ hücre arresti veya yüksek oranda anoploid sperm hücrelerinin oluşumuna sebep olmaktadır[86]. 1, 3, 5, 6, ve 10 numaralı kromozomlarda ortaya çıkan inversiyonların sperm üretim kapasitesini %1-54 oranında azaltarak infertiliteye yol açtığı gösterilmiştir[79].

2.6.3. Y Kromozomu Yapısal Bozuklukları

İzodisentrik Y Kromozomları

Spermatogenez esnasında Y kromozomunda karşı kollar arasındaki anormal crossing-over sonucunda iki sentromerli izodisentrik (idic) Y kromozomu oluşur[87]. Hücre bölünmesi sırasında bu kromozomlar sıklıkla stabil olmadığından kromozomal mozaizm gerçekleşir. Birleşim yerlerine göre iki şekilde sınıflanırlar:

1. **idicYq kromozomu:** Y kromozomunun kısa kollarının kırılması ve uzun kollarının sentromer bölgesinde birleşmesi
2. **idicYp kromozomu:** Y kromozomunun uzun kollarının kırılması ve kısa kollarının sentromer bölgesinde birleşmesi sonucunda meydana gelir[88]. Bu kırılma AZF bölgesini içerebilir ve bu bölgede delesyona veya yeniden şekillenmeye neden olabilir. Bu olgularda çeşitli düzeylerde spermatojenik yetmezlik izlenebilir[89-90].

Y Kromozomu Mikrodelesyonları

Y kromozom mikrodelesyonları azosperminin en yaygın nedenlerinden biridir[91]. Yq distal bölümü üzerinde bulunan AZF bölgesi sperm gelişimi ve farklılaşmadan sorumludur[92]. AZF gen bölgesi delesyonu için tarama endikasyonları sperm sayısına göre konulmaktadır ve azospermik veya şiddetli oligozoospermik hastalar bu endikasyonu oluşturmaktadır[93].

Yq üzerinde birçok gen tanımlanmıştır ve delesyonları sıklıkla NOA'lı erkeklerde izlenir[94]. Delesyona uğrayan bölgeler submikroskopik olmaları nedeni ile mikrodelesyon olarak adlandırılmıştır. Etnik kökene bağlı prevalans değişiklik göstermektedir[95]. En iyi tanımlanmış gen olan DAZ (Deleted in azospermia) geni çoklu kopyaya sahiptir. İlk defa Rejio ve ark. tarafından tanımlanmış ve azospermik erkeklerde kayıp olduğu gösterilmiştir[96]. Azospermik erkeklerin %13'ünde, şiddetli oligozoospermiklerin ise %6'sında DAZ delesyonu izlenmektedir[96]. Sonraları Vogt ve ark. şiddetli erkek infertilitesinde Yq üzerinde AZFa, AZFb ve AZFc olarak birbirinden görece olarak ayrı bölgeler tanımlamışlardır[97].

Babadan oğula spontan AZFc delesyonu geçişi tanımlanmıştır[98]. Bu nedenle ÜYT uygulanacak hastalara tedavi öncesinde genetik danışmanlık verilmelidir[99].

AZF bölgesi delesyonlarının %69'u AZFc, %6'sı AZFa ve %14 AZFb bölgesinde görülmektedir. Kalan kısım ise bu bölgelerin kombine delesyonları şeklindedir[100]. AZFc bölgesi içinde ek bir AZFd bölgesi tanımlanmıştır, ancak prognostik önemi yoktur[101]. AZFc delesyonu olan erkeklerin 2/3'ünün ejakulatında az da olsa sperm bulunabilmektedir[102]. AZFc delesyonu olan azoospermik olgularda testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) işlemi ile %58-75 oranında sperm bulunabilmektedir[103]. AZFb delesyonu olan erkeklerde ejakulatta veya TESE ile sperm bulma şansı ciddi oranda düşüktür[104]. AZFb delesyonlarında genellikle azoospermi ile birlikte testiste parsiyel mayotik arrest ve nadiren de "elongated" spermatid görülür. Bu nedenle tam AZFb delesyonu varlığında TESE işlemi yapılmamalıdır[105]. AZFa bölgesinin tamamını içeren delesyon varlığında testis biyopsisinde "Sertoli Cell Only" (SCO) sendromu görülür. Testis biyopsisinde NOA ve SCO sendromu paterni gösteren erkeklerin %9-10 kadarında ise AZFa delesyonu izlenir[106].

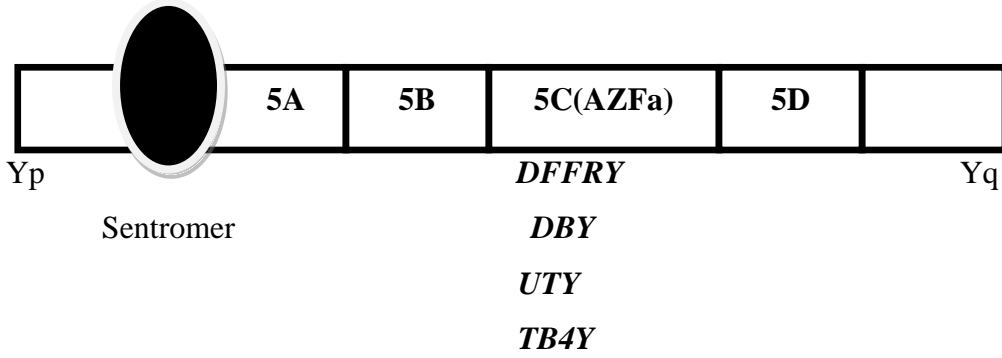
AZFa Bölgesi

Y kromozomu uzun kolunun proksimalinde (Yq11.21), 5B ile 5O arasında yer alan AZFa bölgesi 792 kb büyüklüğündedir. Tekrarlayan diziler içermez ve AZFb ve c delesyonlarına göre daha az görülür[107-109]. Dört adet gen içerir (şekil 3):

1. **DDFRY**: *USP9Y* olarak bilinir. "Drosophila developmental gene fat facets" ile homoloji gösterdiği için önceleri *DDFRY* olarak adlandırılmıştır. X kromozomunda homoloğu bulunmaktadır. Ubikitin spesifik hidrolazı kodlar ve ubikitine bağlı protein yıkımından sorumludur. Delesyonunda spermatositik arrest görülür[107-108].
2. **DBY (Dead/H box-3, Y-linked)**: Bu genin ürünü ATP-bağımlı RNA helikazdır ve bu bir dead-box motif içeren bir proteindir. *DBY* delesyonlarında SCO veya ağır hipospermatogenez izlenmektedir. *DBX* proteini eksik olan bir farede hücre siklusunun G1 fazında duraklama söz konusudur. *DBY* proteini pre-mayotik fazda yani spermatogonyumlarda fonksiyonel iken, *DBX* proteinleri mayozdan sonraki spermatid aşamasında etkilidir. *DBX* proteini erkek beyninde, böbrekte

ve dişi over dokusunda mevcut iken, *DBY* proteini sadece testis dokusunda görülmektedir.

3. ***UTY (Ubiquitous TPR motif on Y)***: Subinterval 5C'de yer alan 20 ekzonlu bir genidir. TPR (tetratricopeptide repeat) motifli bir protein kodlamaktadır. X kromozomunda homoloğu vardır. Bu proteinin, protein-protein etkileşimini düzenlediği düşünülmektedir[107-109].
4. ***TB4Y (Thymosin, beta-4, Y chromosome)***: X kromozomu üzerinde yer alan X inaktivasyonundan etkilenmeyen bir homoloğu (*TB1X*) mevcuttur. Testise özel transkriptleri bulunmaktadır. Aktinin salgılanmasında rol alan tyimosin B4'ün Y izoformunu kodlar[107-109].



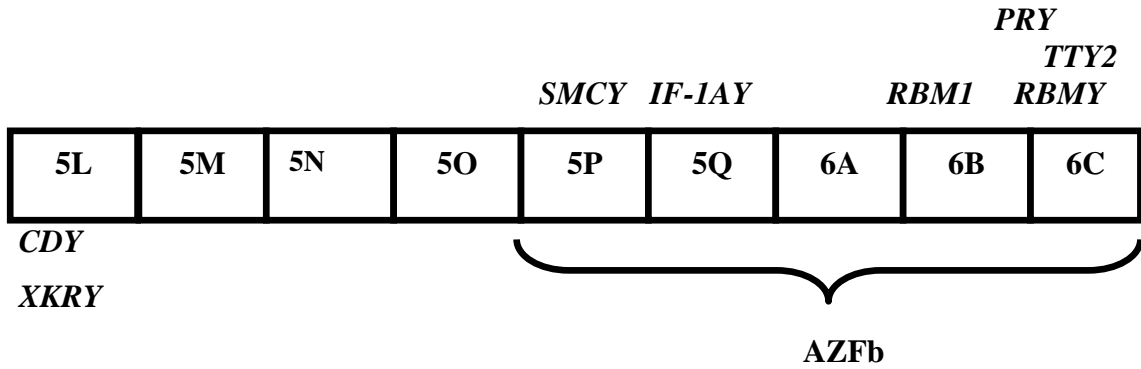
Şekil 3: AZFa aralığının haritası

AZFb Bölgesi

Bu bölgenin delesyonları sonucunda testiküler sperm yokluğu görülmektedir. Bu aralıkta, *IF1AY*, *RBM1*, *CDY1*, *XKRY* ve *SMYC* olarak adlandırılan 5 gen tanımlanmıştır (Şekil 4)[109-110].

1. ***IF-1AY (Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y isoform)***: Spermatogenezdeki rolü henüz bilinmemektedir[109-110].
2. ***RBM1(RNA binding motif protein)***: Bu genlerin delesyonunda azoospermi ve oligozoospermi ortaya çıkmaktadır. *RBM1* ve *RBM2* formları vardır. İnsan testisinde mevcuttur ve testise özeldir. Bozukluğunda germ hücrelerin mayotik arreste uğradığı görülmüştür[107-108].

3. **CDY1 (Chromodomain protein on Y):** Erişkin testisinde mevcuttur. Kodladığı protein olasılıkla heterokromatin ile etkileşerek DNA ya da kromozomal proteinleri değiştirmektedir[107-108].
4. **XKRY (XK-related Y):** Erişkin testisinde mevcuttur. Bir membran transport proteini olan XK'ya benzer bir proteini kodlamaktadır[107-108].
5. **SMYC (Selected Mouse cDNA on the Y):** Biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir[111-112].



Şekil 4: AZFb aralığının şematik haritası

AZFc Bölgesi

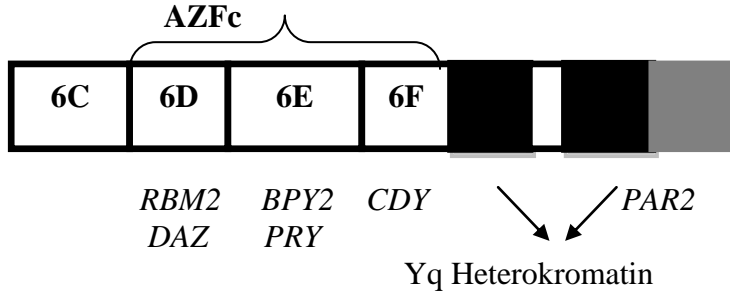
En sık delesyona uğrayan ve üzerinde en fazla çalışılan bölgelerden biridir. Bu bölgede tümü testise özel 12 gen ailesi ve toplamda 32 gen kopyası bulunmaktadır[113]. *DAZ* gen grubunu, *PRY*, *BPY2*, *TTY2*, *CDY*, *RBM* ve diğer genlerin kopyalarını içerir (şekil 5)[107-108].

1. **DAZ geni:** *DAZ* genlerinin ürünü olan *DAZ* proteinleri, germ hücre epitelinde geç spermatid döneminde testise özgü mRNA'ların depolanma ve taşınmasını kontrol ederler. Delesyonların en sık görüldüğü bölgedir. Bu bölgenin mutasyonları sonucu pakiten 1 safhasında mayotik arrest ve delesyonları sonucu azoospermi ya da %6 oranında oligozoospermi de görülebilmektedir. Oligozoospermik olgulardaki *DAZ* gen delesyonları erkek çocuğa geçebilmektedir[107-108].

2. **BPY2 (basic protein on Y):** Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir[107-108].

3. *PRY* (*PTP-BL related protein on Y*) ve *TTY2* (*Testis transcript on Y*): Sadece testiste ifade edilmektedir ve tirozin fosfatazın kodlanmasından sorumludurlar[107-108].

4. *CDY1* (*Chrodomain protein, Y chromosome,1*): Görevi net bilinmemektedir[107-108].



Şekil 5: AZFc aralığının şematik haritası

AZFc Bölgesindeki Subdelesyonlar

İlk kez 2003'te Repping ve ark. tarafından AZFc bölgesinde gr/gr, b1/b3 ve b2/b3 subdelesyonları tanımlanmıştır[114]. En yaygın tip gr/gr subdelesyonudur. Tanımlanan bu küçük delesyonların patolojik bir durum mu veya normalin varyasyonu mu (polimorfizm) olduğu henüz net olarak açıklanamamıştır[114]. İnfertil erkeklerin yanı sıra normal sperm konsantrasyonu olan erkeklerde de gr/gr delesyonları rapor edilmiştir[115].

gr/gr subdelesyonunda *DAZ* geninin 2 kopyası (*DAZ1/DAZ2*), *CDY1*'in bir kopyası (*CDY1a*) ve *BPY2* geninin bir kopyası silinmiştir[114]. AZFc bölgesinde yerleşik *DAZ* ve *CDY1* genlerinin fertilité açısından en önemli genler olduğu düşünülmektedir[116]. Farklı delesyon kombinasyonları olabilmektedir. Bunların dışında nadir delesyon paternleri de izlenmiştir. Bu da AZFc bölgesindeki yüksek polimorfizme işaret etmektedir[117-118].

AZFd Bölgesi

AZFd bölgesinde delesyon bulunan olgular, hafif oligozoospermi ya da normal sperm sayısına rağmen anormal sperm morfolojisi ile ortaya çıkabilmektedir[119].

Y Kromozomu Mikrodelesyonlarının Klinik Önemi

- ✓ Normozoospermik erkeklerde Y mikrodelesyon ve spermatojenik yetersizlik arasında neden-sonuç ilişkisi açıkça ortaya konulmuştur[109]
- ✓ Delesyonlar sperm konsantrasyonu >5 milyon spermatozoa/ml varlığında son derece nadirdir (%0,7)[120].
- ✓ AZFb bölgesinin tam olarak delesyonu spermatojenik duraklama ile ilişkili iken, AZFa bölgesinin tam delesyonu difüz tip SCO sendromu ile ilişkilidir. AZFc bölgesi tam delesyonu ise azoo-/oligozoospermi arasında değişen bir fenotipe neden olur[121].
- ✓ Klasik AZF delesyonları kriptoorşidizm veya testis kanseri için bir risk oluşturmamaktadır[122].
- ✓ Konsepsiyon sonrası Y delesyonu erkek bebeğe doğrudan aktarılması nedeni ile genetik danışmanlık verilmelidir. Çoğu olgularda baba ve oğul aynı delesyonu taşımaktadır[123-124].
- ✓ Tam AZFc delesyonu olan erkeklerin spermlerinin önemli oranında seks kromozomu açısından nullizomik olduğu ve bu durumun Turner sendromu ve ambigus genitalya da dahil olmak üzere seks kromozom mozaizmi ile ilişkili diğer fenotipik anomalilerin gelişmesi için potansiyel risk oluşturduğu bilinmelidir[125-126].

2.6.4 X Kromozomuna Bağlı Bozukluklar

X kromozomu üzerinde yer alan *TEX11* (Xq13.1) ve *TAF7L* (Xq22.1) genleri sinaps oluşumu ve krossing-over olayının düzenlenmesinde önemli rol almaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonların, segregasyon bozukluklarına ve azoospermiye neden olduğu bildirilmiştir[55].

Androjen reseptörü (AR) geni, Xq11.2-12'de yer almaktadır. AR geninde meydana gelen mutasyonlar 46,XX infertil kadın ve 46,XY azoospermik erkek fenotiplerine neden olmaktadır[127-128]. Ayrıca AR geninde ekzon 1'de Sitozin/Adenin/Guanin (CAG)_n ve Guanin/Guanin/Sitozin (GGC)_n olmak üzere polimorfizm gösteren iki tekrar dizisi bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda CAG tekrar dizisi uzunluğu ile erkek infertilitesi arasında negatif bir ilişki olduğu tespit edilirken diğer çalışmalarda böyle bir ilişkiye rastlanmamıştır[129-130].

Hipogonadizm ile seyreden Kallman Sendromu 30.000 doğumda bir görülen infertilite nedenlerinden biridir. Olguların yaklaşık %11'i X kromozomuna bağlı gen mutasyonu gösterirken, diğerleri otozomal kalıtım şekli göstermektedir[131]. Erken embriyonik dönemde X kromozomu üzerinde *KAL-1* (Xp22.3) genindeki delesyonun neden olduğu Kallman sendromu, hipogonadotropik hipogonadizm ile karakterizedir[132]. Spermatogenez hormonal tedavi ile kolayca başlatılabilirse de öncesinde genetik tarama mutlaka yapılmalıdır[133].

2.6.5. Otozomal Kromozomlardaki Yapısal Abnormaliteler

Otozomal kromozomların yapısal anomalileri (1-22 kromozom çiftleri) erkek infertilitesine neden olabilir. İnfertil erkeklerdeki prevalansı %1-2 arasındadır. Dengeli otozomal kromozomlara ait anomaliler kromozomların mayozdaki eşleşmelerini bozarak spermatogenezi olumsuz etkileyebilir[134].

2.6.6. Kistik Fibroz Transmembran Düzenleyici (*CFTR*) Gen Mutasyonları

Kistik Fibroz otozomal resesif bir hastalıktır. *CFTR* genindeki (7q31.20) mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Olguların %90'ı konjenital bilateral vaz deferens agenezine (CBAVD) bağlı olarak OA'dır[135]. Beyaz ırkta en yaygın görülen genetik hastalıktır; beyaz ırkın %4'ü *CFTR* gen mutasyon taşıyıcısıdır. *CFTR* geni iyon kanalı olarak görev yapan ve ejakulatuar kanal, seminal vezikül, vaz deferens ve epididimin distal 2/3'ünün formasyonunu etkileyen bir membran proteinini kodlamaktadır [136].

Vaz deferensin tek taraflı agenezi genellikle aynı taraf böbreğin yokluğu ile birlikte ve olasılıkla değişik genetik bir nedene dayanmaktadır[137-138]. Olguların kadın partnerlerinde de *CFTR* mutasyonu araştırılmalı ve ÜYT öncesinde genetik danışmanlık verilmelidir[17].

2.6.7. Mitokondriyal DNA Bozuklukları

Sperm mitokondrisi spermatogenez ve sperm hareketliliği için gerekli enerjiyi sağlar. Artan yaş ve oksidatif strese bağlı olarak spermde mitokondriyal DNA delesyonları artmaktadır. Azoospermik erkeklerde mitokondriyal DNA delesyon oranının fertillere göre arttığı tespit edilmiştir[139].

3. OLGULAR VE YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (KAEK) 29.12.2011 tarih ve 2011/484 nolu kararı ile etik uygunluğu onaylanan çalışma (Ek 1), OMÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji ve Androloji polikliniği ile Tüp Bebek Merkezi'nde 2008-2012 yılları arasında infertilite tanısı konulmuş, NOA ve şiddetli oligozoospermi (sperm konsantrasyonu <5 milyon spermatozoa/ml) nedeniyle sitogenetik ve Y kromozom mikrodelyasyon analizi yapılmış 390 ve kontrol grubu olarak 65'i çocuk sahibi toplam 87 normozoospermik olguyu kapsamıştır. Araştırma OMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 02.07.2012 tarih ve PYO.TIP.1904.12.034 kod numaralı kararı ile parasal olarak desteklenmiştir(Ek 2).

3.1. Olgular ve Kontrol Grubu

Olguların kısırlık, çocukluk çağı, cinsel, tıbbi, cerrahi ve aile öyküleri ile genel vücut görünümü, sekonder seks karakterleri, skrotum, testis volümleri, vaz deferensler ve epididimleri içeren fizik muayene bulguları hasta dosyalarından retrospektif olarak elde edildi. Tüm olguların testis volümleri Prader orşidometrisi ile ölçüldü. Semen analizleri DSÖ'nün 1999 ve 2010 kılavuzlarına göre yapıldı[35].

Anormal semen analizi olan olgularda bir ay ara ile ikinci bir semen analizi yapıldı. Hormonal inceleme için serum örnekleri saat 07-11 arasında alındı. Serum FSH ve TT düzeyleri ile gerektiğinde LH, PRL ve E2 düzeyleri OMÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında radyoimmunoassay (RIA) ile ölçüldü.

Sperm sayısı <5 milyon/ml olan olgular şiddetli oligozoospermik, semen analizinde pellet testi ile sperm saptanamayan olgular azoospermik olarak değerlendirildi. Semen analizinde oligozoospermi ile birlikte motilite (asthenozoospermi) ve morfoloji (teratozoospermi) bozuklukları olan olgular oligoasthenoteratozoospermi (OAT) olarak gruplandırıldı. Normal serum FSH düzeyi, fizik bakıda tek veya bilateral vaz deferens yokluğu, cerrahi eksplorasyonda epididimal obstrüksiyon saptanmış olanlar, asidik semen pH'sı ve semende früktoz bulunmayanlar ile birlikte düşük ejakulat volümü bulunan olgular obstrüktif azoospermi (OA) olarak değerlendirildi.

Kontrol grubu oluşturulurken önceki araştırmalarda fertil popülasyonda AZFc subdelesyon oranının %5 olduğu göz önünde bulunduruldu[19]. Buna göre kontrol grubu için %95 güven aralığında %80 güç ile en az 55 fertil erkek olgunun yeterli olacağı hesaplandı. Kontrol grubu olarak OMÜTF Hastanesi'nde çalışan en az bir yaşayan çocuğu olan normozoospermik 65 ve semen analizi normal sınırlarda bulunan 22 sağlıklı toplam 87 erkek seçildi.

Karyotip analizi Klinefelter ile uyumlu 22, fizik muayene ve hormon bulguları hipogonadotropik hipogonadizm ile uyumlu 12 ve obstrüktif azospermik 23 olgu çalışma dışında bırakıldı.

ÜYT uygulanan olgularda mikro-TESE ile sperm bulunanlar, ICSI sonrası embriyo gelişimi olanlar, gebelik elde edilenler ve testis histopatolojik verileri hastane kayıtlarından retrospektif olarak elde edildi.

Genetik inceleme için tüm olgulardan aydınlatılmış onam alındı (Ek 3). Her olgudan beş ml venöz kan EDTA'lı tüplere alınarak saklandı. Y kromozomu AZFc bölgesi üzerindeki subdelesyonlar OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarında Sin ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem ile çalışıldı[140]. Y kromozomunun AZFc bölgesindeki gr/gr ve b2/b3 subdelesyon analizi için sY1191 ve sY1291 markerları Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile genotiplendirilip agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü.

gr/gr delesyonu için sY1291 yokluğu ile birlikte sY1191 varlığı olması kabul edilirken, b2/b3 delesyonu için sY1191 yokluğu ile birlikte sY1291 varlığı olması kabul edildi[113].

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3.2.1. Cihazlar

- ✓ Termal döngü cihazı (Biolab, İngiltere, ABI/PRISM Applied Biosystems, U.S.A)
- ✓ Yatay elektroforez sistemi (Scie-Plas, İngiltere)
- ✓ Elektroforez güç kaynağı (Waaltec, Tayvan)
- ✓ UV transillumunator (Vilber Laurmat, Fransa)
- ✓ UV görüntü analiz sistemi (Biolab, İngiltere)
- ✓ Soğutmalı santrifüj (Nüve, Türkiye)
- ✓ Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich, Almanya)
- ✓ Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- ✓ Hassas terazi (Mettler AJ 100, Almanya)
- ✓ pH metre (Hanna, Almanya)
- ✓ Pastör fırını (Heraus, Almanya)
- ✓ Isıtıcı (Hotplate, Almanya)
- ✓ Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya; Capp, Danimarka)
- ✓ Vorteks (Nüve, Türkiye)
- ✓ Etüv (Dedeoğlu, Türkiye)
- ✓ İnkübasyon cihazı (Innogenetics, Avusturya)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

- ✓ Agaroz (Sigma)
- ✓ Sükroz (Merck)
- ✓ Tris (Merck)
- ✓ EDTA, sodyum tuzu (Merck)
- ✓ SDS, Sodyumdodesilsülfat (Sigma)
- ✓ Etil alkol (Sigma)
- ✓ NaCl (Merck)
- ✓ Sodyum hidroksit (Merck)

- ✓ Magnezyum klorür (Merck)
- ✓ Borik asit (Sigma)
- ✓ Triton X-100 (Sigma)
- ✓ Etidyum bromür (Sigma)
- ✓ Proteinaz-K (Sigma)
- ✓ Taq DNA polimeraz enzimi (Promega ve Fermentas)
- ✓ Restriksiyon enzimleri (Takara ve Fermentas)
- ✓ 10 X PCR buffer (Bioron, Takara ve Fermentas)
- ✓ Deoksiribonükleosid trifosfatlar (dNTPs, Promega)
- ✓ PCR Primerleri (Iontek ve Fermentas)

3.3. Solüsyonların Hazırlanması

0.5M EDTA, pH 8.0:

18,61 g disodyum EDTA, 80 ml bidistile H₂O içinde çözüldü. Solüsyona 2 g NaOH tableti atılarak eritildi. pH 8'e ulaştığında bidistile H₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edilip oda ısısında saklandı.

Doymuş NaCl (6M) Solüsyonu

7 gr NaCl, 20 ml bidistile H₂O içinde çözüldü. Otoklavda steril edilip oda ısısında saklandı.

1M Tris pH 7.5

12,11 g Tris-bazı, 80 ml bidistile H₂O içinde çözüldü. pH HCl ile 7.5'a ayarlandı. Bidistile H₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edilip oda ısısında saklandı.

10X TBE (Stok solüsyon)

108 g Tris-bazı (0.9M) ve 55 g Borik asit (0.9M) 700 ml bidistile H₂O içinde çözüldü. 40 ml 0.5M EDTA eklendi. pH 8.0'e (20 mM) ayarlandı. Bidistile H₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

1X TBE (Çalışma solüsyonu)

100 ml 10X TBE stoktan, 900 ml bidistile H₂O eklenip hazırlandı.

Etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml)

1 g etidyum bromür, 10 ml bidistile H₂O içinde çözüldü. Işık almayan bir şişe içinde +4 °C'de saklandı. Stok solüsyondan, çalışma solüsyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

3.4. DNA İzolasyonu ve Kullanılan Solüsyon ve Tamponlar

Lizis Tamponu:

320 mM Sükroz (Merck), 10 mM Tris (Merck) pH 7.5, 4 mM MgCl₂ (Merck) ve %1 Triton X 100 (Sigma) distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı. Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklava alındı.

TEN tamponu :

10 mM Tris (Merck) pH 8, 2 mM EDTA (Merck) ve 400 mM NaCl (Merck) distile suyla 50 ml'ye tamamlandı. Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklava alındı.

Proteinaz K (Sigma) Solüsyonu

10 ml 500 mM'lık Tris (pH 8) solüsyonu içine 100 mM'lık CaCl₂'den 0.1 ml ilave edildi ve 100 mg proteinaz K solüsyona eklendi. Bu şekilde 10 mg/ml proteinaz K solüsyonları hazırlandı.

% 10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (Sigma)

10 gr SDS alınıp 100 ml distile su içinde çözüldü.

Doymuş NaCl Solüsyonu (6M)

7 gr tartılıp, distile su ile 20 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklava alındı.

%70 Etil alkol:

70 ml %99.5 etil alkol alınıp ve 30 ml bidistile H₂O eklendi ve -20 °C'de saklandı.

TE Solüsyonu

500 mM Tris pH 7.5 stok solüsyonundan 1 ml, 100 mM EDTA stok solüsyonundan 0.5 ml alınıp distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

DNA İzolasyonu

Birinci gün 5 ml EDTA'lı tam kanlar 50 ml'lik polipropilen tüplere döküldü. Kan örneklerinin üzerine, 15'er ml. lizis tamponu konularak kapakları kapatıldı ve 2-3 saniye kadar çalkalandı. Örnekler 2200 rpm'de, 4°C'de, 15 dakika santrifüj yapıldı. Tüpün üzerindeki süpernatant pastör pipeti ile atıldı. Lizis tamponu ile yapılan işlem iki kez daha tekrarlandı. Lizis tamponu ile son olarak yapılan üçüncü işlemde sonra, dipte kalan temiz çökelti üzerine 3'er ml TEN tamponu konularak, 2-3 saniye çalkalandı. Örneklerin üzerine 200'er µl %10'luk SDS ve 50'şer µl Proteinaz K ilave edilerek, tüpler elle çalkalanarak nazik bir şekilde karıştırıldı. Birinci gün işlemleri bu şekilde bitirildikten sonra 50 ml'lik propilen tüpler içerisindeki örnekler, bir gece, 37°C'deki inkübatörde hafif çalkalanarak inkübe edildi.

İkinci gün örneklerin üzerine 1'er ml 6 M'lık NaCl solüsyonundan konuldu ve 2-3 saniye vorteksledi. 2600-2700 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Üstteki süpernatantlar 15 ml'lik başka tüplere alındı, tekrar 3300 rpm'de oda ısısında 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar 15 ml'lik başka tüplere alındı. Her bir örnekte süpernatantın iki katı hacimde saf etil alkol ilave edilerek DNA çöktürüldü. Her bir örnek için elde edilen DNA'lar, pipet ucu ile alınarak, ayrı ayrı içlerinde 1'er ml % 70'lik etil alkol bulunan ependorf tüplerinin içine konuldu. İçlerinde DNA bulunan 1.5 ml.'lik tüpler, 10 dakika 13000 devirde santrifüj yapıldıktan sonra, üstteki alkol ince uçlu pastör pipeti ile çekilerek atıldı. Çöktürülen DNA, tüplerin ağzı açık bırakılarak 37°C'de etüvde 20 dakika bekletilerek alkolün uçarak tamamen uzaklaşması sağlandı. DNA örneklerinin üzerine 150'şer µl TE tamponu ilave edilerek ve tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 37°C'de etüvde çözünmesi için 2-3 saat bekletildi. Son olarak örnekler çözüldükten sonra, 10 µl stok DNA örneği, içinde 1 ml distile su bulunan 1.5 ml.'lik tüplere alındı. Karışım vorteksledikten sonra spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de optik yoğunluk ölçülerek DNA'nın miktarı ve saflığı tayin edildi. Elde edilen stok DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.5. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

DNA konsantrasyonu hesap edilirken her örnek için ayrı ayrı 990'ar µl saf su, daha önceden üzerleri etiketlenerek hazırlanmış 1.5 ml.'lik tüplere konuldu. Üzerlerine her örnekten ayrı ayrı 10'ar µl stok DNA eklendi. Örnekler vortekslendi. Örnekler santrifüjde 2-3 sn. döndürme işlemi yapıldı. Konsantrasyon ölçümü için 1 ml hacimli iki adet quartz tüp kullanıldı. Bunlardan kör olarak kullanılacak olan tüpe 1000 µl saf su, ikinci tüpe ise içerisinde 10 µl genomik DNA ve 990 µl saf su bulunan 1000 µl'lik karışım konuldu. DNA örneklerinin bulunduğu tüplerin, spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülen OD₂₆₀ değerleri kaydedildi. Daha sonra, elde edilen bu OD₂₆₀ değerlerine göre her örneğin DNA konsantrasyonu aşağıdaki formülle ayrı ayrı hesap edilerek kaydedildi.

$$\text{DNA Konsantrasyonu} = (\text{OD})_{260} \times \text{Sulandırma katsayısı (100)} \times 50 \mu\text{l/ml (çift zincirli DNA'lar için standart)}$$

Tablo III: Y kromozomu sY1191 ve sY1291 subdelesyon bölgelerinin primer dizileri

Subdelesyon	PRİMER	Amplikon boyutu
sY1191	Primer A: CCAGACGTTCTACCCTTTCG Primer B: GAGCCGAGATCCAGTTACCA	385 bp
sY1291	Primer A: TAAAAGGCAGAAGTCCAGG Primer B: GGGAGAAAAGTTCTGCAACG	527 bp

3.6. sY1191 ve sY1291 bölgelerinin Multipleks PZR Yöntemi ile

Genotiplenmesi

Y kromozomu AZFc bölgesi sY1191 ve sY1291 bölgelerinin iki çift primeri (Tablo III) kullanılarak multipleks PZR ile çoğaltıldı[140]. Amplifikasyon reaksiyonu 25 µl'lik toplam hacim içinde, 1x PZR tamponu, 2.0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, her primerden 1 µM, 200 ng genomik DNA ve 1,5 ünite Taq polimeraz (Promega, Madison, WI) eklenerek gerçekleştirildi. PZR reaksiyonları sırasında kontaminasyon olasılığını kontrol etmek için negatif kontroller kullanıldı. Çalışılan negatif kontroller içerisine reaksiyon karışımı konuldu, fakat DNA yerine 2 µl distile su eklendi. Her PZR'de delesyon olmayan bireye ait pozitif kontrol DNA'sı kullanıldı. İki ünite *Taq DNA polimeraz*, 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben eklendi. Amplifikasyon programı 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 61°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzatma olmak üzere 35 döngü olarak uygulandı. Son olarak 72°C'de 5 dakika son sentez basamakları uygulandı. Amplifikasyon reaksiyonu sonrasında oluşan ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışığı altında görüntülendi. Jelde 385 bp'lik bant görülmesi durumunda sY1191 bölgesi için pozitif, 527 bp'lik bant görülmesi durumunda ise sY1291 bölgesi için pozitif olarak kabul edildi. Delesyon gözlenmesi durumunda ise PZR en az üç kez tekrarlandı.

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

%2,0'lik agaroz jel hazırlamak için, 130 ml 1X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) ölçülüp bir erlenmayere aktarıldı ve 2,6 gram agaroz tartılarak TBE solüsyonuna ilave edildi. Erlenmayer içindeki heterojen karışım mikrodalgada şeffaf görünüm elde edilene kadar 30-45 sn'lik aralıklarla çalkalanarak kaynatıldı. Solüsyon dökülebilecek dereceye (yaklaşık 70-80 °C) kadar soğutulduktan sonra 0,5 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromürden 130 µl eklendi. Etidyum bromürün homojen yayılması için karışım çalkalandı. Daha sonra içerisine jel tarakları yerleştirilmiş yatay elektroforez jel aparatına döküldü ve jel polimerizasyona bırakıldı. Polimerize olmuş jelden taraklar uzaklaştırılarak jel yeterli miktarda elektroforez tamponu (1X TBE) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 6X jel yükleme tamponuyla (New England BioLabs) jel kuyucuklarına yüklenerek 130 volttaki elektrik akımı altında yürütüldü.

Marker olarak 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs) kullanıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra bantlar UV transillüminatörü (Uvitec-BTX-26-M, İngiltere) altında görüntülenerek incelendi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Olgular NOA, OAT ve kontrol grubu olarak sınıflandırıldı. ÜYT uygulanan olgularda mikro-TESE ile sperm bulunanlar, ICSI sonrası embriyo gelişimi olanlar, gebelik elde edilenler ve testis histopatolojilerine göre subdelesyon oranlarının karşılaştırılması SPSS 18 (Chicago Illinois©) paket programı ile yapıldı. Grup analizleri ki-kare ve Fisher'in kesinlik testi ile yapıldı. Sürekli değişkenlerde ise parametrik olmayan test olarak Mann Whitney-U ve Kruskal Wallis testi, parametrik değişkenler için ANOVA ve bağımsız örnek T testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ değeri ile ölçüldü.

4. BULGULAR

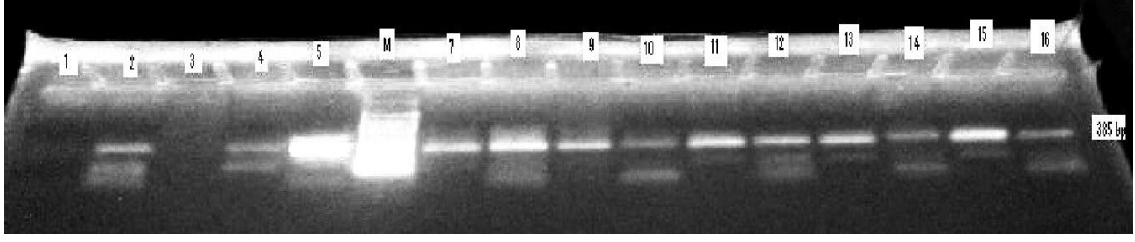
Olguların yaş, infertilite süreleri, Beden Kitle İndeksi (BKİ), sperm konsantrasyonu ve hormonal bulguları Tablo IV'te gösterildi. Kontrol grubunun yaş ortalaması NOA ve OAT gruplarına göre yüksek bulundu ($p=0,004$). NOA ve OAT gruplarında infertilite süreleri benzerdi. Gruplar arasında TT değerleri benzer iken, FSH düzeyi ve BKİ, NOA ve OAT olgularında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,05$).

NOA'lı 3 olguda (%1,3) AZFc, 1 olguda (%0,4) AZFb+c mikroadesyonu saptandı.

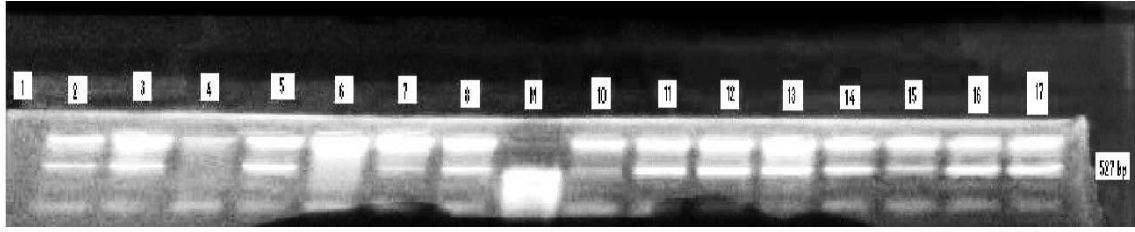
Tablo IV: Olguların demografik ve laboratuvar bulguları (ortalama \pm standart sapma, SD)

	NOA(n:218)	OAT(n:115)	KONTROL(n:87)	p
Yaş \pm SD	32,66 \pm 7,08 (17-56)	32,08 \pm 5,84 (20-52)	35,08 \pm 5,94 (25-50)	0,004
İnfertilite Süresi (yıl) \pm SD	5,93 \pm 4,77 (1-25)	4,56 \pm 3,45 (1-15)		
BKİ(kg/m²) \pm SD	26,77 \pm 3,52	26,12 \pm 3,74	25,16 \pm 2,01	0,048
Sperm Kons. (milyon/ml) \pm SD	0	2,84 \pm 4,3	44,19 \pm 15,15	<0,001
FSH(mU/ml) \pm SD	18,13 \pm 14,38	10,33 \pm 10,09	3,15 \pm 1,68	<0,001
TT(ng/ml) \pm SD	4,32 \pm 2,91	4,32 \pm 1,57	4,74 \pm 1,35	0,209

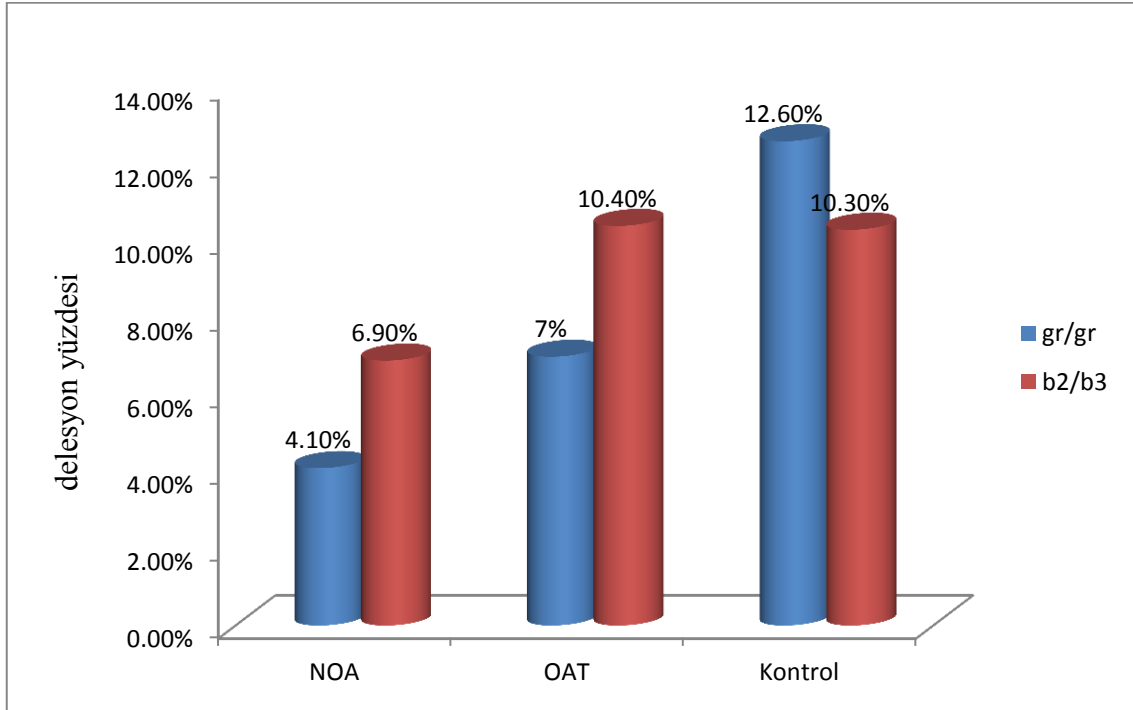
gr/gr delesyonu NOA'lı 9 (%4,1), OAT'li 8 (%7) ve kontrol grubunda 11 (%12,6) olguda pozitif bulunurken, b2/b3 delesyonu NOA'lı 15 (%6,9), OAT'li 12 (%10,4) ve kontrol grubunda 9 (%10,3) olguda saptandı (Şekil 6-8). Kontrol grubunda gr/gr delesyon görülme oranı, OAT ve NOA'lı olgulara göre daha yüksek bulunurken ($p=0,026$), grupların b2/b3 delesyon oranları arasında anlamlı fark yoktu($p=0,437$).



Şekil 6: sY1191 amplifikasyon sonuçları. Kuyu no 1: negatif kontrol; Kuyu no 2, 4,5, 7-16 Subdelesyon gözlenmeyen hastalar, Kuyu no 3: Subdelesyon gözlenen hasta; M: Marker (100 bp)



Şekil 7: sY1291 amplifikasyon sonuçları. Kuyu no 1: negatif kontrol; Kuyu no 2, 3, 5-8, 10-17 Subdelesyon gözlenmeyen hastalar, Kuyu no 4: Subdelesyon gözlenen hasta; M: Marker (50 bp)



Şekil 8: gr/gr ve b2/b3 subdelesyon görülme oranları

Kontrol ve OAT gruplarında gr/gr delesyonu izlenen ve izlenmeyen olguların sperm konsantrasyonları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p=0,398$ ve $p=0,961$). Aynı gruplarda b2/b3 delesyonu saptanan ve saptanmayan olguların sperm konsantrasyonları arasında da önemli fark yoktu ($p=346$ ve $p=0,158$).

OAT grubunda b2/b3 delesyonu izlenen olguların FSH ($4,87\pm 2,68$ mU/ml) düzeyi delesyon izlenmeyen olguların FSH ($10,97\pm 10,45$ mU/ml) düzeyinden istatistiksel olarak daha düşük bulundu ($p=0,047$).

Mikro-TESE işlemi yapılan toplam 119 (%54,5) NOA'lı olgunun kayıtlarına ulaşıldı. Bu grupta b2/b3 ve gr/gr subdelesyonları olan ve olmayan olguların IVF/ICSI için mikro-TESE ile sperm bulma oranları arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$) (tablo V).

Tablo V: Mikro-TESE işleminde sperm bulma ile subdelesyon ilişkisi

b2/b3	Mikro-TESE		Toplam	p
	Sperm(+)	Sperm(-)		
Delesyon(+)	3	3	6	,568
Delesyon(-)	62	51	113	
gr/gr				
Delesyon(+)	2	1	3	,570
Delesyon(-)	63	53	116	

Ejakulat spermi veya mikro-TESE spermleri ile ICSI yapılan olgularda embriyo gelişimi ve gebelik oluşumu ile subdelesyonlar arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$) (tablo VI).

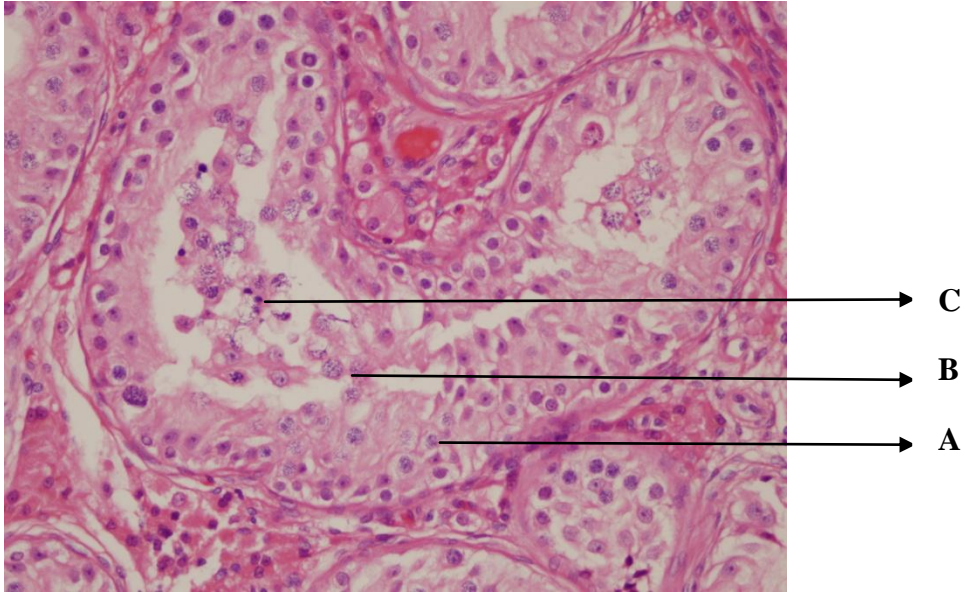
Tablo VI: Mikro-TESE ile sperm elde edilen olgularda ICSI ile embriyo gelişimi ve gebelik ile subdelesyon ilişkisi

b2/b3	Embriyo Gelişimi		p	Gebelik		p
	yok	var		yok	var	
Delesyon(+)	4	9	,258	4	7	,344
Delesyon(-)	60	75		46	50	
gr/gr						
Delesyon(+)	3	1	,215	2	0	,216
Delesyon(-)	61	83		48	57	

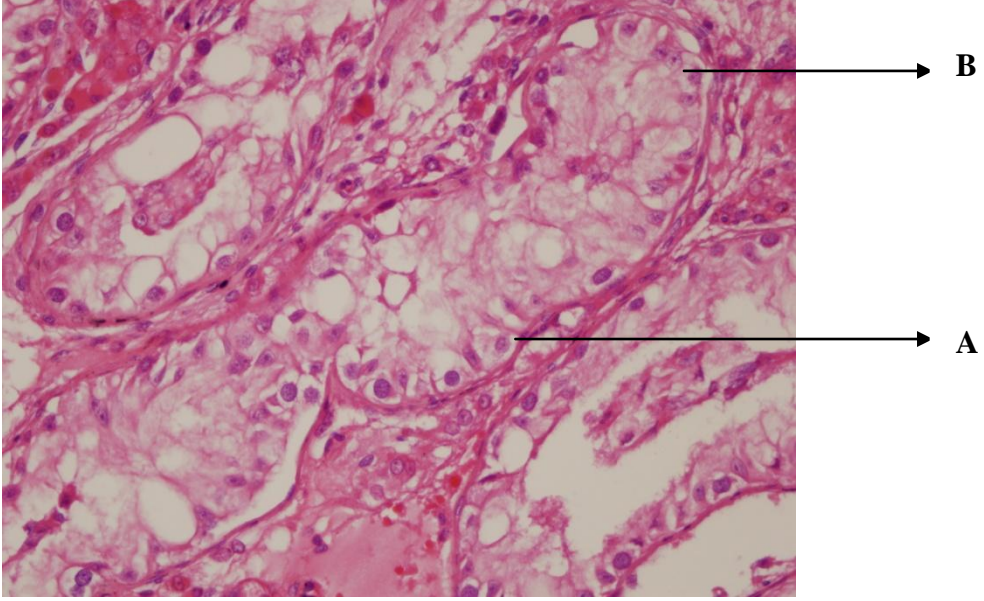
Mikro-TESE yapılan NOA'lı olguların testiküler histopatolojik bulguları (Şekil 9-10-11) ile subdelesyon varlığı arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$) (tablo VII).

Tablo VII: Mikro-TESE histopatoloji sonuçları ile subdelesyon ilişkisi

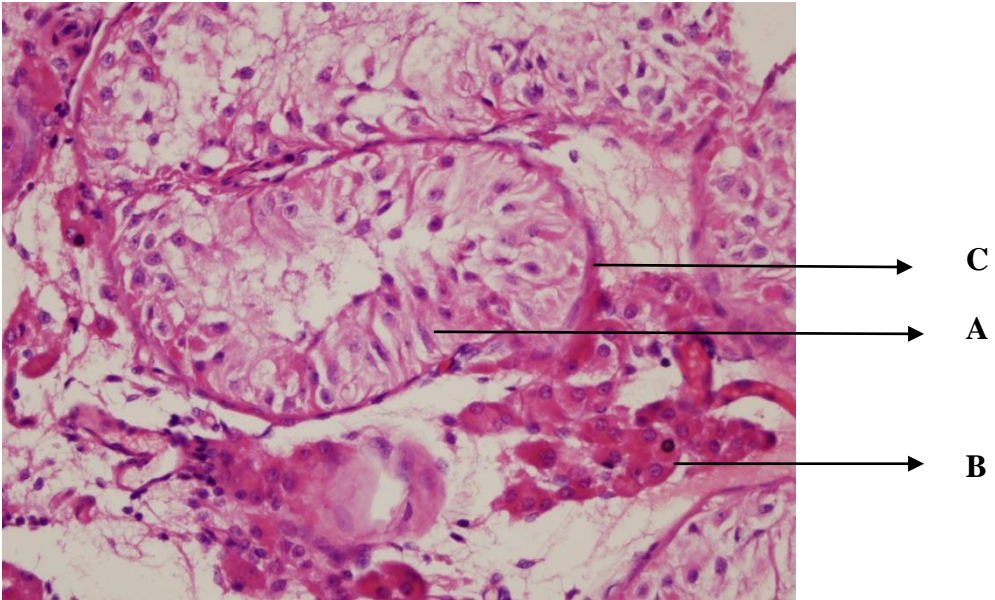
b2/b3	Histopatoloji			p
	SCO	Maturasyon Arresti	Hipospematogenez	
Delesyon(+)	3	0	0	,589
Delesyon(-)	53	9	10	
gr/gr				
Delesyon(+)	1	1	0	,233
Delesyon(-)	55	8	10	



Şekil 9: Hipospematogenez (DAB, X400). Seminifer tübüller içerisinde Sertoli hücreleri(A), Spermatogonyumlar(B) ve Spermatidler(C) izlenmektedir. Her düzeyden germ hücresinde azalma vardır.



Şekil 10: Maturasyon arresti (DAB, X400). Seminifer tübüller içerisinde Sertoli hücreleri(A) ve spermatogonyumlar(B) vardır. Spermatidler izlenmemektedir.



Şekil 11: Sertoli Cell Only(SCO) (DAB, X400). Seminifer tübüllerde yalnızca Sertoli hücreleri(A) görülmektedir. Bazal membranda(C) kalınlaşma görülmektedir. Seminifer tübül komşuluğunda Leydig hücreleri(B) izlenmektedir.

5. TARTIŞMA

Y kromozomunun mutasyon ve delesyon gibi genetik bozuklukları azoosperminin en yaygın nedenlerindedir[91]. Yq distal bölümü üzerinde bulunan AZF bölgesi sperm gelişimi ve farklılaşmadan sorumludur[92] ve NOA'lı erkeklerde bu bölgede delesyonlar izlenebilmektedir[94]. Y kromozom uzun kolundaki mikrodelesyonların prevalansı azoospermiklerde ve oligozoospermiklerde yüksektir[16] ve etnik kökene bağlı değişiklik göstermektedir[95]. AZFa, AZFb ve kombine mikrodelesyonu olan olgularda günümüze kadar canlı doğum sağlanamazken, sadece AZFc mikrodelesyonlular ÜYT ile çocuk sahibi olabilmektedir[121].

AZFc gen bölgesinde mikrodelesyon dışında subdelesyonların da olabileceği ilk kez 2003'de rapor edilmiştir. Repping ve arkadaşları AZFc bölgesi üzerinde 1.6 Mb'lik delesyonu gr/gr delesyonu (subdelesyon) olarak tanımladılar[114]. Aynı araştırmacılar 2004'te 1.8 Mb'lik başka bir delesyonu, b2/b3 delesyonunu göstermişlerdir[141]. Bu bölgede bu iki subdelesyonun dışında daha az sıklıkta b1/b3 delesyonları da görülmektedir[115]. gr/gr delesyonu en yaygın subdelesyon tipi olarak raporlanmıştır[142].

Hucklenbroich ve ark. 2005'te AZFc bölgesi üzerindeki subdelesyonların normozoospermiklerde de bulunabileceğini göstermişlerdir[115]. Sonraki prevalans araştırmaları normozoospermik fertil olguları da kapsamıştır.

İtalya'da 337 infertil ve 263 normozoospermik fertil erkeği kapsayan bir çalışmada infertil grupta olguların 17 (%5,3)'sinde gr/gr ve birinde b2/b3 delesyonu saptanırken, fertil grupta sadece bir olguda (%0,4) gr/gr delesyonu saptanmıştır[143][143]. Bu çalışmada infertil gruptaki gr/gr delesyonu sıklığı fertil gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise gr/gr subdelesyon oranı NOA grubunda %4,1 ve OAT grubunda %7 bulunurken, kontrol grubunda %12,6 olarak saptandı. Kontrol grubunda gr/gr delesyon görülme sıklığı NOA ve OAT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p=0,026$).

Avustralya'da sperm sayısı <5 milyon/ml olan 448, sperm sayısı 5-19 milyon/ml olan 114, normozoospermik olup açılanamayan infertilitesi olan 37 ve fertilitesi bilinen 234 normozoospermik olguda AZFc mikrodelesyonu ve gr/gr subdelesyonu araştırılmıştır[144]. İnfertil grupta 28 olguda (%4,7), fertil grupta 1 olguda gr/gr delesyonu görülmüş ve aradaki fark anlamlı ($p=0.0015$) bulunmuştur. AZFc

delesyonları sperm sayısı<5 milyon/ml olgularda izlenirken, gr/gr delesyonları tüm sperm konsantrasyonu kategorilerinde benzer sıklıkta görülmüştür[144]. Bizim çalışmamızda ise NOA'lı 3 olguda (%1,3) AZFc, 1 olguda (%0,4) AZFb+c mikrodelsyonu varken, gr/gr delesyonları kontrol grubunda anlamlı yüksek saptanmıştır.

Tüttelmann ve ark. 2007'de yayımladıkları meta-analizde şiddetli oligozoospermik veya azospermik infertil olgularda, normozoospermik olgulara göre gr/gr delesyonlarının daha sık görüldüğünü rapor ettiler (OR:2,29)[145]. Çin'de Han popülasyonundan spermatojenik yetmezlikli olgularda yapılan bir çalışmada b2/b3 delesyonu sıklığı gr/gr delesyon sıklığına göre daha yüksek bulunmuştur[146]. Benzer şekilde Mısır'da yapılan bir araştırmada b2/b3 delesyonu sadece spermatojenik yetmezliği olanlarda görülmüş ve infertilite açısından anlamlı bulunmuştur[147]. Bizim çalışmamızda SCO'lu 56 olgudan üçünde (%5,3) b2/b3 ve birinde (%1,7) gr/gr delesyonu izlenirken, maturasyon arresti olan dokuz olgunun hiçbirisinde b2/b3 delesyonu gözlenmezken, yalnızca bir olguda (%11,1) gr/gr delesyonu saptandı. Testis histolojisi hipospermatogenez ile uyumlu 10 olgunun hiçbirinde subdelesyon görülmedi ve testis histopatolojisi ile subdelesyonlar arasında ilişki saptanmadı. Japonya'da yapılan bir çalışmada SCO'lu 8, maturasyon arresti olan 2 ve hipospermatogenezli 1 olguda gr/gr delesyonu saptanmış, ancak istatistiksel karşılaştırma yapılmamıştır[148].

İlk insanın genetik yapısı ile günümüzde insanların genetik yapıları arasında bazı farklar vardır. Y kromozomu, ilk insandan günümüze kadar bazı mutasyonlarla değişimler geçirmiş ve 20 ayrı Y kromozomu grubu (haplogrup) ortaya çıkmıştır. Sin ve ark. gr/gr delesyonunun Japonya'da Y kromozomu D haplogrubunda daha yaygın (%86,2) görüldüğünü tespit ettiler ve yapılacak çalışmalarda tüm olguların (fertil+infertil) haplogruplarının da değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koydular[140]. Bizim çalışmamızda haplogrup değerlendirilmesi yapılmadığı için Y kromozom subdelesyonlarının Orta Karadeniz Bölgesi'nde yaşayan bu erkeklerdeki yaygınlığı açıklanamaz.

Visser ve ark. 7 çalışmayı kapsayan meta-analizlerinde gr/gr delesyonu olan olgularda sperm konsantrasyonunun olmayanlara göre daha düşük olduğunu rapor ettiler[149]. Çalışmamızda kontrol ve OAT grubunda gr/gr delesyonu izlenen olguların sperm konsantrasyonları, aynı gruplarda delesyon izlenmeyen olguların sperm

konsantrasyonlarından farklı değildi ($p=0,398$ ve $p=0,961$). Benzer durum b2/b3 delesyonu için de söz konusudur ($p=346$ ve $p=0,158$).

Yüksek FSH düzeyleri çoğunlukla testiküler yetmezlik ve bozulmuş spermatogenez göstergesidir[150]. Schoor ve ark. NOA'lı olguların %89'unda FSH düzeyini 7,6 mIU/ml ve üzerinde buldular[151]. Çalışmamızda OAT grubunda b2/b3 delesyonu izlenen olguların FSH düzeyi delesyon izlenmeyen olgulara göre anlamlı düşük bulundu. b2/b3 delesyonu olan OAT'li olguların sperm sayılarının, delesyon izlenmeyen olgulara göre anlamlı olmasa da yüksek olması, b2/b3 subdelesyonlarının spermatogenezini etkilemediğini düşündürmektedir.

Stouffs ve ark. 18 çalışmayı içeren meta-analizlerinde (6388 hasta ve 6011 kontrol) gr/gr delesyon oranını normozoospermiklerde %4,69 ve spermatojenik bozukluğu olanlarda %6,86 olarak rapor ettiler. Oligozoospermiklerde gr/gr delesyonu (azoospermiklerde anlamlı değil) oranının anlamlı yüksek olduğunu gösterdiler($p<0.001$). Çalışmaların az bir kısmında haplogrup bakılması nedeniyle delesyon sonuçlarının da heterojen olduğu ve gr/gr delesyonu ile infertilite ilişkisinin etnisiteye ve coğrafi bölgeye bağlı olabileceğini öne sürdüler[19].

AZFc bölgesindeki subdelesyonlarının infertilite ile ilişkisinin bulunmadığını gösteren de bir çok çalışma vardır. Almanya'dan Hucklenbroich ve ark. 170 normozoospermik ve 348 NOA ve oligozoospermik olguda yaptıkları çalışmada b2/b3 delesyonu sıklığını normozoospermiklerde daha yüksek, gr/gr delesyonu sıklığını ise gruplarda benzer buldular[113]. Bu delesyonların tek başına spermatojenik bozukluğa ve infertiliteye neden olamayacağını öne sürdüler[113]. Sri Lanka'da yapılan bir çalışmada 96 NOA ve 87 normozoospermik olgudan oluşturulan gruplarda dörder gr/gr delesyonu izlenmiş ve bu delesyonun spermatojenik yetmezlik açısından tek başına yetersiz olduğu rapor edilmiştir[152]. Brezilya'da 110 NOA, 122 fertil ve 118 olası fertil olguyu kapsayan bir çalışmada toplam 12 olguda gr/gr delesyonu saptanmış ve gruplar arasında fark bulunmamıştır[153]. Zhang ve ark. Hollanda, İspanya ve İtalya'dan olguları içeren çalışmalarında gr/gr delesyonu ile infertilite arasında anlamlı ilişki saptarken, Doğu Asya'da 8 etnik grubu içeren 886 olguda yaptıkları çalışmada gr/gr delesyonu ile infertilite arasında ilişki saptamamışlardır[154]. Benzer şekilde İsrail, Çin, Malezya, Mısır ve Şili'de yapılan çalışmalarda gr/gr delesyonu ile infertilite arasında ilişki bulunmamıştır (Tablo VIII ve IX)[155-158]. Bizim çalışmamızda da Orta

Karadeniz Bölgesi'nde yaşayan idiyopatik infertil erkeklerde gr/gr ve b2/b3 delesyon sıklığı ile infertilite arasında ilişki saptanamadı.

Tablo VIII: Dünya'da gr/gr delesyon sonuçları (* ile işaretli olanlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur, $p < 0,05$).

Yazar	Yıl	Ülke	Etnisite	Gr/Gr Delesyonu (%)			
				NOA	OAT	Toplam	Kontrol
Repping	2003	Hollanda/ABD	Karışık			3,4*	1,9
De Llanos	2005	İspanya	Beyaz İrk	1,5	5,01	4,2*	0
Ferlin	2005	İtalya	İtalyan	4,1	4,9	4,7*	0,4
Hucklenbroich	2005	Almanya	Veri Yok	3,3	4,2	4,0	1,8
Fernando	2006	Sri Lanka	Sri Lanka	4,1	6,3	4,5	4,6
Lardone	2007	Şili	Şili			2,1	2,6
Stouffs	2008	Belçika	Belçika	2,3	4,9	4,3	2,5
Lu	2009	Çin	Çin Han	13,4	15,4	12,5	10,2
Ravel	2009	Fransa	Karışık	3,5	4,4	4,1	6,7
Yang	2010	Çin	Çin Han			7,4*	2,7
Choi	2012	Kore	Kore			8,5*	2,3

Tablo IX: Dünya’da b2/b3 delesyon sonuçları (* ile işaretli olanlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur, $p<0,05$).

Yazar	Yıl	Ülke	Etnisite	b2/b3 delesyonu (%)			
				NOA	OAT	Toplam	Kontrol
Ferlin	2005	İtalya	İtalyan	-	0,3	0,3	0
Hucklenbroich	2005	Almanya	Veri Yok	1,6	0,6	2,2	2,9
Fernando	2006	Sri Lanka	Sri Lanka			1,04	0
Wu	2007	Çin	Çin Han	9,0	9,5	8,9*	3,2
Lu	2009	Çin	Çin Han	10,22	9,57	9,89*	5,12
Choi	2012	Kore	Kore			5,8	4,1
Almeamar	2013	Malezya	Malezya			1,85	0

İspanya’da yapılan bir çalışmada gr/gr delesyonu olan dört olgunun ICSI sonuçları, diğer olguların ICSI sonuçları benzer bulunmuştur[142]. Stahl ve ark. gr/gr delesyonu olan 22 azospermik olgunun 14 (%64)’ünde mikro-TESE ile sperm elde ederlerken, bu oranın araştırmanın yapıldığı merkezde idiyopatik NOA nedeniyle mikro-TESE yapılan olguların sonuçları ile benzer olduğunu rapor ettiler[159]. Çalışmamızda ise ÜYT uygulanan olgularda mikro-TESE ile sperm bulma, ICSI sonrası embriyo gelişimi ve gebelik oranları ile subdelesyonlar arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı.

Türkiye genelinde subdelesyon prevalansı bilinmemektedir. Dolayısı ile sonuçlarımızı farklı etnik kökenli olgularda yapılmış çalışmaların sonuçları ile karşılaştırmak durumunda kaldık. Etnik köken, Y kromozom haplogrup dağılımını değiştirerek sonuçları etkilemektedir[19]. Çalışmamızda normozoospermiklerdeki yüksek gr/gr delesyon oranının haplogrup dağılımına bağlı olup olmadığını bilmiyoruz. Çalışmamızın diğer bir kısıtı da gr/gr ve b2/b3 delesyonlarının tayini için sadece sY1191 ve sY1291 markırlarını kullanmış olmamızdan dolayı diğer subdelesyonları tespit etme olanağımızın olmamasıdır. Ayrıca kontrol grubunun daha yaşlı ve her olgunun çocuk sahibi olmaması da sonuçlarımıza etki etmiş olabilir. Ancak yaş ile subdelesyon arasında bir ilişki tanımlanmamıştır[19].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Toplam AZFc subdelesyon oranlarını (% olarak) yazılım NOA'lı 9 (%4,1), Oligoasthenoteratozoospermik (OAT) 8 (%7) ve kontrol grubunda 11 (%12,6) olguda gr/gr delesyonu izlenirken, b2/b3 delesyonu NOA'lı 15 (%6,9), OAT'li 12 (%10,4) ve kontrol grubunda 9 (%10,3) olguda saptandı.
2. Orta Karadeniz Bölgesi'nde erkek infertilitesi nedeniyle değerlendirilen olgularda Y kromozomu üzerindeki AZFc bölgesi subdelesyonları (gr/gr ve b2/b3) ile erkek infertilitesi arasında anlamlı ilişki bulunmadı.
3. Subdelesyon saptanan ve saptanmayan hastaların sperm sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.
4. AZFc subdelesyonu varlığı ile TT değerleri arasında ilişki saptanmadı.
5. OAT grubunda b2/b3 delesyonu saptanan hastaların FSH düzeyi, delesyon gözlenmeyen hastaların FSH düzeyine göre anlamlı düşük bulundu. Bu da b2/b3 delesyonlarının spermatogenezi etkilemediğini gösterebilir.
6. ÜYT uygulanan olgularda mikro-TESE ile sperm bulma, ICSI sonrası embriyo gelişimi ve gebelik oranları ile subdelesyonlar arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.
7. Orta Karadeniz Bölgesinde infertil erkeklerde nedenlerin araştırılmasında AZFc subdelesyonu analizi yapılmasına gerek olmadığı kanatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild, F., et al., *The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology*, 2009. Hum Reprod, 2009. **24**(11): p. 2683-7.
2. Dohle, G.R., et al., *EAU guidelines on male infertility*. Eur Urol, 2005. **48**(5): p. 703-11.
3. Haimov-Kochman, R., Y. Sciaky-Tamir, and A. Hurwitz, *Reproduction concepts and practices in ancient Egypt mirrored by modern medicine*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. **123**(1): p. 3-8.
4. Anderson, J.E., et al., *Infertility services reported by men in the United States: national survey data*. Fertil Steril, 2009. **91**(6): p. 2466-70.
5. Gurunath, S., et al., *Defining infertility--a systematic review of prevalence studies*. Hum Reprod Update, 2011. **17**(5): p. 575-88.
6. Association, A.U., *The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement (Revised 2010)*. Maryland, Education and Research Inc. 2010.
7. Okonofua, F.E. and H. Obi, *Specialized versus conventional treatment of infertility in Africa: time for a pragmatic approach*. Afr J Reprod Health, 2009. **13**(1): p. 9-15.
8. Boivin, J., et al., *International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care*. Hum Reprod, 2007. **22**(6): p. 1506-12.
9. Carlsen, E., et al., *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years*. BMJ, 1992. **305**(6854): p. 609-13.
10. Kavlak O, S.A., *İnfertil kadınlarda yalnızlık düzeyi ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi*. Ege Tıp Dergisi, 2002. **41**: p. 229-32.
11. *Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması, 2008*. 2009, Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü: Ankara, Türkiye.
12. Kamel, R.M., *Management of the infertile couple: an evidence-based protocol*. Reprod Biol Endocrinol, 2010. **8**: p. 21.
13. Mierla, D., D. Jordan, and V. Stoian, *Chromosomal abnormality in men with impaired spermatogenesis*. Int J Fertil Steril, 2014. **8**(1): p. 35-42.

14. Krausz, C.G. and D.T. Carrell, *Advances in understanding the genetics underlying male infertility and evolving diagnostic and treatment options*. *Andrology*, 2014. **2**(3): p. 302-3.
15. Fu, L., et al., *Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men*. *J Assist Reprod Genet*, 2012. **29**(6): p. 521-7.
16. Behulova, R., et al., *Incidence of microdeletions in the AZF region of the Y chromosome in Slovak patients with azoospermia*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2011. **155**(1): p. 33-8.
17. Jungwirth, A., et al., *European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update*. *Eur Urol*, 2012. **62**(2): p. 324-32.
18. Shahid, M., et al., *Associations of Y-chromosome subdeletion gr/gr with the prevalence of Y-chromosome haplogroups in infertile patients*. *Eur J Hum Genet*, 2011. **19**(1): p. 23-9.
19. Stouffs, K., et al., *What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis*. *Hum Reprod Update*, 2011. **17**(2): p. 197-209.
20. Moore, K., Persaud, T.V.N., *The Developing Human. Oriented Embryology*. 6th ed. 1998: W.B. Saunders Company.
21. Schoenwolf, G.C., *Human Embryology*. 4th ed. 2008: Churchill Livingstone. 479-536.
22. Carlson, B.M., *Human Embryology and Developmental Biology*. 4th ed. 2009: Mosby-Elsevier. 421-8.
23. Murashima, A., et al., *Androgens and mammalian male reproductive tract development*. *Biochim Biophys Acta*, 2014.
24. Williams, P.L., *Reproductive Organs of the Male, Gray's Anatomy* 38th ed. 1995, New York: Churchill Livingstone.
25. Hai, Y., et al., *The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014.
26. Dacheux, J.L. and F. Dacheux, *New insights into epididymal function in relation to sperm maturation*. *Reproduction*, 2014. **147**(2): p. R27-42.
27. Famiglietti, G., *[Normal ultrasonographic anatomy and measurement of the scrotum]*. *Arch Ital Urol Androl*, 2000. **72**(4): p. 345-9.

28. Wosnitzer, M.S. and M. Goldstein, *Obstructive azoospermia*. Urol Clin North Am, 2014. **41**(1): p. 83-95.
29. Nguyen, H.T., J. Etzell, and P.J. Turek, *Normal human ejaculatory duct anatomy: a study of cadaveric and surgical specimens*. J Urol, 1996. **155**(5): p. 1639-42.
30. Smith, J.F., T.J. Walsh, and P.J. Turek, *Ejaculatory duct obstruction*. Urol Clin North Am, 2008. **35**(2): p. 221-7, viii.
31. Phillips, E., C. Carpenter, and R.D. Oates, *Ejaculatory dysfunction*. Urol Clin North Am, 2014. **41**(1): p. 115-28.
32. Comhaire, F.H., et al., *Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint*. Hum Reprod Update, 1999. **5**(5): p. 393-8.
33. McLachlan, R.I., *The endocrine control of spermatogenesis*. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2000. **14**(3): p. 345-62.
34. Liu, P.Y. and D.J. Handelsman, *The present and future state of hormonal treatment for male infertility*. Hum Reprod Update, 2003. **9**(1): p. 9-23.
35. Cooper, T.G., et al., *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(3): p. 231-45.
36. De Kretser, D.M., Kerr, J.B., *The cytology of the testis*, in *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil, Neill, J.D., Ewing, L.L., Editor. 1988, Raven Press: New York. p. 837-932.
37. Desjardins, C., Ewing, L.L., *Cell and Molecular Biology of the Testis*. 1993, New York: Oxford University Press.
38. Junqueira, L., Carneiro, J., Abrahamsohn, P., *Erkek Üreme Sistemi*. 1 ed, ed. Y. Aytakin, Soakoğlu, S. 2006, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
39. Zamudio, N.M., S. Chong, and M.K. O'Bryan, *Epigenetic regulation in male germ cells*. Reproduction, 2008. **136**(2): p. 131-46.
40. Guyton, A., *Erkek Üreme İşlevleri ve Hormonal İşlevler*, in *Tıbbi Fizyoloji*, H. Çavuşoğlu, Yeğen, B., Editor. 2007, Nobel Tıp Kitapevi: İstanbul. p. 997-998.
41. Bellve, A.R., *The molecular biology of mammalian spermatogenesis*, in *Reviews of Reproductive Biology*, C.A. Finn, Editor. 1979, Clarendon Press: Oxford. p. 159-261.

42. Green, M.C., *Catalog of mutant genes and polymorphic loci*, in *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse* M.F. Lyon, searle, A.G., Editor. 1989, Oxford University Press: Oxford. p. 12-403.
43. Beamer, W.G., et al., *Juvenile spermatogonial depletion (jsd): a genetic defect of germ cell proliferation of male mice*. Biol Reprod, 1988. **38**(4): p. 899-908.
44. Handel, M.A., et al., *New mutation causing sterility in the mouse*. Gamete Res, 1988. **21**(4): p. 409-23.
45. Burgoyne, P.S., *The role of the mammalian Y chromosome in spermatogenesis*. Development, 1987. **101 Suppl**: p. 133-41.
46. Cole, A., et al., *Nuclear and manchette development in spermatids of normal and azh/azh mutant mice*. Biol Reprod, 1988. **38**(2): p. 385-401.
47. Lewis, S.E., H.A. Turchin, and T.E. Wojtowicz, *Fertility studies of complementing genotypes at the albino locus of the mouse*. J Reprod Fertil, 1978. **53**(2): p. 197-202.
48. Chubb, C., *Oligotriche and quaking gene mutations. Phenotypic effects on mouse spermatogenesis and testicular steroidogenesis*. J Androl, 1992. **13**(4): p. 312-7.
49. Handel, M.A., et al., *Male sterility caused by p6H and qk mutations is not corrected in chimeric mice*. J Exp Zool, 1987. **243**(1): p. 81-92.
50. Mullen, R.J., E.M. Eicher, and R.L. Sidman, *Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(1): p. 208-12.
51. Sidman, R.L., M.M. Dickie, and S.H. Appel, *Mutant Mice (Quaking and Jimpy) with Deficient Myelination in the Central Nervous System*. Science, 1964. **144**(3616): p. 309-11.
52. Lilford, R., et al., *Case-control study of whether subfertility in men is familial*. BMJ, 1994. **309**(6954): p. 570-3.
53. van Golde, R.J., et al., *Phenotypic characteristics of male subfertility and its familial occurrence*. J Androl, 2004. **25**(5): p. 819-23.
54. Tiepolo, L. and O. Zuffardi, *Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm*. Hum Genet, 1976. **34**(2): p. 119-24.

55. Lee, J.Y., et al., *Role of genetics in azoospermia*. Urology, 2011. **77**(3): p. 598-601.
56. Dohle, G.R., et al., *Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia*. Hum Reprod, 2002. **17**(1): p. 13-6.
57. Van Assche, E., et al., *Cytogenetics of infertile men*. Hum Reprod, 1996. **11 Suppl 4**: p. 1-24; discussion 25-6.
58. Kumtepe, Y., et al., *A genetic survey of 1935 Turkish men with severe male factor infertility*. Reprod Biomed Online, 2009. **18**(4): p. 465-74.
59. Huynh, T., R. Mollard, and A. Trounson, *Selected genetic factors associated with male infertility*. Hum Reprod Update, 2002. **8**(2): p. 183-98.
60. O'Flynn O'Brien, K.L., A.C. Varghese, and A. Agarwal, *The genetic causes of male factor infertility: a review*. Fertil Steril, 2010. **93**(1): p. 1-12.
61. Lanfranco, F., et al., *Klinefelter's syndrome*. Lancet, 2004. **364**(9430): p. 273-83.
62. Bourke, E., et al., *Klinefelter syndrome - a general practice perspective*. Aust Fam Physician, 2014. **43**(1): p. 38-41.
63. Aksglaede, L., et al., *Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(1): p. 39-48.
64. Ichioka, K., et al., *Adult onset of declining spermatogenesis in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome*. Fertil Steril, 2006. **85**(5): p. 1511 e1-2.
65. Bastida, M.G., et al., *Establishment of testicular endocrine function impairment during childhood and puberty in boys with Klinefelter syndrome*. Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **67**(6): p. 863-70.
66. Samplaski, M.K., et al., *Phenotypic differences in mosaic Klinefelter patients as compared with non-mosaic Klinefelter patients*. Fertil Steril, 2014. **101**(4): p. 950-5.
67. Lejeune, H., A. Brosse, and I. Plotton, *[Fertility in Klinefelter syndrome]*. Presse Med, 2014. **43**(2): p. 162-70.
68. Bojesen, A., et al., *Morbidity in Klinefelter syndrome: a Danish register study based on hospital discharge diagnoses*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1254-60.
69. Swerdlow, A.J., et al., *Cancer incidence and mortality in men with Klinefelter syndrome: a cohort study*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(16): p. 1204-10.

70. Cianci, V., et al., *Continuous spikes and waves during slow sleep in a child with karyotype 47, XYY*. Epileptic Disord, 2014. **16**(2): p. 223-6.
71. Flannigan, R.K., et al., *45,X/46,XY mixed gonadal dysgenesis: A case of successful sperm extraction*. Can Urol Assoc J, 2014. **8**(1-2): p. E108-10.
72. Alvarez-Nava, F., et al., *High incidence of Y-chromosome microdeletions in gonadal tissues from patients with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis*. Fertil Steril, 2008. **89**(2): p. 458-60.
73. Patsalis, P.C., *Response to the Alvarez Nava and Puerta "Y-chromosome microdeletions in 45,X/46,XY patients"*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(11): p. 1251-2.
74. Shah, K., et al., *The genetic basis of infertility*. Reproduction, 2003. **126**(1): p. 13-25.
75. De Braekeleer, M. and T.N. Dao, *Cytogenetic studies in male infertility: a review*. Hum Reprod, 1991. **6**(2): p. 245-50.
76. Choi, B.H., et al., *Various endocrine disorders in children with t(13;14)(q10;q10) Robertsonian translocation*. Ann Pediatr Endocrinol Metab, 2013. **18**(3): p. 111-5.
77. Pylp, L.Y., V.D. Zukin, and N.M. Bilko, *Chromosomal segregation in sperm of Robertsonian translocation carriers*. J Assist Reprod Genet, 2013. **30**(9): p. 1141-5.
78. Huang, J., et al., *[Clinical characteristics and preimplantation genetic diagnosis for male Robertsonian translocations]*. Beijing Da Xue Xue Bao, 2012. **44**(4): p. 544-6.
79. Krausz, C. and G. Forti, *Clinical aspects of male infertility*. Results Probl Cell Differ, 2000. **28**: p. 1-21.
80. Piomboni, P., A. Stendardi, and L. Gambera, *Chromosomal aberrations and aneuploidies of spermatozoa*. Adv Exp Med Biol, 2014. **791**: p. 27-52.
81. Chantot-Bastaraud, S., C. Ravel, and J.P. Siffroi, *Underlying karyotype abnormalities in IVF/ICSI patients*. Reprod Biomed Online, 2008. **16**(4): p. 514-22.

82. Chiang, H.S., et al., *Cytogenic and molecular analyses of 46,XX male syndrome with clinical comparison to other groups with testicular azoospermia of genetic origin*. J Formos Med Assoc, 2013. **112**(2): p. 72-8.
83. Gao, X., et al., *Clinical, cytogenetic, and molecular analysis with 46,XX male sex reversal syndrome: case reports*. J Assist Reprod Genet, 2013. **30**(3): p. 431-5.
84. Fechner, P.Y., et al., *The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(3): p. 690-5.
85. Borghi, A., et al., [*The syndrome of the "XX male"*]. Recenti Prog Med, 1978. **64**(2): p. 152-201.
86. Anton, E., et al., *Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review*. Cytogenet Genome Res, 2005. **111**(3-4): p. 297-304.
87. Lange, J., et al., *Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination that maintains palindromes*. Cell, 2009. **138**(5): p. 855-69.
88. Rivera, H., et al., *Isodicentric Y chromosomes and secondary microchromosomes*. Genet Couns, 2003. **14**(2): p. 227-31.
89. Faure, A.K., et al., *Fine mapping of re-arranged Y chromosome in three infertile patients with non-obstructive azoospermia/cryptozoospermia*. Hum Reprod, 2007. **22**(7): p. 1854-60.
90. DesGroseilliers, M., et al., *Phenotypic variability in isodicentric Y patients: study of nine cases*. Clin Genet, 2006. **70**(2): p. 145-50.
91. Chandley, A.C., *The chromosomal basis of human infertility*. Br Med Bull, 1979. **35**(2): p. 181-6.
92. Poongothai, J., T.S. Gopenath, and S. Manonayaki, *Genetics of human male infertility*. Singapore Med J, 2009. **50**(4): p. 336-47.
93. Hotaling, J. and D.T. Carrell, *Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions*. Andrology, 2014.
94. Simoni, M., et al., *Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Munster experience*. Reprod Biomed Online, 2008. **16**(2): p. 289-303.

95. Sachdeva, K., et al., *Use of ethnicity-specific sequence tag site markers for Y chromosome microdeletion studies*. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011. **15**(6): p. 451-9.
96. Reijo, R., et al., *Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene*. *Nat Genet*, 1995. **10**(4): p. 383-93.
97. Vogt, P.H., et al., *Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(7): p. 933-43.
98. Kuhnert, B., et al., *Case report: natural transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his sons*. *Hum Reprod*, 2004. **19**(4): p. 886-8.
99. Kamischke, A., et al., *Transmission of a Y chromosomal deletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) and chromodomain (CDY1) genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection: case report*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(9): p. 2320-2.
100. Massart, A., et al., *Genetic causes of spermatogenic failure*. *Asian J Androl*, 2012. **14**(1): p. 40-8.
101. Zaimy, M.A., et al., *The frequency of Yq microdeletion in azoospermic and oligospermic Iranian infertile men*. *Iran J Reprod Med*, 2013. **11**(6): p. 453-8.
102. Silber, S.J., et al., *Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction*. *Hum Reprod*, 1998. **13**(12): p. 3332-7.
103. Hopps, C.V., et al., *Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions*. *Hum Reprod*, 2003. **18**(8): p. 1660-5.
104. Brandell, R.A., et al., *AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test*. *Hum Reprod*, 1998. **13**(10): p. 2812-5.
105. Foresta, C., E. Moro, and A. Ferlin, *Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods*. *Hum Reprod*, 2001. **16**(8): p. 1543-7.
106. Kent-First, M.G., et al., *Infertility in intracytoplasmic-sperm-injection-derived sons*. *Lancet*, 1996. **348**(9023): p. 332.

107. Marshall Graves, J.A., *Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis- a feminist view*. Biol Reprod, 2000. **63**(3): p. 667-76.
108. Foresta, C., E. Moro, and A. Ferlin, *Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 226-39.
109. Krausz, C., G. Forti, and K. McElreavey, *The Y chromosome and male fertility and infertility*. Int J Androl, 2003. **26**(2): p. 70-5.
110. Quintana-Murci, L., C. Krausz, and K. McElreavey, *The human Y chromosome: function, evolution and disease*. Forensic Sci Int, 2001. **118**(2-3): p. 169-81.
111. Ali, S. and S.E. Hasnain, *Molecular dissection of the human Y-chromosome*. Gene, 2002. **283**(1-2): p. 1-10.
112. Delbridge, M.L. and J.A. Graves, *Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes*. Rev Reprod, 1999. **4**(2): p. 101-9.
113. Krausz, C., et al., *EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013*. Andrology, 2014. **2**(1): p. 5-19.
114. Repping, S., et al., *Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 247-51.
115. Hucklenbroich, K., et al., *Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis*. Hum Reprod, 2005. **20**(1): p. 191-7.
116. Lahn, B.T. and D.C. Page, *Retroposition of autosomal mRNA yielded testis-specific gene family on human Y chromosome*. Nat Genet, 1999. **21**(4): p. 429-33.
117. Krausz, C., et al., *Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background*. J Med Genet, 2009. **46**(1): p. 21-31.
118. Stouffs, K., et al., *Do we need to search for gr/gr deletions in infertile men in a clinical setting?* Hum Reprod, 2008. **23**(5): p. 1193-9.

119. Kent-First, M., et al., *Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection*. Mol Reprod Dev, 1999. **53**(1): p. 27-41.
120. Pryor, J.L., et al., *Microdeletions in the Y chromosome of infertile men*. N Engl J Med, 1997. **336**(8): p. 534-9.
121. Park, S.H., et al., *Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in korean men with y chromosome microdeletions*. Korean J Urol, 2013. **54**(8): p. 536-40.
122. Krausz, C. and S. Degl'Innocenti, *Y chromosome and male infertility: update, 2006*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 3049-61.
123. Mau Kai, C., et al., *Sons conceived by assisted reproduction techniques inherit deletions in the azoospermia factor (AZF) region of the Y chromosome and the DAZ gene copy number*. Hum Reprod, 2008. **23**(7): p. 1669-78.
124. Mulhall, J.P., et al., *Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1997. **12**(3): p. 503-8.
125. Siffroi, J.P., et al., *Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions*. Hum Reprod, 2000. **15**(12): p. 2559-62.
126. Jaruzelska, J., et al., *Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFc deletion*. J Med Genet, 2001. **38**(11): p. 798-802.
127. Arnedo, N., et al., *Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation*. Hum Reprod, 2005. **20**(2): p. 462-8.
128. Stouffs, K., et al., *Male infertility and the involvement of the X chromosome*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(6): p. 623-37.
129. Dowsing, A.T., et al., *Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene*. Lancet, 1999. **354**(9179): p. 640-3.
130. Tufan, A.C., et al., *No association of the CAG repeat length in exon 1 of the androgen receptor gene with idiopathic infertility in Turkish men: implications and literature review*. Tohoku J Exp Med, 2005. **206**(2): p. 105-15.

131. Bianco, S.D. and U.B. Kaiser, *The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(10): p. 569-76.
132. Ghervan, C. and J. Young, [*Congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome in males*]. Presse Med, 2014. **43**(2): p. 152-61.
133. Miyagawa, Y., et al., *Outcome of gonadotropin therapy for male hypogonadotropic hypogonadism at university affiliated male infertility centers: a 30-year retrospective study*. J Urol, 2005. **173**(6): p. 2072-5.
134. Ferlin, A. and C. Foresta, *New genetic markers for male infertility*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2014. **26**(3): p. 193-8.
135. Walsh, T.J., R.R. Pera, and P.J. Turek, *The genetics of male infertility*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(2): p. 124-36.
136. Donat, R., et al., *The incidence of cystic fibrosis gene mutations in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens in Scotland*. Br J Urol, 1997. **79**(1): p. 74-7.
137. Liu, L.J., et al., [*Association of CFTR gene polymorphism with congenital bilateral absence of vas deferens in ethnic Han Chinese patients*]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2013. **30**(6): p. 729-32.
138. Drake, M.J. and F.M. Quinn, *Absent vas deferens and ipsilateral multicystic dysplastic kidney in a child*. Br J Urol, 1996. **77**(5): p. 756-7.
139. O'Connell, M., N. McClure, and S.E. Lewis, *A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia*. Hum Reprod, 2002. **17**(6): p. 1571-7.
140. Sin, H.S., et al., *Features of constitutive gr/gr deletion in a Japanese population*. Hum Reprod, 2010. **25**(9): p. 2396-403.
141. Repping, S., et al., *A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region*. Genomics, 2004. **83**(6): p. 1046-52.
142. de Llanos, M., et al., *High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates*. Hum Reprod, 2005. **20**(1): p. 216-20.
143. Ferlin, A., et al., *Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility*. J Med Genet, 2005. **42**(3): p. 209-13.

144. Lynch, M., et al., *The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility*. Mol Hum Reprod, 2005. **11**(7): p. 507-12.
145. Tuttelmann, F., et al., *Gene polymorphisms and male infertility--a meta-analysis and literature review*. Reprod Biomed Online, 2007. **15**(6): p. 643-58.
146. Lu, C., et al., *The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(6): p. 1122-30.
147. Eloualid, A., et al., *Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34902.
148. de Carvalho, C.M., et al., *Study of AZFc partial deletion gr/gr in fertile and infertile Japanese males*. J Hum Genet, 2006. **51**(9): p. 794-9.
149. Visser, L., et al., *Y chromosome gr/gr deletions are a risk factor for low semen quality*. Hum Reprod, 2009. **24**(10): p. 2667-73.
150. Gangel, E.K., *AUA and ASRM produce recommendations for male infertility*. American Urological Association, Inc and American Society for Reproductive Medicine. Am Fam Physician, 2002. **65**(12): p. 2589-90.
151. Schoor, R.A., et al., *The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility*. J Urol, 2002. **167**(1): p. 197-200.
152. Fernando, L., et al., *Y-chromosomal microdeletions and partial deletions of the Azoospermia Factor c (AZFc) region in normozoospermic, severe oligozoospermic and azoospermic men in Sri Lanka*. Asian J Androl, 2006. **8**(1): p. 39-44.
153. Carvalho, C.M., et al., *No association found between gr/gr deletions and infertility in Brazilian males*. Mol Hum Reprod, 2006. **12**(4): p. 269-73.
154. Zhang, F., et al., *A frequent partial AZFc deletion does not render an increased risk of spermatogenic impairment in East Asians*. Ann Hum Genet, 2006. **70**(Pt 3): p. 304-13.
155. Lardone, M.C., et al., *AZFc partial deletions in Chilean men with severe spermatogenic failure*. Fertil Steril, 2007. **88**(5): p. 1318-26.
156. Imken, L., et al., *AZF microdeletions and partial deletions of AZFc region on the Y chromosome in Moroccan men*. Asian J Androl, 2007. **9**(5): p. 674-8.

157. Almeamar, H.A., et al., *Analysis of partial AZFc deletions in Malaysian infertile male subjects*. Syst Biol Reprod Med, 2013. **59**(2): p. 99-107.
158. Kleiman, S.E., et al., *Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance?* Fertil Steril, 2012. **98**(1): p. 43-7.
159. Stahl, P.J., et al., *Diagnosis of the gr/gr Y chromosome microdeletion does not help in the treatment of infertile American men*. J Urol, 2011. **185**(1): p. 233-7.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Raporu

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU


Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/713

20.06.2014

Sayın Prof.Dr.Ramazan AŞÇI

Etik Komisyonumuza sunmuş olduğunuz **Erkek infertilitesinde y kromozomu üzerindeki subdelesyonlar** başlıklı, OMÜ TAEK 2011/484 Karar nolu Biyokimya çalışması+ Genetik çalışma+ Dosya taraması+ Veri kaynakları taraması nitelikli araştırma projeniz: amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, OMÜ-TAEK yönergesine göre incelenmiş etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına; çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 29.12.2011 tarihli etik komisyonumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim


Prof.Dr.Abdülkerim BEDİR
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başkanı

EK 2: OMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Kararı

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYON KARARLARI

KARAR TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO
02.07.2012	10	2012/ 183 - 223

KARAR NO : 2012 yılı için teklif edilen 1904 kodlu Lisansüstü Tezleri Destekleme Programı Projelerinin
2012/186 seçimi görüşüldü. Buna göre;

a) Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden;

- 3- Prof.Dr.Ramazan AŞÇI'nın PYO.TIP.1904.12.034 kodlu "Erkek İnfertilitesinde Y Kromozomu Üzerindeki Subdelesyonlar" konulu projesinin 14.505,00.-TL ödenek ile desteklenmesinin uygun olduğuna mevcudun oybirliği ile karar verilmiştir.



ASLI GİBİDİR

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ *

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE Y KROMOZOMU ÜZERİNDEKİ SUBDELESYONLAR

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığımız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR? Açıklayınız

Erkek kısırlığına yol açabilen genetik faktörlerin tespit edilmesi. Bu amaçla daha önce sizden alınan kan örnekleri yeniden başka genetik bozukluklar açısından incelenecektir.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Kontrol grubu için gönüllü olgulardan genetik ve hormonal tetkik için kan alınacaktır. Bu olgularda ayrıca semen analizi de bakılacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Kan örnekleri için açlık durumunda (aç karnına) olmanız gerekmektedir (su dışında başka hiçbir yiyecek ve içeceğin tüketilmemesi gerekmektedir). Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığınız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Çalışmaya katılmanız halinde kontrol grubunda iseniz sizden sadece kan tahlili ve semen analizi istenecektir. Herhangi bir yan etki veya risk bulunmamaktadır.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR? (Varsa açıklayınız)

Çalışma ile erkek infertilitesinde günümüz tanı yöntemleri ile henüz tespit edilemeyen ve erkek infertilitesine sebep olabilecek faktörler ve tedavisi hususunda faydaları olabilecektir.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabileceğim bilincindeyim. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici tarafından karşılanacak ve size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca Çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod (“Kod”) numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Çalışma destekleyicisi firma düzenleyici otorite veya diğer denetim kurumları tarafından atanmış kişiler doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler.

Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum ve çalışma destekleyicisi firmanın her ikisi de yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuz ya da çalışma destekleyicisi firmadan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahipsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyici firma onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verilerinizi kullanmaya devam edebilir.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Cemalettin Cengiz BEYAZ 0530 522 8253

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih