

T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNERTİL ERKEKLERDE GENETİK ARAŞTIRMALAR

(DOKTORA TEZİ)

Arş Gör. Dr. Mahmut BALKAN

DICLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Selahaddin TEKEŞ
DİYARBAKIR
2006

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

“İnfertil Erkeklerde Genetik Araştırmalar” isimli bu tez 02.10.2006 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı :Yrd.Doç.Dr.Selahattin TEKEŞ
Tezi Teslim Eden :Dr.Mahmut BALKAN

Jüri Üyesinin

	Ünvanı	Adı Soyadı
Başkan	:Prof.Dr.	Turgay BUDAK
Üye	:Prof.Dr.	Ali KELLE
Üye	:Prof.Dr.	M.Emin ERDAL
Üye	:Doç.Dr.	Levent ERDİNÇ
Üye	:Yrd.Doç.Dr.	Selahattin TEKEŞ

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

08/11/2006

Prof. Dr. Yusuf NERGİZ
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÜR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Doktora öğrenimim süresince devamlı yardım ve ilgisini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Sayın Prof. Dr. Turgay BUDAK'a ,

Çalışmalarım süresi boyunca ilgi ve yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Ali KELLE hocama,

Büyük bir özveride bulunarak Doktora yöneticiliğimi üstlenen, tezimin hazırlanmasında gerekli ilgi, tenkit ve tavsiyelerle bana yol gösteren hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ'e,

Doktora öğrenimim süresince büyük yardım ve desteklerini gördüğüm ve bilimsel katkılarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Sayın Yrd .Doç. Dr. M. Nail ALP, Yrd. Doç. Dr. Diclehan ORAL ve Yrd. Doç. Dr. Hilmi İSİ'ye ,

Tez çalışmalarım sırasında büyük desteklerini esirgemeyen bütün çalışma arkadaşlarıma, her zaman bana maddi ve manevi olarak destek olan ve her durumda yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

Diyarbakır-2006

Arş. Gör. Dr. Mahmut BALKAN

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	I
Şekil Listesi	II
Özet	III
Summary	V

	SAYFA
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Erkek üreme sistemi	3
2.1.1. Erkek iç üreme organları	3
2.1.2. Erkek genital eklenti bezleri	7
2.1.3. Erkek dış üreme organları	9
2.2. Embriyoloji ve seksüel farklılaşma	9
2.3. Erkek infertilitesinin nedenleri	10
2.4. Klinik olarak infertilitenin değerlendirilmesi	12
2.5. Erkek üreme bozukluğunun genetiği	12
2.5.1. Kromozomal bozukluklar	12
2.5.2. Tek gen bozuklukları	14
2.5.3. Multifaktoriyel kalıtsal bozukluklar	15
2.6. Y kromozomunun evrimi ve yapısı	16
2.7. Y kromozomu ve AZF	23
2.8. Y kromozomuna özgü Tekrarlamalar; DYZ1 ve DYZ2	25
2.9. Y Kromozomu üzerinde bulunan genler ve erkek infertilitesi	25
3. Gereç ve Yöntem	27
3.1. Araştırma popülasyonu	27
3.2. Kromozom analizi için kullanılan kimyasal maddeler	27
3.3. Kromozom analizi için kullanılan solüsyonlar	28
3.4. Kromozom analizi için kullanılan diğer gereçler	29
3.5. Kromozomların elde edilmesi	30
3.6. Giemsa bantlama	31
3.7. Değerlendirme	31

3.8. DNA analizi için kullanılan solüsyonlar ve tamponlar	31
3.9. Periferik kandan DNA izolasyon yöntemi	33
3.10. PCR İle örneklerin çoğaltılması	34
3.11. Agaroz jel elektroforezi	38
4. Bulgular	39
5. Tartışma	47
6. Kaynaklar	64

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1. Kullanılan PCR Primerlerinin Dizileri	36
Tablo 2. Anormal karyotip saptanan 5 infertil bireydeki kromozom düzensizlikleri ...	41
Tablo 3. Anormal karyotip saptanan olguların klinik verileri	42
Tablo 4. Azospermik, oligospermik, hipospermik ve oligoastenospermik olgularda belirlenen Y kromozom mikrolelesyon ve kromozom anomali sıklıkları	42
Tablo 5. Olguların yaş ve infertilite süresi	43
Tablo 6. Olguların infertilite etimolojilerinin dağılımı	43
Tablo 7. Olguların öyküleri	44
Tablo 8. Olgulara ait serum hormon düzeyleri	44
Tablo 9. Y kromozom mikrolelesyon saptanan olgunun verileri	45
Tablo 10. İnfertil erkeklerde görülen kromozom anomalilerini literatür özeti ...	50
Tablo 11. Literatürde geçen Y kromozom mikrolelesyon oranları	55

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1. Erkek üreme sistemi	4
Şekil 2. Sperm üretiminin hormonal kontrolü	6
Şekil 3. İnsan Seks kromozomlarının evrimi	18
Şekil 4. Y kromozomunun rekombinasyona katılmayan bölgedeki (NRY) genler	20
Şekil 5. Y kromozomunun yapısı	22
Şekil 6. Y Kromozom haritası	23
Şekil 7. Multipleks I primerleri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu oluşan ürünlerin bazılarının elektroforez sonucu oluşan görüntüsü	46
Şekil 8. 46,XY,der(5) (5pter→q35::6q21→qter), del(6)(q21→qter) kromozom kuruluşuna sahip olguya ait pedigri	60
Şekil 9. 46,XY,der(5) (5pter→q35::6q21→qter), del(6)(q21→qter) kromozom kuruluşuna sahip olguya ait metafaz ve karyotip	61
Şekil 10. 46,XY,der(7) (7pter→q36::3q24→qter), del(3)(q24→qter) kromozom kuruluşuna sahip olguya ait metafaz ve karyotip	61
Şekil 11. Klinefelter Sendromlu (47,XXY) bir olguya ait metafaz ve karyotip	62

ÖZET

İnfertil Erkeklerde Genetik Araştırmalar

Arş. Gör. Dr. Mahmut BALKAN

Bu çalışma en az iki yıl evli olmalarına rağmen çocuk sahibi olamamış primer infertilite ön tanılı erkek bireylerde genetik nedenlerin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Laboratuvarımıza başvuran 80 infertil erkeğe öncelikle sitogenetik analiz yöntemi uygulandı ve kromozomal anomali yönünden değerlendirildi. Ayrıca olgulara Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniği uygulanarak Yq kromozom mikrolelesyonlarını taşıyıp taşımadıkları araştırıldı.

Çalışma gurubu olarak belirlenen olguların yaş ortalamaları 32.69 ± 5.01 olarak bulunmuştur (ortalama \pm standart sapma). Olguların infertilite etiyolojisi araştırıldığında 77'si idiyopatik (%96.3), 3'ü anidiyopatik olarak belirlenmiştir

Çalışma kapsamında incelenen 80 olgunun spermiyogram sonuçları değerlendirildiğinde, 52 olgu (%65) azospermik, 25 olgu (%31.2) oligospermik ve 3 olgu da (%3.8) oligoastenospemik olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma serisini oluşturan 80 olgudan 71 olgunun (%88.8) normal karyotipe (46,XY) ve 9 olgunun da (%11.2) anormal karyotipe sahip olduğu görüldü. 9 kromozom anomalisinden 7'sinin gonozomal ve Klinefelter sendromu 2'sinin de otozomal ve translokasyon taşıyıcısı olduğu görüldü. Klinefelter sendromluların tamamı azospermik iken, translokasyon taşıyıcısı olguların oligospermik olduğu görüldü.

Y kromozom mikrolelesyon analizi için 80 olguda AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd bölgelerine özgül 15 primer çifti kullanılarak PCR yöntemi ile analiz yapıldı. Bir olguda sY277 (AZFc) ve sY153 (AZFd) primerlerinin amplifiye olmamasıyla delesyon saptanmıştır. Delesyon azospermik 52 olgunun 1'inde (%1.9) saptanırken, diğer sperm anomalilerinde saptanamadı. Olguların hiç birinde Y kromozom mikrolelesyonu ve kromozom anomali birlikteliği gözlenemedi.

Toplam genetik anomali olgu sayısı 52 azospermik olguda 7 (%13.5), 25 oligospermik olguda 2 (%8) iken oligoastenospermik bireylerde Y kromozom mikrolelesyonu ve karyotip açısından herhangi bir genetik anomali saptanamamıştır.

Çalışma sonunda elde edilen bulgular, azospermik infertil erkeklerde kromozomal anomalilerinin ve Y kromozom mikrolelesyonlarının oligospermik ve oligoastenospermik erkeklere oranla daha sık görüldüğünü göstermiştir. Olgu sayısı artırılarak, klinik verilerin daha homojen olmasını sağlamak amacı ile olgularda seçici davranarak ve primer sayısını artırarak, farklı dokularda çalışmaya devam edilmesinin Türkiye'deki infertil bireylerdeki genetik düzensizliklerin tipi ve sıklığının ortaya çıkarılması, infertil erkeklerin yönlendirilmeleri ve yardımcı üreme tekniklerine başvuracak çiftlerin ileride doğabilecek sorunlara karşı uyarılmaları açısından faydası olacağı düşünölmektedir.

Anahtar kelimeler: Erkek İnfertilitesi, genetik, kromozom anomalisi, Y kromozom mikrolelesyonu, AZF

SUMMARY

Genetic Studies in Infertile Males

Arş. Gör. Dr. Mahmut BALKAN

The purpose of this study is to investigate of the genetic causes of infertility in male. The years of marriage of men in our investigation were at least two years and they do not have any child. In this study 80 cases who attended to our laboratory were evaluated cytogenetically by karyotyping for chromosome anomalies and molecular genetically by PCR analysis for microdeletions of Y chromosome

The mean ages of the men in this study were 32.69 ± 5.01 years. The etiology of infertility is unknown in 77 of cases (96.3%), classified as idiopathic infertility and known in 3 of cases, classified as nonidiopathic infertility.

According to results of spermiogram, 52 cases had azoospermia and 25 cases had oligospermia and 3 cases had oligoasthenospermia in all cases (n=80).

The 71 (88.8%) of 80 cases had normal karyotype (46,XY) and the 9 cases (11.2%) had abnormal karyotype. The 7 of the chromosomal abnormalities were gonosomal with Klinefelter Syndrome and the two were autosomal with translocation. All of the Klinefelter Syndrome had azoospermia, but translocation carriers had oligospermia.

The screening methods for microdeletions were based on multiplex PCR technique using 15 Y-chromosome specific STSs, which corresponded to the AZFa, b, c and d regions, respectively. One case had Y microdeletions of AZFc (sY277) and AZFd (sY153) loci,

Yq microdeletion were detected in the 1 (1.9%) of 52 azoospermia cases, but not seen other cases. Combined chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletion were not seen in any case

Including Y chromosome deletions and chromosomal abnormality, a total genetic abnormality rate detected 13.5% in azoospermic cases (7/52) and 8% in oligospermic cases (2/25), but not seen among the cases of oligoasthenospermic.

The finding our study indicated that; chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions were occurred more frequently in azoospermic patients than oligospermic and oligoastenospermic ones with male factor infertility. In order to detect the frequency and types of both chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in patients with male factor infertility in Turkish population, the number and selectivity of case and primer (STS) must increased, and it must studied with various tissue. Thus, determination of genetic abnormalities, and proper genetic counseling to infertile couples with male-factor before any infertility treatment is important.

Keywords: Male infertility, genetic, chromosomal abnormality, Y chromosome microdeletion, AZF

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Üremek ve neslini devam ettirmek yaşamın doğasında var olan bir olgudur ve bu yüzden insan evriminde aile ve çocuklar sosyal yaşamın temelini oluşturmaktadır. Çiftlerin çoğu bir aileye sahip olmak ve çocuk yetiştirmek için evlenirler. Belli bir süre içinde gebeliğin gerçekleşmemesi çiftleri korku ve üzüntüye sevk etmektedir. Bu nedenle infertilite (kısırlık) çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerde medikal bir yardım aramak için en yaygın nedenlerden biri haline gelir (1, 2).

İnfertilite, dişi ve erkek bireylerdeki üreme yoksunluğunu belirtmek için kullanılan bir terimdir. Kriteri ise çiftin korunmasız olarak cinsel birliktelik süresidir. Buna göre infertilite bazı kaynaklara göre 1 (3, 4, 5), bazı kaynaklara göre ise 2 sene haftada 2 ya da daha fazla sayıda korunmasız cinsel ilişkiye karşın gebeliğin olmaması şeklinde tanımlanmıştır (3, 4, 6). Oysa, normal bir çiftin bir ay içerisinde gebe kalma şansları %20–25, 6 ay içerisinde %75 ve bir yıl içerisinde ise %90'dır. Gebeliklerin çoğu, ovulasyon günü ya da ovulasyondan önceki 6 gün içerisinde bulunan cinsel ilişkiler neticesi görülür. Sadece ovulasyonu takip eden günlerde bulunan cinsel ilişkilerin çok azı gebelikle sonuçlanır. Hem erkek hem de kadın için 24 yaşında fertilizasyon oranları en yüksektir. Fertilizasyon oranları bu yaştan sonra her iki cinsiyette de düşmeye başlar (7, 8)

İnfertilite toplumlar arası değişkenlik göstermekle birlikte, bugün tüm dünyada çiftlerin yaklaşık % 10-15'i infertilite sorunu ile karşılaşmakta ve vakaların yaklaşık %30-40'ında birincil problem erkekte iken %30-40 oranında her iki tarafta problem yaşanır (6, 7, 9, 10-21). Kalan %20'lik kısımda ise infertilite nedeni belirlenemez. Nedeni bilinmeyen infertilite idiyopatik infertilite olarak adlandırılır. Her 4 infertil erkekten biri idiyopatik infertilite sınıfına girmektedir (5, 14, 18, 19, 22, 23).

Normal bir dölllenme ve gebeliğin gerçekleşebilmesi için, hem erkek ve hem de kadında, anatomik, fizyolojik, genetik ve çevresel faktörlerin tek tek ve bütün olarak normlara uygun ve işlevsel olması gereklidir (2, 19, 24).

Erkek infertilitesinin % 40'ının nedeni bilinmemekle birlikte, genetik faktörler bu nedenler arasında önemli bir yer tutmaktadır (5, 14, 18, 23). Sebebi bilinmeyen oligospermik ve azospermik olgularda sayısal ve yapısal kromozomal

düzensizliklerine ve Y kromozomu üzerindeki gen mikrodelesyonlarına sık rastlandığı bilinmektedir (2-24). Yapılan çok sayıdaki çalışmada oligospermik ve azospermik olgularda kromozomal düzensizlik oranı %2,1-10,3 arasında verilmektedir. Genetik düzensizlik oranının oldukça yüksek olduğu bu toplulukta spermatogenez sırasında dengesiz kromozomal kuruluşların oluşması ihtimali yüksektir (2. 11, 18).

1970'li yılların başında Y kromozomu uzun kolu (q) distalinde sitogenetik olarak saptanabilen delesyon bölgeleri bulunmuştur. AZF (Azospermi Faktör) olarak adlandırılan bu delesyon bölgeleri spermatogenez ve germ hücreleri gelişim ve değişimi için kritik gen aileleri içermektedir. Spermatogenezden sorumlu AZF lokusu, başlangıçta 5 ve 6 intervallerine lokalize, birbiriyle çakışmayan üç alt bölgeye ayrılmış, (AZFa, AZFb ve AZFc) daha sonra AZFb ve AZFc arasında dördüncü bir bölge (AZFd) daha tanımlanmıştır (18, 22, 24). Yakın zamanda ise Y kromozomunun %95'ini oluşturan MSY (male-specific region of Y) bölgesinin fiziksel haritalama ve sekans çalışmalarının tamamlanmış olması, delesyon ve yeniden organizasyonların yapısal içeriğine açıklık getirmiştir (2, 3, 4).

AZF mikrodelesyonları, azospermi, oligospermi ve aynı zamanda Sertoli Cell Only (SCO), hipospermatogenezis, matürasyon yokluğu ve morfolojik sperm anomalilerine kadar giden değişik histolojik bulgular ile ilişkili bulunmuştur (12, 20).

Bu çalışma en az iki yıl evli olmalarına rağmen çocuk sahibi olamamış primer infertilite ön tanılı erkek bireylerde genetik nedenlerin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Laboratuvarımıza başvuran 80 (52 azospermik, 25 oligospermik ve 3 oligoastenospermik) infertil erkeğe öncelikle sitogenetik analiz yöntemi uygulandı ve kromozom anomali yönünden değerlendirildi. Ayrıca Multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu teknikleri ile Yq kromozom mikrodelesyonları yönünden inceleme yapılmıştır

Bu analiz ve değerlendirmeler sonucunda amacımız yöremizdeki infertil erkeklerde, infertilitenin genetik nedenlerini, oranlarını ve sıklığını ortaya koymak ve IVF (Invitro fertilization), ICSI (Intrastoplazmik sperm enjeksiyonu) ve TESE (Testicular sperm extraction) gibi yardımcı üreme yöntemlerine başvuracak hastalara yardımcı olabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek infertilite mekanizmasının anlaşılabilmesi için erkek üreme sisteminin bilinmesi gerekmektedir.

Erkek üreme sistemi üreme hücrelerini (spermatozoon) yaratan, temel üreme organı olan ve skrotum içinde bulunan bir çift testis ile bu hücreleri kadın cinsel üreme organına ulaştıran iletilici yollar ve eklenti bezlerden oluşur.

İletici yollar (genital yollar), duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius ve uretra masculinadan oluşur. İletici yolların son bölümü, cinsel birleşmede erkeğin fonksiyonuna uygun olarak erkeğin cinsel birleşme organı olan penis içinde yer alır. Eklenti genital bezler; salgılarını genital yollara boşaltan, ejakulat oluşumuna katkı sağlayan ve işlevsel olarak testisin ürettiği testosterona bağımlı bezlerdir. Bunlar bir çift seminal vezikül, prostat ve iki bulbouretral bezden oluşan salgı bezleridir.

Üreme sistemi vücudun diğer sistemlerinden daha kompleks kontrol sistemleri ile idare edilir. Üreme fonksiyonları, normal feed-back sistemler yanında kişinin psişik dünyasından da fazlaca etkilenir. Psişik stresler ereksiyon mekanizmasını bozarak cinsel birleşmeyi olanaksızlaştırırken hipotalamus üzerinden hormonal kontrolü de bozarlar (25, 27, 28). Üreme organları yerleşim yerlerine göre iç ve dış üreme organları olarak iki guruba ayrılırlar.

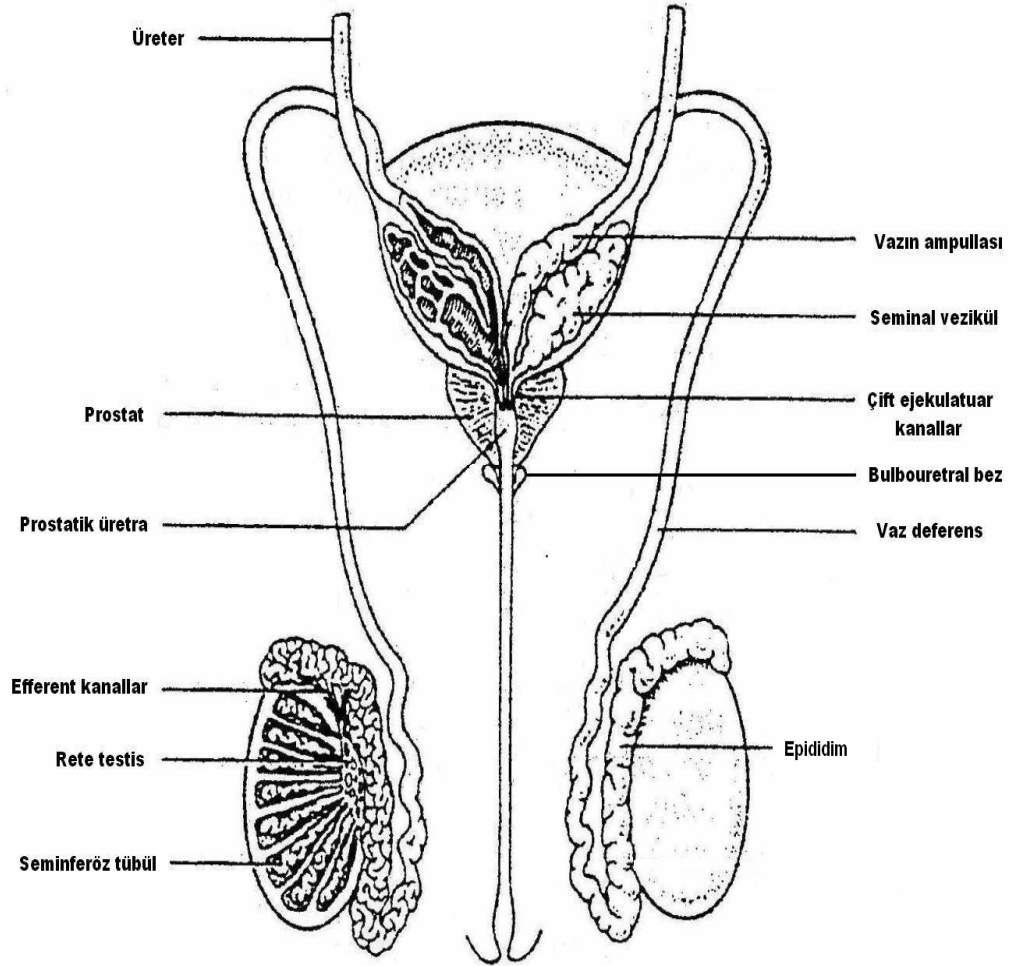
2.1.1. Erkek İç Üreme Organları

Testis (Orchis, didymis, erbezi)

Testisler erkekte temel üreme organı olup, testis torbası (scrotum) içinde yer alırlar (Şekil 1). Doğumdan önce karın boşluğunda bulunan testisler daha sonra bu torba içine inerler. Spermilerin oluşması için bu olay zorunludur. Çünkü vücut sıcaklığı sperm oluşumunu engeller. Testis torbasında sıcaklık vücuttan 4 °C düşüktür.

Testislerin;

1-Seminifer túbüllerde spermatozoon olarak bilinen erkek gametlerin oluşumunu,
2-Leydig hücrelerinde erkek seks hormonlarının sentezi, depolanması ve salgılanmasını gerçekleştirmek gibi iki önemli görevleri vardır. Seminifer túbüllerin içini kaplayan sertoli hücrelerinin ayrıca gelişen germ hücrelerine fiziksel ve beslenme desteği sağlamak, spermatogenez sırasında oluşan atık sitoplazmanın fagosite olmasını sağlamak, androjen bağlayıcı hormon, anti-müllerien hormonun (AMH) ve inhibinin sentezi ve salgılanması gibi önemli görevleri de bulunmaktadır. Spermatogenetik hücreler spermatogenez sonucunda olgunlaşırlar (25, 27, 28).



Şekil1. Erkek üreme sistemi

Spermatogenez

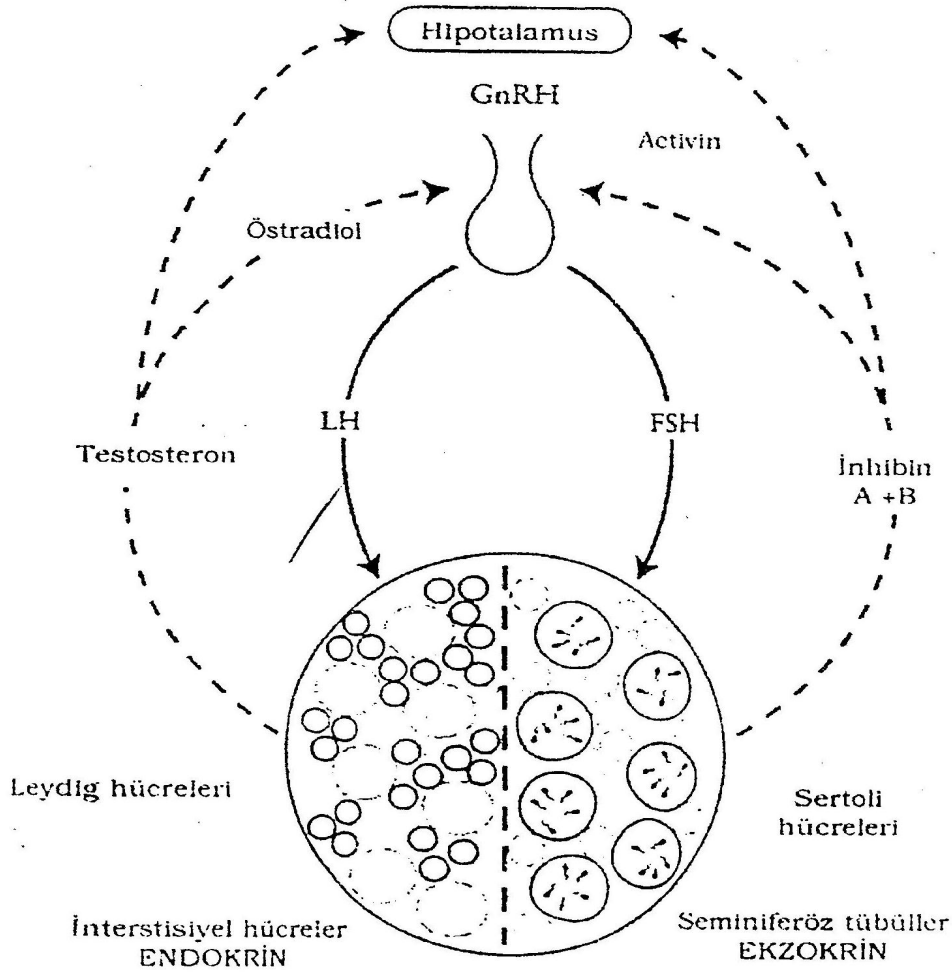
70 günlük sikluslar halindeki insan spermatogenezi pubertede başlar, yaşam boyunca sürer. Spermatogenezin başlatılması ve kontrolü hipotalamus-hipofiz işbirliği ile olmaktadır (Şekil 2).

Hipotalamusta salgılanan ve kendi portal venöz sistemi aracılığıyla taşınan gonadotropin salıcı hormon (GnRH), folikül stimule edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salgılanması için ön hipofizi uyarır. Ön hipofizden salgılanan FSH seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerini uyararak sperm üretimini sağlar (Şekil1). LH etkisiyle uyarılan Leydig hücreleri ise testosteron üretir. Gerek testosteron, gerekse FSH seminifer tübülleri etkileyerek spermatogenezi ve germ hücrelerinin maturasyonunu stimüle eder.

Spermatogenez boyunca üretilen germ hücreleri sertoli hücreleri tarafından beslenir. Seminifer tübüllerin bazal kompartımanında bulunan diploit kök hücreleri “Koyu, Tip A Spermatogonialar” olarak bilinirler ve bunlardan “Berrak, Tip B spermatogonialar” gelişir. Bu hücreler laminal kompartımana geçerek mayoz bölünme evresine ulaşırlar.

Tip B spermatogoniaların proliferasyonu sonucunda gelişen primer ve sekonder spermatositlerden daha sonra haploid kromozom yapısında spermatidler gelişir. Spermatidler spermiyogenezis evresine geçerek şekil değişimine uğrarlar. Önce uzarlar, baş kısmında bir akrozomal kep gelişir. Daha sonra da arka kısmında kuyruksu çıkıntı kuyruğa dönüşerek, oval şekilli olan spermatozoon gelişir.

Spermatozoonlar, spermiyolizis olarak bilinen bir işlem sonrasında seminifer tübüllerin içine alınırlar. Sertoli hücreleri mayoz bölünmeye yanıt olarak glikoprotein yapısında inhibin A ve B tiplerini salgılar ve bu olay da FSH salgısını sınırlandırır. Spermatogenezin bozulduğu durumlarda FSH ve LH düzeyleri yükselir (2, 25, 26).



Şekil 2. Sperm üretiminin hormonal kontrolü

Epididim (Epididymis)

Epididim (epi=üst, didymis=ikiz, testis), her bir testisin arka-üst bölümü üzerinde yerleşmiş, üst bölümü geniş (caput), aşağı bölümleri gittikçe daralan bir eklentidir(Şekil 2). Bir kanal sisteminden ibaret olan epididim rete testis'ten ductuli efferentes testis'ler ile aldığı spermatozoonları duktus deferens (vas deferens)'e iletme yanında, spermiumlar için bir olgunlaşma ve depolanma yeri olarak ta görev yapar (25, 27, 28).

Duktus Deferens (vas deferens, sperma kanalı)

Epididimin kuyruk bölümünün ucundan başlayıp, epididim kanalının devamı şeklinde uzayan, kalın kassal bir borudur (Şekil 2) ve spermiumların iletimi ile görevlidir. Epididimden spermi alıp taşıyan kordon benzeri bir kanaldır. Her bir testisten çıkan kanal prostatın arkasından yukarı çıkar ve üretraya girerek ejakülasyon kanallarını oluşturur. Vas deferense paralel giden kan damarları ve sinirler gibi diğer yapılar bir arada sperm kordonunu oluşturur (25, 27, 28).

Duktus Ejakulatorus

Duktus ejakulatorus, vas deferensin vesikula seminalisin boşaltma kanalı ile birleşmesinden sonraki terminal bölümüdür (Şekil 2). Prostat bezi içerisinde aşağıya öne doğru seyrederek üretranın prostatik parçası içine açılır. Prostat bezi içerisinde daralarak giden ejakulator kanal, duktus deferens içeriği ile vesikula seminalis salgısının karıştırılması ve lümen içeriğinin fışkırtılarak atılmasını sağlar (25).

2.1.2. Erkek Genital Eklenti Bezleri

Yaptıkları salgıları boşaltma kanalları aracılığı ile genital yollara aktaran bezlerdir. Bu bezlerin salgıları spermiumların beslenmeleri ve hareket olanaklarının artırılmaları yanında, ejakulatin sulandırılması vajinanın asiditesinin nötralizasyonunda rol oynar. Erkek üreme sistemi kapsamında vesicula seminalis, prostat, Glandula bulbourethralis eklenti bezleri vardır (25, 27, 28).

Vesikula Seminalis (Glandula vesiculosa, Meni Keseciği)

Prostat ile birlikte erkek genital organlarının aksesuar oluşumudur. (Şekil 2). Küçük bir kese şeklinde oluşmuş, bir çift organdır. Meni keseciği adı altında belirtilmesine rağmen, burada oldukça az miktarda meni depo edilir. Esas itibarıyla salgı yapan bir organdır ve bu yüzden de glandula vesiculosa adı ile de belirtilirler. Bunların yapmış oldukları salgı, spermiumların canlılığı için gereklidir. Vesicula seminalisler, spermiumları nakleden duktus deferenslerin sonuç kısımları ile dar bir boyun şeklinde birleşirler ve tek bir kanal haline geçerler. Bu birleşmeden sonra oluşan yeni kanala duktus ejakulatorus denir. Bu kanal, yaklaşık 2 cm kadarlık bir uzunluk ile prostatı geçer ve idrar kanalına (urethra) açılır. Bundan sonra erkeklerde idrar yolları ile meni yolları tek ve müşterek olarak devam eder (25, 27).

Prostat (Prostata)

Erkek dış genital organları ile ilgili spesifik salgı bezidir. Kestane şeklinde olup, urethranın arka kısmına oturmuştur. Bu şekilde kanal ile sıkı bir komşuluk içindedir. Arkadan ise rektum ile komşuluğu vardır (Şekil 2). Salgılarını urethraya akıtan, 20-25 adet bezin birleşmesi ile prostatın esas yapısı ortaya çıkar. Bunların yapmış oldukları salgı bazik reaksiyonda olup, ince akıcı bir sıvıdır (25, 28).

Glandula Bulbourethralis

Erkek dış genital organlarının spesifik bezleri içinde kabul edilen bir diğer yapı ise, glandula bulbourethralis adı verilen bezlerdir. Bunlara Cowper bezleri de denir. Yaklaşık 2-3 cm kadar olan çok ince kanalları ile, her iki bez urethranın başlangıç kısmına (pars prostatica urethra) ayrı ayrı açılırlar (Şekil 2). Koyu ve alkali özellikte salgı yaparlar. Bu salgı, ejakulasyondan önce urethraya verilir ve böylece urethra mukozası üzerindeki idrar artıkların nötralizasyonu sağlanmış olur. Cowper bezleri testosteron yokluğunda atrofiye olur (25, 27).

MENİ (ejakulat, semen, döl)

Orgazm esnasında urethranın dış deliği yolu ile dışarıya fıskırtılan karma salgı, meni olarak adlandırılır. Opak beyazımsı olan bu salgı, 2-4 ml olup, testis epididim, vesicula seminalis, prostat ve bulbouretral bezlerin salgılarının toplamıdır. %90'ı su olan bu salgının içinde spermiumlar ile spermiumların metabolizmaları için gerekli olan mineral tuzlar, proteinler, serbest amino asitler, spermin, prostoglandinler ve bol miktarda früktoz bulunur.

2-4 ml' lik meni içerisinde 300-400 milyon (60-120 milyon /ml) sperm bulunur. Hacim olarak spermiumlar ejakulatın %1'ini oluştururlar. Ejekulatın %60-70'i vesikula seminalis, %20-30'u prostat salgısı tarafından yapılır. Erkek üreme sisteminde haftalarca yaşayabilen spermiumlar, kadın üreme sistemine atıldıklarında burada ancak 2-3 gün yaşayabilirler. Ejakulasyondan 2 saat sonraki örneklerde, spermlerin %80'i hareketli oldukları halde 24 saat sonra sadece %15 oranındaki spermde hareket vardır. Spermiumların hareketli ve morfolojik olarak normal olmaları, fonksiyonları, dölleme yetenekleri açısından önemlidir. Spermler düşük ısıda saklanırlarsa, yaşamlarını ve fertilizasyon özelliklerini korurlar.

Ejakulatta 1 ml'de 60-120 milyon sperm bulunmasına normospermi, sperm sayısının 1 ml'de 20 milyonun altına düşmesi durumuna oligospermi, hiç sperm olmaması durumuna ise aspermi (azospermi) denir. Astenozoospermide sperm sayısı 20 mil/ml'nin üzerinde ve motilite %10-40, oligoastenospermide ise sperm sayısı 20 mil/ml'den az; motilite %10-40'dır. Ejekulatta canlı spermatozoa bulunmaması ise nekrozoospermi olarak adlandırılır. Normal şartlarda fertilizasyonun olabilmesi için spermatozoa sayısı, motilitesi ve canlılığı normal sınırlarda olmalıdır (25, 27, 28).

2.1.3. Erkek Dış Üreme Organları

Penis

Penis silindirik bir yapıdadır. İki önemli görevi üstlenmiştir. Bir yandan çiftleşme, öte yandan idrarı dışarıya atma işlevi bu organ tarafından sağlanır (25, 27).

Skrotum (Erbezi kesesi, torbalar)

Skrotum penisin alt kısmında yer alan, içerisinde yumurtalar ve sperm kanallarının bir kısmının bulunduğu ince kırışık derili kesedir. Testisleri sarar, korur, darbelerde ve sıkışmalarda yumurtaların zarar görmesini engeller. Skrotum testisler için bir ısı kontrol sistemi olarak görev yapar; spermlerin normal gelişmesi için testislerin vücut sıcaklığından biraz daha düşük ısıda (35°C) olması gerekir. Skrotum duvarındaki kaslar gevşeyip kasılarak testisler için uygun ısıyı sağlarlar (25, 27, 28).

2.2. Embriyoloji ve Seksüel Farklılaşma

Cinsiyet dölleme aşamasında X ya da Y kromozomunu taşıyan spermin ovumu döllemesiyle tayin edilir. Cinsiyet kromozomları (XX veya XY) gelişecek gonadın tipini belirler. 17. haftadan önce iki cinsiyetin de gonadları görünüm olarak benzerdir ve farklılaşmamış gonadlar olarak adlandırılır. Farklılaşmamış gonadlar ikili potansiyele sahiptirler, hem korteks hem de medula bölgesi testis ya da ovaryuma dönüşebilme yeteneğindedirler. Erkek fenotipinin gelişimi kompleks bir olaydır. Y kromozomu gerektirir. Bipotansiyel gonadın testise differansiyasyonu için Y kromozomunun kısa kolu kritik önem taşır. Bu kısımda testis oluşumunu indükleyen bir faktörün (Testis Determining Factor, TDF) olduğu ön görülmüş ve sonra sorumlu

gen klonlanarak SRY adı verilmiştir. SRY geni, SOX-9, SF-1 ve WT-1 gibi transkripsiyon faktörleri ile bilinmeyen bir mekanizmayla bipotansiyel gonadın testise differansiyasyonunu sağlar.

Mayoz sırasında Y kromozomu, X kromozomundan uzaklaşmak zorundadır. Bu şekilde aynı spermatozoonda X ve Y kromozomu birlikte bulunmaz. Y kromozomunun büyük parçasında Y spesifik baz dizisi vardır. Bu nedenle X kromozomuyla çift oluşturamaz. Bununla beraber Y kromozomunun küçük bir parçasının baz dizisi, X kromozomunki ile aynı baz düzenindedir. Seks kromozomları çift oluşturmamakla beraber benzer genleri ve baz dizileri arasında otozomal genlerde olduğu gibi rekombinasyon olabilir. Psödootozomal terimi, bu genler arasındaki genetik davranışı tanımlamak için kullanılır. SRY geni, Y kromozomunun bu psödootozomal bölgesine yakın bir yerde bulunur. Rekombinasyon olayı, psödootozomal bölgenin ötesine kusurlu bir şekilde yayıldığı zaman, kromozomlar arasında X ve Y spesifik DNA transferi olabilir. Bu şekilde kusurlu rekombinasyonlar sonunda SRY taşıyan X kromozomu, XX erkek fenotipinin gelişmesine neden olurken, SRY sini kaybetmiş Y kromozomu da XY dişi fenotipine neden olur (25, 29).

2.3. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri

Erkeklerde infertiliteyi oluşturan nedenler 3 grup altında incelenir:

Hormonal Nedenler

Beynin alt kısmında bulunan hipofiz bezi FSH ve LH hormonlarını salgılamaktadır (Şekil1). Bu hormonlar testislerden sperm üretimini ve erkeklik hormonu olan testosteronun salgılanmasını uyarır, incelemeler bu hormonlara ait bozuklukları veya testislerde sperm üretim bozukluğuna işaret eden hormonal değişiklikleri gösterir (19, 30, 31).

Testislere Ait Nedenler

Testislerin doğuştan normal yerine inmemesi; kasık kanalında veya karın içinde kalması sperm üretim bozukluğuna yol açan nedenlerden birisidir.

Varikosel, testisin toplardamarının anormal bir şekilde genişlemesidir. İnfertil erkeklerin %30'unda bulunmaktadır. Sıklıkla sperm hareketliliğinde düşüklüğe neden

olur. Sayı azlığı ve yapısal bozukluklar da birlikte bulunabilmektedir. Varikozel tanısı konulduktan sonra cerrahi olarak düzeltilebilir. Ancak varikozel direkt olarak infertiliteye yol açmayabileceği gibi, infertilitenin tek nedeni de olmayabilir.

Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları ve radyoterapi, sperm üretimini belirgin şekilde bozabilmektedir. Ayrıca sigara, alkol ve kafeinin sperm üretimi üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Günümüzde ileri tanı yöntemlerine rağmen, sperm parametrelerinde bozukluk saptanan erkeklerin yaklaşık %25'inde bu durumu açıklayabilecek bir neden bulunamamaktadır (31).

Sperm Taşıyıcı Kanallara ve Organlara Ait Nedenler

Testislerde üretilen sperm, epididim organından geçerek vaz deferens adındaki sperm taşıyıcı kanal aracılığı ile penise taşınır. Üretilen sperm hücrelerinin, bu sistemin herhangi bir yerinde oluşan tıkanıklıklar nedeniyle ejakulata (meni) ulaşamaması söz konusu olabilir. Enfeksiyon, travma, bu organlara veya komşu olan organlara daha önce yapılan cerrahi müdahaleler, doğuştan sperm kanalının gelişmemiş olması (konjenital vaz deferens agenezisi), prostat, vezikulo seminalis taşları varlığında testislerde sperm üretimi devam etmesine rağmen, kanal bütünlüğü bozulduğu için dışarı çıkış engellenmiş durumdadır. Nedenin araştırılması ve çeşitli cerrahi müdahale yöntemleri ile tıkanıklığın giderilmesi (vazovazostomi, vazoepididimostomi ameliyatları) ve özellikle kanalın doğuştan gelişmediği durumlarda yardımcı üreme tekniklerinden faydalanma şansı bulunmaktadır (31).

Erkek infertilitesine neden olan birçok faktör bulunmasına rağmen, bunlar vakaların yaklaşık olarak %30 ila 50'sindeki infertilite etimolojisini açıklamaktadır (idiyopatik), vakaların geriye kalan %50-70'ini açıklayamamaktadır (anidiyopatik). Bireyin idiyopatik ya da anidiyopatik olduğunun anlaşılması için klinik olarak infertilitenin çok iyi değerlendirilmesi gerekmektedir (31).

2.4. Klinik Olarak İnfertilitenin Değerlendirilmesi

1987'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) infertil çiftlerde yapılacak araştırmalar için standart bir protokol yaratmak amacı ile bir İnfertilite Tanı ve Tedavi Çalışma Gurubu oluşturmuş ve erkek kaynaklı infertilitenin tanısında standart bir yaklaşım gerekliliğini getirmiştir (2, 32- 34). Buna göre öncelikle hastanın öyküsü (hastanın tıbbi öz geçmişi) alındıktan sonra fizik muayeneye tabii tutulur. Ayrıca hasta semen (meni), idrar, hormon analizi gibi laboratuvar testlerine ve ultrasonografiye tabii tutulur. Tüm bu araştırmalar sonucunda olgunun infertilitesi belli bir organik nedene bağlanmazsa, yani olguda idiyopatik infertilite varsa, genetik faktörlerin araştırılmasına gerek vardır.

2.5. Erkek Üreme Bozukluğunun Genetiği:

Erkek infertilitesinde genetik nedenlerin belirlenmesi çok önemlidir. Çiftler arasındaki üreme problemlerinin %30-50'sinin genetik bozukluklar olduğu ve bunun yaklaşık olarak % 10-15'inin de erkek kaynaklı olduğu düşünölmektedir (20, 24, 30, 34,35). Genetik bozukluklar, kalıtsal etkenin türüne göre üç sınıfa ayrılırlar, bunlar; kromozomal bozukluklar, tek gen bozuklukları ve multifaktoriyel bozukluklardır

2.5.1. Kromozomal Bozuklular (karyotip anomalileri)

Normalde 46 ($2n=46$) olan insan kromozomları sayısal, yapısal ve hem sayısal, hem de yapısal bakımından değişiklikler gösterebilir ki, bu durum kromozomal hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (36).

Klinefelter Sendromu:

Klinefelter sendromu NOA'lı (nonobstrüktif azospermi) olgularda bulunan en sık genetik bozukluktur ve ekstra bir X kromozomu vardır. Yaklaşık 1/500 erkekte görülür ve mayoz sırasında X kromozomunun ayrılmaması sonucu gelişir. İki ebeveyn gametlerinden biri ek olarak bir adet X kromozomu taşımaktadır. En şiddetli fenotipik bozukluğun yaşandığı Klinefelter erkeği, virilizasyon eksikliğine bağlı olarak puberteye ulaşmamaktadır. Olguların spermatogenik ve androjenik aksları tümü ile hatalıdır. Testisleri küçük, seminifer tubülleri sklerotiktir. Leydig hücreleri hipertrofik ve nonfonksiyoneldir.

Klinefelter sendromlu olgularda tüm genetik olumsuzluklarla birlikte geniş bir fenotipik spektrumu vardır. Hafif spektrumlu genç erişkinlerin yaklaşık % 50'sinde TESE (testiküler sperm ekstraksiyonu) ile sperm bulunabilir. Elde edilen spermler ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) ile gebelik oluşturabilir.

Klinefelter sendromlu erkekler, meme kanseri ve osteoporoz açısından daha fazla risk altındadır. Bu nedenle sendromun tanısının konulması sadece reproduktif sağlık için değil, aynı zamanda hastanın uzun dönem genel sağlığı için de önemlidir (29).

46,XX Erkek Sendromu:

Normalde X ve Y kromozomları mayoz bölünmede Xp ve Yp'deki psödootozomal bölgelere sınırlı kalarak karşılıklı dizi alışverişi yaparken, nadir durumlarda genetik rekombinasyon psödootozomal bölgelerin dışına taşar ve iki çok nadir, ancak çok değerli bilgiler veren duruma yol açar; XX erkekler ve XY dişiler. XX erkekler, karyotipi 46,XX olan ve genellikle X kromozomunun kısa koluna transloke olmuş Y kromozom dizileri taşıyan fenotipik erkeklerdir. Bu küçük parça primitif gonadın gelişeceği yeri belirleyen genetik kaskadlarda kritik rol oynayan SRY genini içerebilir. Eğer SRY varsa bipotansiyel gonad testiküler çizgide gelişir. 46 XX erkek karyotipi tanısı alan erkeklerde TESE başarılı olamaz. Dolayısı ile cerrahi girişim yapılacak hastada ilk olarak bu tanıyı oluşturmak gerekir (29, 36).

İzodisentrik Y kromozom, Ring Y kromozomları, kısalmış Y kromozomları ve translokasyonlar gibi diğer anomaliler spermatogenik eksikliği olan erkeklerin küçük bir yüzdesinde bulunur.

Translokasyonlar (resiprokal translokasyon, sentrik kaynaşma tipi translokasyon, insersiyonel translokasyon), NOA'lı erkeklerin % 1-3'ünde bulunur. Preimplantasyon genetik görüntüleme, normal ve kromozomal olarak dengeli embriyo transferine olanak sağlayarak çiftin sağlıklı gebelik yeteneklerini çoğaltabilir. Sperm eldesi yapılacak ciddi oligospermik ya da NOA'lı olgularda Y kromozom mikrolezyon çalışması ve karyotip araştırması mutlaka yapılmalıdır. Bu tetkikler gereksiz girişimleri önler ve çiftlere bilgi vererek seçim yapmalarına yardımcı olur (37).

2.5.2. Tek Gen Bozuklukları

Mendel bozuklukları olarak bilinmektedir. Bir genetik lokustaki bir mutant allel veya bir çift mutant allel sonucu ortaya çıkarlar. Bu bozukluklar nesilden nesile aktarılabilir. Aktarılan bozukluklardaki geçiş modelleri basittir ve otozomal dominant (OD), otozomal resesif (OR), X'e bağlı dominant ve X'e bağlı resesif olarak kalıtılırlar.

Konjenital Bilateral Vas Deferens Agenesisi:

CBAVD, infertil erkeklerin yaklaşık % 1'inde bulunur ve obstruktif azospermik olgularda en çok konulan tanılardan biridir. Testisler normal boyutlarda, vas deferensler palpe edilemez ve epididim kalıntıları bulunur. Seminal keseler agenetik veya aplastik olduğu için ejakülata katkısı yoktur ve seminal volüm düşük (<1 ml) ve PH asidiktir (<7). Ejakülat sadece prostatik sekresyonlardan oluşur. Bu çiftlerde tedavi için mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu (MESA) ve ICSI birlikte uygulanır (38, 39).

CF Geninin (Kistik Fibrosiz) Rolü:

CF, CBAVD için iki ana genetik etimolojiden biridir. Güney Avrupa'da 1600 kişiden birinde görülen otozomal resesif bir hastalıktır. CF geni 7. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Bu gen respiratuvar sistem ve pankreatik kanalların epitelyal membranından Na ve Cl iyonlarının geçişini düzenleyen CFTR denilen transmembran proteinini üretir. CF'nin en sık görülen mutasyonu Delta F508'dir ve CF kromozomlarının % 60'ında oluşur. Yüz kadar diğer mutasyonlar tanımlanmıştır ancak daha seyreklerdir. Hastalığın ortaya çıkışı için anne ve babadan gelen allel genlerde mutasyonlar oluşmalıdır. Eğer sadece bir allel gen etkilenmiş ise kişi klinik olarak sağlıklıdır ve taşıyıcı olarak tanımlanır.

CF'li tüm erkeklerde vazal aplazi ve infertilite vardır. Her iki ebeveynden gelen mutasyonlar ciddi olursa, olguda klinik olarak en ciddi formlu CF gelişir. Kombine olarak iki mutasyonda daha az ciddi veya orta düzeyde ise pulmoner ve pankreatik sistemler klinik olarak etkilenmeyebilir ve vazal agenezi gözlenen tek klinik durum olabilir. CBAVD'li erkeklerin hepsi için girişim öncesinde CF mutasyon analizine gerek vardır. Olgu, anne ve babasından kazandığı CF mutasyonları ile karşılaşan ailedeki ilk kişi olabilir. Bu nedenle ailenin taranması gereklidir. Sadece CF'li

hastalarda değil, aynı zamanda CBAVD'li hastalarda da mutasyonlar için hem hastayı hem eşini test etmek gereklidir (38, 39).

Mezonefrik Kanal Anomalilerinin Rolü:

CBVAD için 2. bir genetik etimoloji mezonefrik kanalların anormal deformasyonudur. Yedinci haftada 2 yöne doğru gelişen mezonefrik kanaldan birinci yön olarak üreter ve böbrek, ikinci yön olarak reproduktif kanal gelişir. Eğer 7. haftadan önce genetik aberasyon mezonefrik kanal farklılaşmasını etkilerse hem renal hem reproduktif duktal agenezi oluşur ve bebek birkaç hafta sonra ölür. Bilateral renal agenizili ve CBAVD'li hastalarda CF mutasyonları yoktur. Bu çiftlerin herhangi bir çocuklarının bilateral renal ageneziye maruz kalabileceği belirtilmelidir. Normal renal anatomili çocuk sahibi olmak, unilateral veya bilateral renal agenizili çocuk sahibi olmaktan daha iyidir. Bu çiftler için cesaretlendirici olmaktadır ama erken gebelikte USG (Ultrasonografi) ile kontrol yapılmalıdır (38, 39).

2.5.3. Multifaktoriyel Kalıtsal Bozukluklar

Çok genli kalıtım gösteren özellik ya da hastalıklar için çevrenin etkisi oldukça büyük olur, fenotip bu iki birimin etkileşimi sonucu ortaya çıkar ve pek çok fenotipik çeşitlenmeler görülür. Bu bakımdan multifaktoriyel ya da çok etkenli kalıtım olarak adlandırılır. Örneğin; çok sık rastlanan erişkin bireylerde gözlenen insuline bağımlı diabetes mellitus multifaktoriyel kalıtım gösterir. Yarık dudak, düztabanlılık gibi konjenital malformasyonlar da multifaktoriyel kalıtımda sık rastlanan örneklerdir (3, 36).

Erkek infertilitesine neden olan genetik faktörlü hastalıklar pre-testiküler, testiküler ve post-testiküler olarak sınıflandırmak mümkündür. Buna göre;

Pre-testiküler;

- Kalman's sendromu
- Prader-Willi sendromu
- Bardet-Bield sendromu
- β talesemia

Testiküler;

- Klinefelter sendromu
- XYY sendromu
- Y kromozomunda AZF gen bölgesinde delesyon
- Noonan's sendromu
- Myotonik distrofi

Post-testiküler

- Kistik fibrosiz
- Young's sendromu
- İmmolite cilia sendromu
- Androjen insensitivity sendromu

İnfertiliteye neden olan testiküler kaynaklı kromozomal anormallikler göz önüne alınacak olursa Y kromozomunun yapısı ve rolü moleküler düzeydeki çalışmalarla daha iyi açıklanabilmektedir (3, 40).

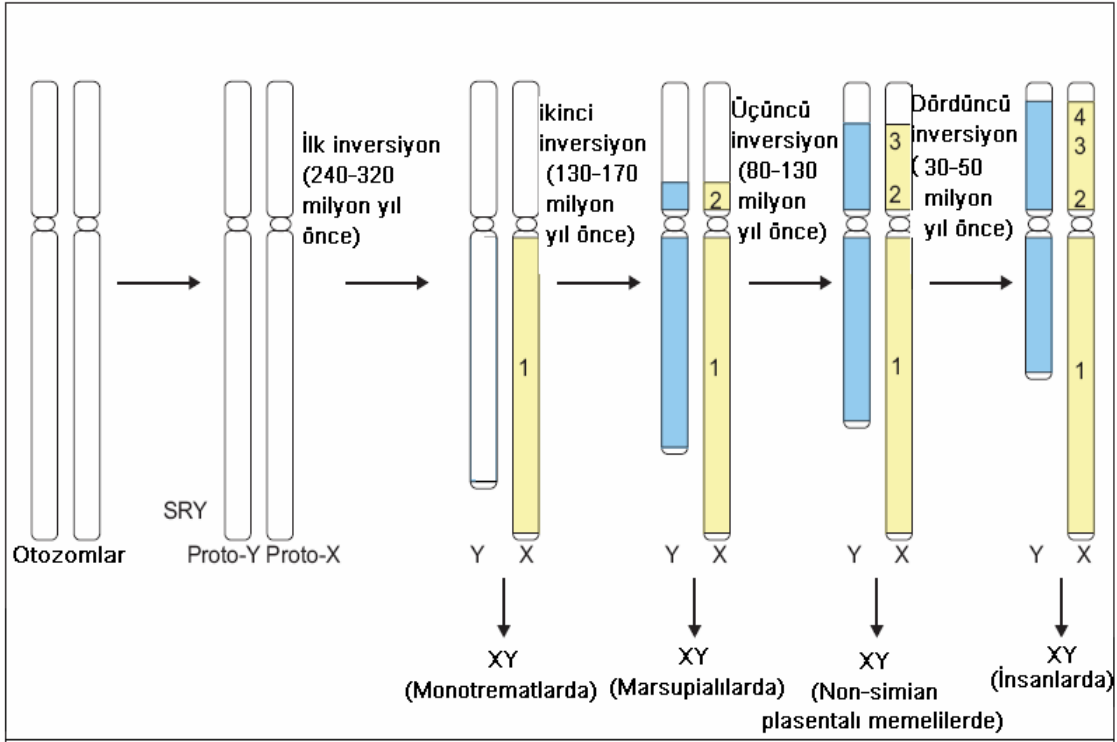
2.6. Y Kromozomunun Evrimi ve Yapısı

X ve Y kromozomları, memelilerin ortaya çıkmasından çok önce (300 milyon yıl) sürüngenlerin identik kromozom çiftinden ortaya çıkmıştır. Bu kromozomlardaki genler seks belirleyici çevresel uyarıcıların etkisi altında kalmıştır. Bu durum günümüzde hala bazı belirli sürüngenlerde görülmektedir (18, 41). Bu genler uzun bir süre içinde mutasyonlara uğramış, bu durum da çevresel uyarılara verilen yanıtlarda kayıplara yol açmıştır. Memelilerde seks kromozomları SRY geninin memeli X kromozomu üzerindeki yapısal bir homolog olan SOX3 geninden farklılaşması ile ortaya çıkar (Şekil 3) (18, 41, 42).

Karşılaştırmalı zincir analizleri SRY ve SOX3 genlerinin progenitor bir genden geldiğini, buna karşılık daha fazla evrim geçirmiş olan SRY'nin erkek belirleyici fonksiyon kazandığı ve bunu sürdürdüğünü göstermiştir (18, 19, 42, 43). Proto-SOX3/SRY geninin baskın ve penetran seks belirleyici allelinin, bir otozom çifti seks kromozomu haline çevirdiği kabul edilir. X ve Y kromozomlarının birbirinden ayrılması sırasında X kromozomunun temel yapısında birçok küçük değişiklikler meydana gelmiştir. Y kromozomunda ise süratli dejenerasyonlar ortaya çıkmıştır (18, 43, 44, 45, 46, 47). Ayrıca Y kromozomu üzerindeki blok mutasyonlar ve bunun ardından da

Y kromozomunun büyük bir kısmının geniş ölçekli inversiyon geçirmesi, X kromozomunun büyük bölgeleri ile Y kromozomunun çok daha küçük bölgeleri arasında non-rekombinasyon oluşmasına yol açmıştır (43, 44, 45, 48). Zararlı mutasyonların meydana gelmesi halinde, uygun gen çiftleri sadece rekombinasyon ile yenileneceği için (Muller ratchet), Y link genlerin yıkılışından X ve Y kromozomu arasında rekombinasyon olmamasının sorumlu olduğu düşünülmüştür. Görünürde çok cazip olan bu fikir Y kromozomunun X'in 1/3'ünden küçük oluşunu açıklar (43, 44, 45, 48). Y kromozomunun uzun koluna özgü birçok farklı gen ailesini bünyesinde barındıran palindromlar ile ilgili yapılan son tanımlama ve sık gen konversiyonu uzun süre içinde Y kromozomunun progresif yıkımı hakkında şüphe uyandırmıştır (43, 46, 47, 49, 50). Y kromozomu spermatogenez için esas olan genler de dahil olmak üzere, evölüsyon sırasında testise özgü çok sayıda gen kazanmıştır (51, 52). Bunlardan herhangi birinin delesyonu infertiliteye sebep olabilir (18, 19, 53, 43, 50). Bazı çalışmalar Y kromozomunun uzun kolundaki artışların (Yq+) abortuslara neden olabileceğini de ileri sürmüştür (43, 54, 55, 56, 57).

Evrin boyunca erkek birey farklılaşması için gerekli genlerin Y kromozomuna göç ettiği varsayılır. Normalde otozomal genler mitotik bölünme sırasında eşlenikleri sayesinde DNA tamirine girebilirken, Y kromozomu üzerindeki genlerin eşleniği olmadığından tamir mekanizması devreye giremez. Bu Y genlerinden bir çok kopya olmasına neden olur (43). Spermatogenez için kritik genlerin çoklu kopyası olması avantajdır. Çünkü yıkıcı mutasyonlar sonucu yetersiz üretilen proteinlerin miktarı bu şekilde artırılmış olur (23, 43).



Şekil 3. İnsan Seks kromozomlarının evrimi (Bachtrog ve Charlesworth 2001'den değiştirilerek) (43).

İnsanda otozomal kromozomlar homomorfik iken X ve Y kromozomu heteromorfiktir. X kromozomu yaklaşık 165 Mb'lık DNA içeren submetasentrik kromozomdur. Buna karşılık Y kromozomu X'e göre daha küçük olup ortalama büyüklüğü 60 milyon baz çifti (bc) olarak tahmin edilen akrosentrik bir kromozomdur ve insan haploid genomunun yaklaşık %2-3'ünü oluşturmaktadır (20, 41, 43). Otozomlara ve X kromozomuna kıyasla Y kromozomu gen yönünden fakirdir. İnsan X kromozomu ortalama 4000 sayıda önemli genler içermektedir. Buna karşılık Y kromozomunun küçük bir oranı genetik olarak inert ve çok sayıda tekrar eden kodlanmayan DNA içermektedir. Sadece çok az gen Y kromozomu üzerinde fonksiyoneldir. Bu genlerin bazıları da X kromozomu üzerindeki genlerle homoloji gösterir (Şekil 4). Bazıları ise sadece Y'ye özel olup, testiste ifade olan genlerdir. Y kromozomu 78 proteini kodladığı sanılan en az 156 transkripsiyon ünitesi ve pseudogenler içerir (18). Bu kromozom sınırlı sayıda işlevsel gen taşımaya karşılık sık tekrarlayan elemanlar içerir (20, 22, 24, 30, 43, 49, 56, 58, 59, 60).

Y kromozomunun kısa (Yp) ve uzun (Yq) kollarının üzerinde sırasıyla major psödootozomal bölge (PAR1) ve minör psödootozomal bölge (PAR2) ve X kromozomu üzerinde ise bunların homologları vardır (şekil 4, 5, 6). PAR1; X ve Y kromozomunun kısa kolunun en uç noktası en önemli psödootozomal bölgedir. PAR1 yaklaşık 2.6 Mb'lık DNA içerir. Bu bölgenin zorunlu kros-over alanı olup, erkek bireyde mayoz sırasında doğru mayotik segregasyon için gerekli olduğu düşünülür. Bu küçük bölgede rekombinasyonun sıklığı yüksektir (%28). PAR2; X ve Y kromozomunun uzun kollarının uç kısmında yaklaşık 320 kb'lık bir bölgedir. Bu bölgedeki homologlar arasındaki rekombinasyon PAR1 bölgesindeki kadar sık değildir. PAR2 erkek bireyde mayoz için ne etkili ne de gereklidir (18, 43).

Bu bölgeler olmazsa Y kromozomunun diğer hiçbir kısmı mayotik rekombinasyona katılmaz. Dolayısıyla bu durum da Y kromozomunun yaklaşık % 95'ini nonrekombine halde bırakır (3). Y kromozomunun % 95'ini oluşturan bu bölgeye rekombinasyona uğramayan bölge (NRY: non-recombining region') ya da Y'nin erkek spesifik bölgesi (MSY: male specific region) adı verilir (şekil 5). NRY, X ya da Y kromozomu üzerindeki bölgelerle homolog olan intra-kromozomal tekrarlayan elementler içerir (18, 43, 49, 61). NRY bölgesi ökromatik, sentromerik ve heterokromatik olmak üzere 3 bölgeden oluşur (61). Ökromatik bölge sitogenetik olarak Y kromozomunun Yq11 bölgesinin Yq11.21, Yq11.22, Yq11.23 alt bölgelerinde bulunur ve yaklaşık olarak 24 Mb uzunluğundadır. Heterokromatik Yq12 bölgesi ise 30 Mb uzunluğunda olup DYZ1 ve DYZ2 adında iki büyük tekrarlayan zincir içermektedir (6, 9, 18, 20, 61, 62, 63).

Bazı araştırmacılar ise Y kromozomunu;

- (i) psödootozomal sınır bölgesi (PABY),
- (ii) kısa kol üzerindeki perisentrik bölge (seks belirleyici geni -SRY- içerir),
- (iii) proksimal uzun kol üzerinde bulunan ökromatik bölge (DYS1),
- (iv) distal uzun kol üzerinde bulunan heterokromatik bölge (DYZ1) ve
- (v) önemli DYZ3 bölgeye ayırmışlardır (56). DYZ3 bölgesi sentromerik zincirleri bünyesinde bulundurduğu için Y kromozomunun yaşamını sürdürmesi ve çoğalması için hayati öneme sahiptir.

Fonksiyon	Kopya sayısı	Genler	Genler	Kopya sayısı	Fonksiyon
			PAR		
Transcription factor - sex determination	1	<i>SRY</i>	1	<i>RPS4Y</i>	1 Protein of small ribosomal subunit
Testis transcript 1	m	<i>TTY1</i>	2	<i>ZFY</i>	1 Zinc finger transcription factor
Cyclin B binding protein	m	<i>TSPY</i>	3	<i>PCDHY</i>	1 Protocadherin - cell adhesion
Protein tyrosine phosphatase	m	<i>PRY</i>	4A	<i>PRKY</i>	1 Ser/Thr protein kinase
Testis transcript 1	m	<i>TTY1</i>		<i>AMELY</i>	1 Tooth enamel formation
Testis transcript 2	m	<i>TTY2</i>			
Cyclin B binding protein	m	<i>TSPY</i>			
			4B	Sentromer	
			5	<i>USP9Y</i>	1 Deubiquinating enzyme
				<i>DBY</i>	1 DEAD-box - RNA helicase
				<i>UTY</i>	1 TPR-motif
				<i>TB4Y</i>	1 Actin sequestration
Chromodomain protein	m	<i>CDY</i>		<i>VCY</i>	2 Variable charged protein
Membrane transport protein	m	<i>XKRY</i>		<i>SMCY</i>	1 Transcription factor
			6	<i>EIF1AY</i>	1 Translation initiation factor
Protein tyrosine phosphatase	m	<i>PRY</i>		<i>RBMY</i>	30 RNA-binding protein
Testis transcript 2	m	<i>TTY2</i>		<i>RBMY</i>	30 RNA-binding protein
RNA-binding protein	4	<i>DAZ</i>			
Basic protein	m	<i>BPY2</i>			
Protein tyrosine phosphatase	m	<i>PRY</i>			
Chromodomain protein	m	<i>CDY</i>			
X üzerinde bulunmayan Y kromozom genleri			7	Heterokromatin	
			PAR	X üzerinde homoloğu bulunan y kromozom genleri	

Şekil 4. Y kromozomunun rekombinasyona katılmayan bölgedeki (NRY) genler (Bachtrog ve Charlesworth 2001'den değiştirilerek) (43).

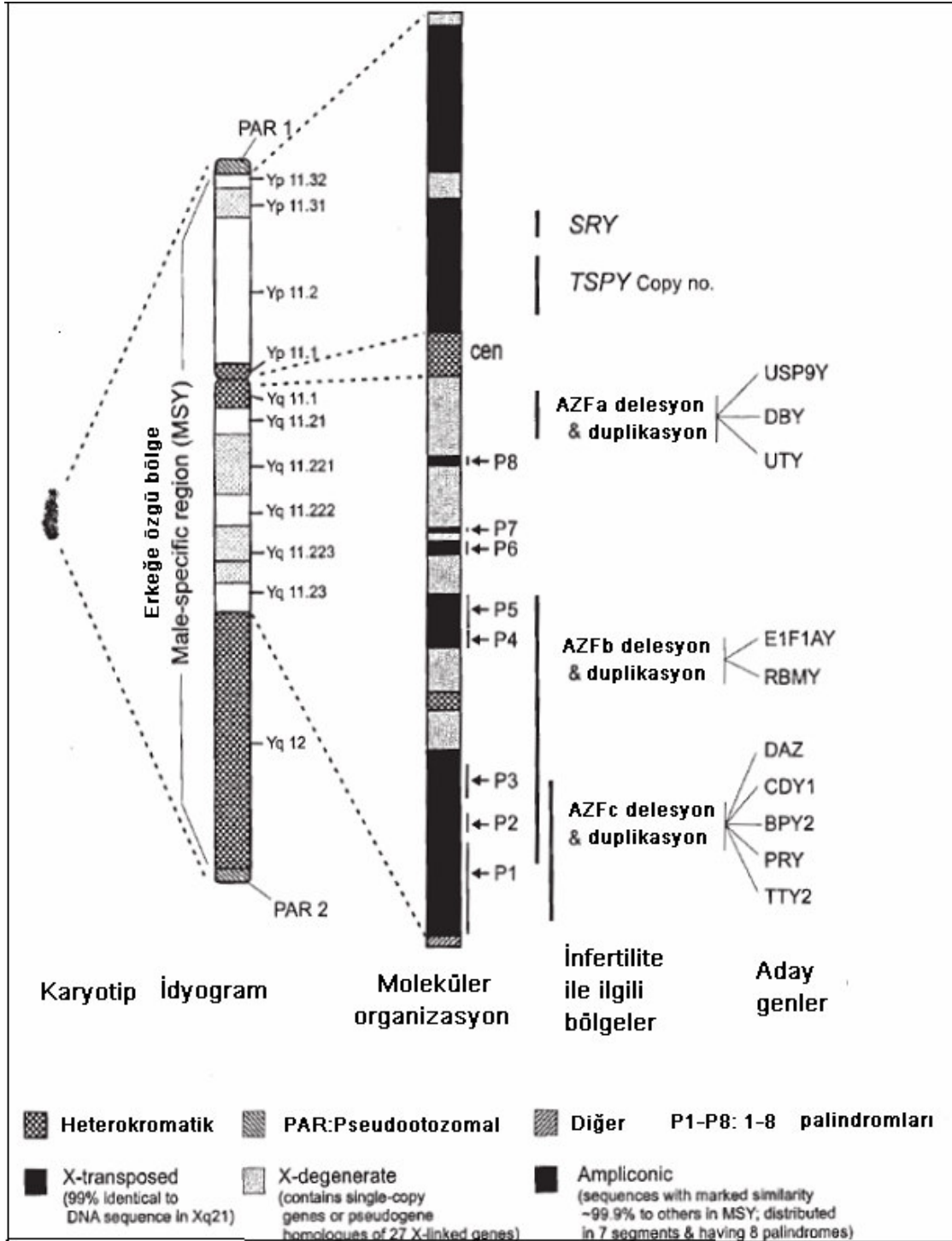
Y kromozomunun fertilitte üzerindeki etkisi iki şekilde görülmekte ve her iki etkide spermatogenezis üzerinde rol oynamaktadır.

I. Mayoz bölünme sırasında X kromozomu ile Y kromozomu eşleşmekte ve böylece bölünmenin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu eşleşmenin olmaması mayoz bölünmenin daha ileri aşamalara geçmesini önlemekte ve dolayısıyla spermatogenezis engellenmektedir.

II. Özellikle Y kromozomunun uzun kolunda yer alan kromozomal bölgelerdeki kayıp ya da değişiklikler sonucu genlerin fonksiyonlarını kaybetmesi spermatogenezisi olumsuz yönde etkilemektedir.

Her iki durumda da sperm sayısında meydana gelen azalma nedeni ile infertilite ortaya çıkmaktadır (azospermi ve oligospermi) (3, 4).

Erkek infertilitesi, Y kromozomundaki ve otozomal genlerdeki mutasyonlara, ayrıca parakrin kontrol da dahil olmak üzere pek çok fiziksel ve fizyolojik yetersizliklere bağlanır. Y kromozom translokasyonuna sahip erkeklerde yapılan sitogenetik çalışmalar; Y kromozomunun uzun kolu üzerinde bir bölgenin spermatogenezde önemli rolü olduğunu göstermiştir. Bu bölge, normal spermatogenezde önemli gen ya da genleri kapsayan azospermi faktörü (AZF) içerir (5, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 30, 16, 58, 59, 60, 61, 62, 63).



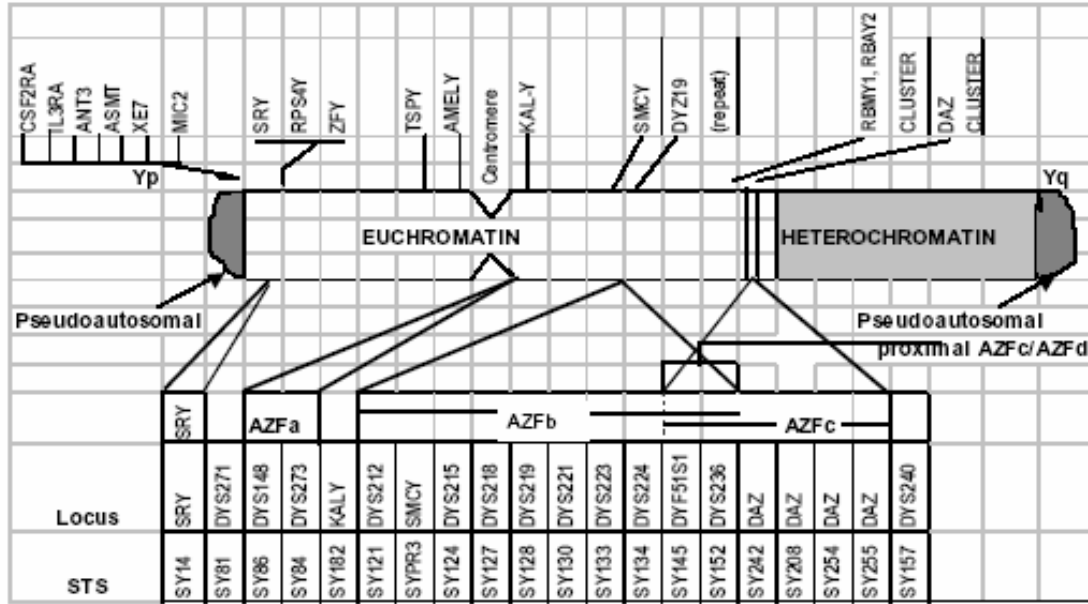
Şekil 5. Y kromozomunun yapısı (Singh ve ark. 2005'den değiştirilerek) (18).

2.7. Y Kromozomu ve AZF

İlk olarak spermatogenezdeki bozukluklar ile genetik yapı arasındaki ilişkilerin temeli 1976 yılında Tiepolo ve Zufferdi tarafından yapılan infertil erkeklerdeki sitogenetik çalışmalarla atılmıştır (64). Daha sonra moleküler düzeydeki tekniklerin kullanılması ile 1988'de Anderson ve arkadaşları Y kromozomunun uzun kolunda AZF (Azospermik faktör) bölgesini tanımlamıştır. 1992'de Foresta ve arkadaşları tarafından PCR tekniği kullanılarak Y kromozomunun STS (Sekans hedef alan)'lerle haritalanmasında önemli gelişmeler elde edilmiştir (20, 24, 30, 59, 65).

AZF bölgesi ilk olarak Yq11.23 bandı üzerinde altıncı aralığa haritalanmıştır ve 5 milyon baz çifti içerir (5, 15, 19, 20, 23, 59, 60, 63). AZF bölgesi mikrolelesyonları azospermi ya da ileri derecede oligospermi ile karakterize olan erkek infertilitesinden sorumludur ve bu mikrolelesyonlar testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ve ICSI ile yeni jenerasyona geçebilir (5, 19, 21, 66). 1996'da Vogt ve arkadaşları 370 azospermik ya da ileri derecede oligospermik olan erkek DNA'larının incelenmesi sonucu Yq11 bölgesinde 5. ve 6. aralığa yayılan 3 farklı bölge tanımlamıştır; AZFa, AZFb ve AZFc (12) (Şekil 5). Yakın zamanlarda AZFb ve AZFc bölgeleri arasında yeni bir AZF bölgesi olan ve bazı kaynaklarda AZFc proksimal bölgesi olarak da kabul edilen AZFd rapor edilmiştir (18, 20, 22, 24, 30, 37, 63, 67) (Şekil 6).

AZFb ve AZFc bölgelerini kapsayan Y kromozomunun uzun kolu üzerindeki palindromik komplekslerin tanımlanması ve AZFa bölgesine komşu endojen retrovirüs HERV15 sınıfının tespiti, azospermik faktörün organizasyonunu anlamamızı kolaylaştırmıştır. Birçok gen ve onların kopyalarını içine alan AZFb ve AZFc bölgelerinin birbiri ile örtüştüğü gösterilmiştir. Bununla birlikte AZF ile ilgili ayrıntılar bilinmediği takdirde infertil erkekteki prevalan mutasyonların tipleri ya da genlerin kesin sayısı ile ilgili bilgiler elde edilemez. Aynı şekilde Y kromozomu üzerinde tekrarlayan zincirlerle yakın ilişki içinde bulunan tekrarlayıcı DNA'ların çok miktardaki varlığının rolü henüz açıklığa kavuşmamıştır. İnfertilite olgularında tekrarlayan elemanların kayıp ve kazançları ile ilgili sistematik araştırmalar, bu elemanların biyolojik rollerini anlamamıza yardımcı olur (57).



Şekil 6. Y Kromozom haritası (Kent-First ve ark. 1999'dan değiştirilerek) (67).

Y kromozomundaki çeşitli tekrarlayan elemanların yapısal organizasyonları ile ilgili klinik çalışmalar, onların biyolojik rollerini anlamamızı kolaylaştırmıştır. Bu görüş, azospermik faktörü (AZF) içeren Y kromozomunun uzun kolundaki P1–P8 palindromik (ters simetrik) komplekslerle ilgili en son tanımlamalarla desteklenmektedir (Şekil 5). Bu palindromik zincirlerin delesyonu spermatogenetik yetmezlik ile sonuçlanır (15, 16, 18, 19, 20, 30, 57, 58, 59, 60, 63). Bu palindromik komplekslerle ilgili yapılan yoğun STS (Sequence Tagged Sites) analizleri AZFb ve AZFc bölgelerinin daha önce rapor edildiği gibi (18) bağımsız olmadığını, örtüşme gösterdiğini ortaya koymuştur (18, 57). Bununla birlikte yaklaşık 0.8 Mb zincir büyüklüğündeki AZFa bölgesi AZFb ve AZFc bölgelerinden bağımsızdır. Bu yorucu çalışmalara rağmen her bir genin erkek infertilitesinden sorumlu olup olmadığı hala kesin değildir. İnsanlarda küçük, fakat hala saptanmamış delesyonlarla ilgili analizler spermatogenezin düzenlenmesinde rol oynayan gen ailelerinin ve her bir genin rolünü meydana çıkarmıştır. Çalışmalar, azospermik erkekte Y kromozom USP9Y genindeki de novo nokta mutasyonu göstermiştir (18). Y bağımlı zincirlerin yanı sıra sinyal transdüksiyonunda rol oynayan protoonkogen(ler)deki ya da parakrin sistemi kontrol eden otozomal genlerdeki bozukluklar da infertiliteye neden olabilir (57).

İnsan Y kromozomu yapısal organizasyonu denetleyen ideal bir ortam, evrimsel bir dağılım ve heterokromatini meydana getiren, tekrarlanan DNA ile ilgili çeşitli kategorilere dair muhtemel fonksiyonları sağlar. Heterokromatik (tekrarlayan) DNA, fonksiyonel rolü olmadığına, zararlı mutasyonları emerek genik kısmı koruyan Stuffer adını alır (57).

Y kromozomu alfoid tekrarlar, büyük insan SINE (alu tekrarları) ve birçok ek uydu zincir ailelerinden meydana gelir. Alfoid zincirler, birbiri ardına dizilmiş bir şekilde Y kromozomu üzerinde bulunan sentromere yakın bir yerde kümelenirler ve diğer kromozomlar üzerinde bulunanlardan kolaylıkla ayırt edilebilirler. Alu tekrarlarının çoğu genomik konsensus Alu tekrarları ile çok az benzerliğe sahiptir. Aksine Y LINE tekrarlamaları diğer kromozomlar üzerinde görülenlerden ayırt edilemez. Bu nedenle Y kromozomu Alu tekrar zincirleri, diğer erkek spesifik (heteromorfik) zincirlerle birlikte evrim geçirmişlerdir. Seksin belirlenmesi sırasında aynı şeyler söz konusu olmasa bile bu tip iki zincir belirlenmiştir (57, 68).

2.8. Y Kromozomuna Özgü Tekrarlamalar; DYZ1 ve DYZ2

Y kromozomunda sentromerik ve heterokromatik bölgelerde kümeleşmiş alfoid tekrarlar ailesine ek olarak, genomik DNA'nın HaellI parçasında 3.4 ve 2.1 kb'lık tekrarlayan fragmanlar saptanmıştır (49, 68). DYZ1 uydu fraksiyonunu temsil eden 3.4 kb'lık parçacık, bir tek sırasında pentamerik "5TTCCA3" tekrarları baskın olarak barındırır ve normal insan Y kromozomunda bu sıraların yaklaşık 800-4000 kopyasının bulunduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte DYZ1 kopya sayı değişikliklerinin Y kromozomunun normal fonksiyonları ile herhangi bir ilişkisinin olup olmadığı ve spermatogenez, erkek fertilitesi ya da genel erkek reproduktif potansiyelinde rol oynayıp oynamadıkları kesin değildir (57, 68).

2.9. Y Kromozomu Üzerinde Bulunan Genler ve Erkek İnfertilitesi

29 Aralık 2002 tarihine kadar sembolleri, takma adları, giriş kodları ve sitogenetik haritadaki pozisyonları ile birlikte toplam 107 gen veri tabanında sıralanmışlardır. Bununla birlikte son çalışmalar bu konu ile ilgili daha çok bilgi sağlamıştır. Şu anda "Y'nin erkek spesifik bölgesi" (MSY) olarak adlandırılan Y kromozomunun non-rekombine bölgesinin (NRY) % 95'inde yarısının (78) proteinleri

kodladığından şüphe edilen en az 156 transkripsiyon ünitesi mevcuttur. MSY'de 27 ayrı protein ve protein ailesi tanımlanmıştır. Bunlardan 12'si diğer dokularda da mevcuttur ancak 11 tanesi sadece testislerde bulunmaktadır (18, 57). Y kromozomu üzerinde, bir (TGIF2LY), iki (VCK, XKRY, HSFY, PRY), üç (BPY2), dört (CDY, DAZ), altı (RBMY) ve yaklaşık otuz beş kadar (TSPY) tekrarları şeklinde testise özgü genler mevcuttur. Kopya sayıları bir tek Y'nin tam zincir analizi ile ortaya konmuştur (50). Bunların sayıları diğer bir Y kromozomunda farklı olabilir. Bu genlerin AZF faktörünü kapsayan proksimal ve distal palindromik komplekslerde yerleşmiş olup spermatogenetik yetmezliğe yol açan masif delesyonlar gösterdiği saptanmıştır (21). Toplam 23 testis spesifik kopya (TTY1-23) tanımlanmıştır. Bunlardan palindromik kompleksle ilgili 3,4,5,6,9,10,13 ve 14 spermatogenetik yetmezliği olan hastalarda delesyonlar göstermiştir. Daha önceleri TTY1-23 kopyalarının testise özgü olduğu düşünülürken, son çalışmalar TTY4'ün prostat ve testiste, TTY10'un testis, prostat ve fetal beyinde, TTY14'ün de testis, böbrek ve fetal beyinde salgılandığını göstermiştir (17). TTY1, TTY2, TTY6, TTY7, TTY8, TTY18, TTY19, TTY21 ve TTY22 kopyalarının kodlanmamış olduğu rapor edilmiştir. Böylece, bazı tekrarların testise özgü olduğu ve fertilitiyi düzenlemekte biyolojik rolleri olduğu, hâlbuki diğerlerinin belirgin biyolojik rollerinin olmadığı kabul edilmektedir (18, 57).

Tüm erkeklerin yaklaşık % 5-10'unda sperm üretiminde ciddi defektler mevcuttur. Bu olguların çoğunda infertilite, bilinen nedenlere bağlanamaz (idiyopatik infertilite). Germ hücrelerinin total yokluğu (azospermi) ya da ciddi oligospermi ($<1 \times 10^6$ sperm/ml) ile ilgili delesyonların (mikrodelesyon) büyük bir çoğunluğu sitogenetik olarak saptanamazlar. Ender olgularda, ciddi oligospermi olguları delesyonlarını erkek çocuklarına geçirirler. Bununla birlikte, delesyonların çoğu de novo olup, infertil fenotipler dolayısıyla herhangi bir NRY alleli ile birlikte popülasyondan elimine edilirler. Çalışmalar idiyopatik azospermik erkeklerin % 10-15'i ile oligospermik erkeklerin % 5-10'unun Y kromozomunun uzun kolunun bir veya diğer kısımlarının delesyonlarını taşıdığını ortaya çıkarmıştır. Azospermik ve ciddi oligospermik erkeklerin yaklaşık % 60'ı idiyopatik olarak sınıflandırılır. Erkek popülasyonunda görülen Y delesyonlarının sıklığının % 0.06 olduğu tahmin edilmektedir (57).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Araştırma Popülasyonu

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik bölümü, Genetik Tanı Laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışma materyalini Ocak 2003 - Haziran 2006 tarihleri arasında en az iki yıl evli olmalarına rağmen çocuk sahibi olamamış azospermik, oligospermik ve oligoastenospermik 80 infertil erkek bireyler oluşturmuştur. İlk olarak çalışma kapsamındaki her çiftin aile bilgilerini içeren pedigriler oluşturuldu. Pedigri analizinde bireylerin yaş, cinsiyet, akraba evliliği, sigara, alkol ve ilaç kullanımı, kan grupları gibi kriterler ele alındı. Ayrıca çalışma gurubuna dahil edilen olguların ailelerindeki infertilite öyküleri, enfeksiyon geçirip geçirmedikleri, testis morfolojisi, spermiyogram ve bazal hormon profilleri (FSH, LH, Testosteron, Prolaktin), radyoterapiye maruz kalıp kalmadıkları hakkında da anemnez formu dolduruldu.

Daha sonra çiftlere herhangi bir otozomal ya da gonozomal kromozom anomalisini taşıyıp taşımadıklarının anlaşılması açısından sitogenetik yöntemlerle kromozom analizi yapıldı. Bayanların hepsinde 46,XX karyotipi saptandı.

Y kromozom mikrolelesyon analizi için 80 erkek bireyden oluşan bir çalışma gurubu oluşturuldu. Çalışma gurubundaki tüm bireylerden elde edilen genomik DNA, moleküler PCR yöntemi ile çoğaltılıp agaroz jel elektroforezinde incelenerek Y kromozom mikrolelesyonlarını taşıyıp taşımadıkları araştırıldı.

3.2. Kromozom Analizi İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1-Nutrient Mixture F-10 Ham (Sigma)
- 2-Fetal Calf Serum (Seromed)
- 3-Phytohemagglutinin M (Biological Industries)
- 4-Colcemid. 10µg/ml (Biological Industries)
- 5-Penisilin-Streptomisin (Biological Industries)
- 6-L-Glutamine 10ml (Biological Industries)
- 7-KCL-Potassium chloride (Sigma)
- 8- Glacial Acetic Acid (Merck)
- 9-Methanol (Merck)

- 10-Xylol (Merck)
- 11-Giemsa Lösung (Merck)
- 12-Heparin (Liquemine, Roche)
- 13-Ethyl alcohol (TEKEL)
- 14-Serum fizyolojik (Baxter)
- 15-Trypsin Certified 25gr 1:250 (Sigma)
- 16-Pancreatin 25gr (Sigma)
- 17-Na₂HPO₄ (Sigma)
- 18-KH₂PO₄ (Sigma)
- 19-Biebrich scarlet (Sigma)
- 20-Phosphotungistic acid (Sigma)
- 21-Fast green (Sigma)
- 22-Phosphomolybdic acid (Sigma)
- 22-Distile Water (Sigma)

3.3. Kromozom Analizi İçin Kullanılan Solüsyonlar

a-Hipotonik solüsyonu: 100 ml distile su + 5.6 gr KCL (0.075 M KCL)

b-Cornoy fiksatif: 3 birim methanol + 1 birim acetic acid glacial

c-Phytohaemaglutinin solüsyonu: 5 mg Phytohaemaglutinin M + 5 ml bidistile water

d-Periferik kanda kromozom analizi için kullanılan kültür ortamı içeriği:

- Nutrient Mixture F-10 Ham	100 ml
- Phytohaemaglutinin M solüsyonu	1.5 ml
- L-Glutamine	1 ml
- Penisilin-Streptomisin	1 ml
- Fetal Calf Serum	20 ml

e-Söransan tamponu:

a-1.88 gr. Na₂HPO₄ +1000 ml distile su (A)

b-9.08 gr. KH₂PO₄ + 1000 ml distile su (B)

A ve B solüsyonları Karıştırılarak PH = 6.8'e ayarlanır.

f-Trypsin solüsyonu: 50-100 mg Trypsin + 100 ml serum fizyolojik (37°C)

g-Pankreatin solüsyonu: 50-100 mg Pancreatin + 100 ml serum fizyolojik (37°C)

h-Boya solüsyonları:

-G Bantlama için: 95 ml Söransan tamponu + 5 ml Giemsa Lösing

-Düz Boya İçin: : 95 ml distile su + 5 ml Giemsa Lösing

X Kromatin Tespiti İçin Gerekli Solüsyonlar

i-Biebrich Scarlet stok solüsyonu:

Biebrich scarlet	2 gr
Phosphotungistic acid	0.6gr
Glacial acetic acid	10 ml
Distile su	10 ml

i-Fast green stok solüsyonu

Fast green	1 gr
Phosphomolybdic acid	1 gr
Phosphotungistic acid	0.6gr
Glacial acetic acid	10 ml
%50'lik ethyl alcohol	200 ml

3.4. Kromozom Analizi İçin Kullanılan Diğer Gereçler

- a-Zaman ayarlı santrifüj (Hettich Universal II).
- b-Etöv (Heraeus)
- c-Kuru Hava Sterilizatörü (Kötterman)
- d-Mikroskop (Olympus)
- e-Görüntüleme sistemi (Cytovision)
- f-Elektronik duyarlı terazi (0.1 mg'a duyarlı-Bosch)
- g-Değişik çapta enjektörler ve pipetler
- h-Bunsen bek

- i-Şaleler
- i-15 ml'lik konik santrifüj tüpleri
- j-Mezürler
- k-Vorteks
- l-lam
- m-Plastik eldiven
- n-Laboratuvar saati
- o-buz dolabı
- p-lanset

3.5. Kromozomların Elde Edilmesi

Bu çalışmada kromozomların elde edilmesi için "makro kültür" tekniğinin modifiye edilmiş şekli olan ve "mikro kültür" ya da "tam kan tekniği" olarak bilinen lenfosit kültürü yöntemi uygulanmıştır (1,24). Çalışmanın uygulama aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibidir;

1-Steril koşullarda hazırlanmış ve buzdolabında muhafaza edilmiş olan stok kültür solüsyonu kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarıldı ve her bir kültür tüpüne steril ortamda 5 ml aktarıldı.

2-Heparinlenmiş steril enjektör ile hastadan alınan venöz kandan kültür tüplerine 4-5 damla kan eklendi. Tüpün ağzı alevden geçirilerek kapatıldı ve 72 saatlik inkübasyon için etüve bırakıldı.

3-İnkübasyonun 70.5. saatinde kültüre iki damla (0.01 ml) colcemid eklendi ve tekrar etüve bırakıldı.

4-72. saatte etüvden çıkarılan kültür vortekslelendikten sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

5-Süpernatant atıldıktan sonra, pelet vorteksle karıştırılarak üzerine 10 ml hipotonik solüsyonu eklendi ve 10 dakika etüvde bekletildi.

6-Tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra pelet vorteks yardımıyla karıştırılarak üzerine pastör pipetiyle 10 ml fiksatif eklendi.

7-Fiksatifle yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.

8-Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 0.5 cc pelet bırakıldı.

9-Dip materyal pipetle iyice karıştırıldı ve alkolde bekletilip temizlenmiş lamlara yaklaşık 30 cm yükseklikten 2-3 damla damlatılarak yayıldı.

10-Kurumaya bırakılmış preparatlar 3 gün etüvde 37°C'de bekletilerek yaşlandırıldı.

3.6. Giemsa Bantlama

1-Yaşlandırılmış preparatlar 30-60 saniye arasında tripsin veya pankreatin çözeltisinde tutuldu (en uygun süreyi ayarlayabilmek için her olguya ait bir preparat kullanıldı ve optimize edilerek diğerleri de bantlandı).

2-Preparatlar distile su ile 2 defa yıkandı.

3-%5'lik giemsa çözeltisinde (PH=6.8) 5 dakika boyandı.

4-İki defa distile suda yıkanıp kurutuldu.

3.7. Değerlendirme

Değerlendirme işlemine mikroskop altında incelenen preparatların önceden hazırlanmış formlara kayıt edilmesi ile başlandı. Preparatları tarama işlemine küçük büyütme objektif ile başlandı. Analize elverişli metafazlar immersiyon objektifi ile (100X) her olgu için en az 20 hücre analiz edilip değerlendirme formuna gerekli kısaltma ve sembollerle kaydedilip en az 10 tanesi otomatik görüntü analiz sistemine alınıp karyotiplendirilerek ayrıntılı bir şekilde değerlendirildi. Anomali ya da mozaizm şüphesinde analiz edilen metafaz sayısı artırıldı. Değerlendirilmesi tamamlanan her olgu için en az iki karyotip arşivlendi.

3.8. DNA Analizi İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar

Olguların periferel kanından DNA izolasyonu için, yüksek tuz konsantrasyonu kullanılarak proteinlerin çöktürülmesi esasına dayanan salting out yöntemi kullanılmıştır (Miller ve ark. 1988).

1-Lysis Tamponu (Reaktif A, pH 8.0)

10 mM TRİS-HCL

320 mM Sucrose

5 mM MgCl₂

Otoklav edilir ve

%1 Triton-X-100 eklenir.

2-Reaktif B (pH 8.0)

400 mM TRİS-HCL

60 mM EDTA

150 mM NaCl

Otoklave edilir ve

%1 SDS eklenir.

3-Sodyum Perklorate

5 M Sodyum Perklorate

4-Taq DNA Polimeraz Tamponu (10X)

100 mM TRİS-HCL

10 mM MgCl₂

500 mM KCl

%1 Triton-X-100

5-dNTP Karışımı (pH 7.4)

2 mM dATP

2 mM dTTP

2 mM dCTP

2 mM dGTP

6- 10 X TBE Elektropherez Tamponu

90 mM Tris-Borate

10 mM Sodium_EDTA pH 8.3

7- 10 X Agarozel Jel Elektrophorezi Yükleme Karışımı

% 10 Gliserol

% 2.5 (w/v) Ficoll (type 400)

1 mM EDTA

% 0.25 Bromophenol Blue

8- TE (Tris-EDTA) Tamponu

10 mM Tris HCL pH 7.5

1 mM EDTA

9- Ethidium Bromür

10 mg/ml konsantrasyonlu solüsyon

3.9. Periferik Kandan DNA İzolasyon Yöntemi

Sodyum EDTA'lı tüplere 5-10 ml kan bırakıldı. Santrifüj 4°C için ön soğutmaya bırakıldı. 5-10 ml kan 50 ml'lik polypropylene santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine 40 ml lysis buffer eklendi (Reaktif A). Elle hafifçe 2 dakikalık bir süre içinde karıştırıldı. 4°C'de 10 dakika süre ile 3000 rpm de santrifüj edildi. Hücrelere zarar vermeksizin süpernatant hipo suyuna döküldü.

Tüplere 2 ml Reaktif B eklenip ve hafifçe karıştırılarak hücre çökeltilerinin çözümleri sağlandı. Bu süspansiyon daha sonra 15 ml'lik kapaklı polypropylene tüplerine aktarıldı.

Her bir tüpe 5 M'lık Sodium Perklorattan 500 µl eklendi ve tüpler kan döndürme (rotary mix) cihazına yerleştirildi, oda ısısında 15 dakika süre ile karışması sağlandı. Tüpler 30 dakika 65°C'lik sıcak blokta inkübe edildi.

Her bir tüpe daha önceden -20°C'de bırakılmış kloroform'dan 2 ml eklendi, 10 dakikalık süre için oda sıcaklığında rotary mix'e bırakıldı. 10 dakika 1400 xg santrifüj edildi.

DNA içeren faz (üstteki berrak tabaka) plastik pastör pipetleri kullanılarak 15 ml'lik yeni santrifüj tüplerine aktarıldı. DNA içeren volümün 2 katı kadar soğuk etanol (daha önceden 4°C'de bırakılmış) ilave edildi. Hafifçe karıştırarak DNA'nın presipite olması sağlandı. Plastik öze ile presipite olan DNA alındı ve 3-5 dakika süre dışarıda bekletilerek kuruması sağlandı. Daha sonra 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine 250 µl TE buffer eklendi. Üzerinde DNA'nın kuruması sağlanan plastik öze kesilerek içinde TE buffer bulunan tüpe eklendi.

3.10. PCR İle Örneklerin Çoğaltılması

Eksonların PCR ile çoğaltılması için 50 µl'lik hacimde PCR karışımı hazırlandı. Her bir örnek için 0.3 ünite Taq Polimerase enzimi, Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10X reaksiyon çözeltisi (50mM KCL, 100mM Tris-HCL, pH:9.0, 25° C'de) triton X-100, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTP's, 200 ng primer ile karışım elde edildi. Kişilere ait yaklaşık hedef DNA 100-150 ng olacak şekilde PCR karışımına eklendi. Buharlaştırmanın engellenmesi için karışımın üzerine 30 µl mineral yağ damlatılarak, örneklerin Techne PHC3 Thermal Cyclerde amplifikasyon işlemleri gerçekleştirildi.

PCR'da Kullanılan Primerler ve Dizileri (İncelenen STS Bölgeleri, Sequence tagged sites = STS) :

Yaptığımız çalışmada Y kromozomunun ökromatik bölgesinde dağılışı gösteren ve AZF bölgelerine (AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd) ait, sY81, sY82 sY84 (AZFa), sY127, sY142, sY164, RBM1 (AZFb), sY254, sY255, sY257, CDY, BPY2 (AZFc), sY145, sY152, sY153 (AZFd), olmak üzere toplam 15 Y-spesifik STS kullanıldı. Her AZF bölgesinden en az üç STS lokusu analiz edildi. Bu primer seti ile, AZF bölgesindeki mevcut delesyonların %95'inden fazlasının saptanabileceği ve bunun rutin inceleme için yeterli olacağı ileri sürülmektedir (66). Çalışmamızda kullandığımız tüm primerler tablo 1'de verilmiştir.

Multiplex PCR I Karışımları

Multiplex PCR I Karışımı

10 X PCR Buffer	→	5µl
2 mM dNTPs	→	3µl
25 mM MgCl ₂	→	4µl
sY164 Sol	→	1µl
sY164 Sağ	→	1µl
sY277 Sol	→	1µl
sY277 Sağ	→	1µl
sY142 Sol	→	1µl

sY142 Sağ → 1µl
sY153 Sol → 1µl
sY153 Sağ → 1µl
Taq DNA polymerase → 0.3µl
Sd H₂O → 26.7µl
Template DNA → 3µl
Final Volüm = 50µl

Multiplex PCR II Karışımı

10 X PCR Buffer → 5µl
2 mM dNTPs → 3µl
25 mM MgCl₂ → 4µl
RBM1 Sol → 1µl
RBM1 Sağ → 1µl
sY254 Sol → 1µl
sY254Sağ → 1µl
sY82 Sol → 1µl
sY82 Sağ → 1µl
sY152 Sol → 1µl
sY152Sağ → 1µl
Taq DNA polymerase → 0.3µl
Sd H₂O → 26.7µl
Template DNA → 3µl
Final Volüm = 50

Tablo 1. Kullanılan PCR Primerlerinin Dizileri.

Primer Adı (Lokus/STS)	Primer Dizisi		Baz çifti (bp)	Bölge
	Sol	Sağ		
sY81	5' AGG CAC TGG TCA GAA TGA AG-3'	5 AAT GGA AAA TAC AGC TCC CC-3'	200	AZFa
sY82	5' ATC CTG CCC TTC TGA ATC TC-3'	5' CAG TGT CCA CTG ATG GAT GA-3'	280	AZFa
sY84	5' AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT-3'	5' GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC-3'	295	AZFa
sY127	5' GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA-3'	5 'CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA-3'	282	AZFb
sY142	5' AGC TTC TAT TCG AGG GCT TC-3	5' CTC TCT GCA ATC CCT GAC AT-3'	182	AZFb
sY164	5' AAT GTG CCC ACA CAG AGT TC-3	5' TGG AAG ACC AGG ATT TCA TG-3	590	AZFb
RBM1	5' ATG CAC TTC AGA GAT ACG G-3'	5' CCT CTC TCC ACA AAA CCA ACA-3	800	AZFb
sY254	5' GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA-3'	5'GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C-3'	350 380	AZFc DAZ1
sY255	5' GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT-3'	5' CTC GTC ATG TGC AGC CAC-3'	120	AZFc DAZ2
sY277	5' GGG TTT TGC CTG CAT ACG TAA TTA-3'	5'CCT AAA AGC AAT TCT AAA CCT CCA G-3'	275	AZFc DAZ3
CDY	5' TCA TAC AAT CCA ATT GTA CTG G-3'	5' TTC TAT CCC TCG GGC TGA GCT C-3'	132	AZFc
BPY2	5' CAG CGT ATC ATA GAA AAT GT-3'	5' AGT ACT TTA TTT GCA GGT TCT G-3'	142	AZFc
sY145	5' CAA CAC AAA AAC ACT CAT ATA CTC G-3'	5' TTG AGA ATA ATT GTA TGT TAC GGG-3	125	AZFd
sY152	5' AAG ACA GTC TGC CAT GTT TCA-3'	5' ACA GGA GGG TAC TTA GCA GT-3'	120	AZFd
sY153	5' GCA TCC TCA TTT TAT GTC CA-3'	5' CAA CCC AAA AGC ACT GAG TA-3'	135	AZFd

Multiplex PCR III Karışımı

10 X PCR Buffer	→	5 μ l
2 mM dNTPs	→	5 μ l
25 mM MgCl ₂	→	4 μ l
sY127 Sol	→	1 μ l
sY127 Sağ	→	1 μ l
sY81Sol	→	1 μ l
sY81Sağ	→	1 μ l
sY145 Sol	→	1 μ l
sY145 Sağ	→	1 μ l
Taq DNA polymerase	→	0.3 μ l
Sd H ₂ O	→	26.7 μ l
Template DNA	→	3 μ l
Final Volüm	=	50

Multiplex PCR IV Karışımı

10 X PCR Buffer	→	5 μ l
2 mM dNTPs	→	3 μ l
25 mM MgCl ₂	→	4 μ l
sY84 Sol	→	1 μ l
sY84 Sağ	→	1 μ l
BPY2Sol	→	1 μ l
BPY2Sağ	→	1 μ l
sY255 Sol	→	1 μ l
sY255Sağ	→	1 μ l
Taq DNA polymerase	→	0.3 μ l
Sd H ₂ O	→	28.7 μ l
Template DNA	→	3 μ l
Final Volüm	=	50

Multiplex PCR V Karışımı

10 X PCR Buffer	→	5µl
2 mM dNTPs	→	5µl
25 mM MgCl ₂	→	4µl
CDY Sol	→	1µl
CDY Sağ	→	1µl
Taq DNA polymerase	→	0.3µl
Sd H ₂ O	→	30.7µl
Template DNA	→	3µl
Final Volüm	=	50

Multiplex PCR Koşulları

94 °C'de	5 dakika	1 döngü
94 °C'de	40 sn	40 döngü
72 °C'de	40 sn	40 döngü

3.11. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası spesifik amplifikasyonun ve PCR artefaktlarının olup olmadığının kontrol edilmesi için agaroz jel kullanıldı. Amplifikasyonun incelenmesi için %1'lik agaroz jeli hazırlandı ve örnekler agaroz jel işlemine tabii tutuldu. 1 gram agaroz jel tartılıp, beher içinde H₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcıda kaynatıldı. Yaklaşık 50-55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine konsantrasyonu 1 mg/µl olacak şekilde etidyum bromid eklenip karıştırıldı. Jel soğuduktan sonra jel tabağına döküldü. Elektroforeze başlanmadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlendi. Tankın benç üzerindeki dengesi ayarlandı. Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine 1XTBE elektroforez tamponu döküldü. 8µl PCR ürünü 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Ayrıca her jelin bir kuyucuğuna 100 bp'lik size marker yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektrotlar yerleştirilerek, örnekler 30-45 dakika 80-100V'ta yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel UV transilluminatör altında incelenerek amplifikasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edildikten sonra jelin fotoğrafı çekildi.

4. BULGULAR

Bu çalışma Ocak 2003- Haziran 2006 tarihleri arasında en az iki yıl evli olmalarına rağmen çocuk sahibi olamamış ve primer infertilite ön tanılı azospermik, oligospermik ve oligoastenospermik 80 infertil erkeği kapsamaktadır.

Çalışma gurubumuzu oluşturan 80 infertil erkek birey, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi, Diyarbakır Devlet Hastanesi, SSK hastanesi, Diyarbakır Asker Hastanesi ve özel hekimler tarafından anabilim dalımıza refere edilmiştir. Olgulara öncelikle sitogenetik analiz yöntemi uygulandı. Bunun için; olguların perifer kanlarından lenfosit kültürü yöntemi ile karyotip analizi yapılarak sonuçlar değerlendirildi. Y kromozom mikrolelesyon analizi için erkek olgulardan alınan periferal kan örneğinden genomik DNA izolasyonu yapılmış ve hedef primerlerle multiplex PCR yöntemi kullanılarak elde edilen amplifikasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Ayrıca pedigri ve anamnez verileri de değerlendirilmiştir.

Sitogenetik ve Moleküler Genetik (PCR) Analiz Sonuçları

Çalışma serisini oluşturan 80 olgudan 71 olgunun (%88.8) normal karyotipe (46,XY) ve 9 olgunun da (%11.3) anormal karyotipe sahip olduğu görüldü. Tüm seride kromozom anomali tipleri tablo 2 de gösterildi. 9 kromozom anomalisinden 7'sinin Klinefelter sendromu ve 2'sinin translokasyon taşıyıcısı {46,XY,der(5) (5pter→q35::6q21→qter),del(6)(q21→qter) ve 46,XY,der(7) (7pter→q36::3q24→qter), del(3)(q24→qter)} olduğu görüldü. Klinefelter sendromlu olgular azospermik iken, translokasyon taşıyıcısı olguların oligospermik olduğu görüldü (Tablo 3).

Kromozom anomalisine sahip olgular semen hacmi, spermiyogram sonuçları, FSH ve LH sonuçlarına göre değerlendirilip tablo 3 de gösterildi. WHO kriterlerine göre semen hacmi 2-6 ml arasında olmalıdır. 6ml'den fazla olan semen hiperspermik, 1 ml veya daha az ise hipospermik olarak isimlendirilir(15,20). Cinsiyet kromozom anomali taşıyan (47,XXY) yedi bireyde semen hacmi anormal sınırlardayken, otozomal kromozom anomali taşıyan iki bireyde {46,XY,der(5) (5pter→q35::6q21→qter),del(6)(q21→qter) ve 46,XY,der(7) (7pter→q36::3q24→qter), del(3)(q24→qter)} bu değer normal aralıkta bulunmaktadır. Erkeklerde normal olarak kabul edilen FSH (Folikül uyarıcı hormon) değerleri 1.5-14 mIU/ml, LH

(luteinize edici hormon) değerleri ise 1.4-7.7 mIU/ml aralığında değişmektedir. Kromozom anomalisi taşıyan 9 olgudan cinsiyet kromozom anomalili 7 olguda FSH ve LH değerleri yüksekken, otozom anomalili iki olguda normal sınırlarda gözlenmiştir. Normal değerleri erkeklerde 2.62-15.9 ng/ml olarak kabul edilen testosteron hormonu cinsiyet kromozom anomalili grupta normal değerlerin altındayken, otozom anomalili bireyde normalin alt sınırında olarak gözlenmiştir.

Tablo 2. Anormal karyotip saptanan 9 infertil bireydeki kromozom düzensizlikleri

Olgu no	karyotip
3	47,XXY
45	47,XXY
48	46,XY,der(7)(7pter→q36::3q24→qter),del(3)(q24→qter)
53	47,XXY
71	46,XY,der(5)(5pter→q35::6q21→qter),del(6)(q21→qter)
72	47,XXY
77	47,XXY
79	47,XXY
80	47,XXY

Kromozom anomalisi saptanan bireylerden cinsiyet kromozom anomalili bireylerin tamamı azospermik iken, otozom anomalili bireyin oligospermik olduğu gözlenmiştir.

Çalışma kapsamında incelenen 80 olgunun spermiyogram sonuçları değerlendirildiğinde, 52 olgu (%65) azospermik, 25 olgu (%31.2) oligospermik ve 3 olgu da (%3.8) oligoastenospermik olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4). Y kromozom mikrolelesyonu azospermik 52 olgunun 1'inde (%1.9) saptanırken, diğer sperm anomalilerinde saptanamamıştır. Azospermik olgularda Y kromozom mikrolelesyon sıklığı %1.9 iken toplamda bütün olgularda %1.3 olarak bulunmuştur. 52 azospermik olgunun 7'sinde (%13,5) ve 25 oligospermik olgunun 2'sinde (%8) kromozom anomalisi saptanırken, oligoastenospermik bireylerde saptanamamıştır. Olguların hiç birinde Y kromozom mikrolelesyonu ve kromozom anomalisi birlikteliği saptanamamıştır.

Tablo 3. Anormal karyotip saptanan olguların klinik verileri.

Karyotip	Semen hacmi (ml)	Spermiyogram sonucu	FSH (mIU/ml) N*(1.5-14)	LH (mIU/ml) N*(1.5-7.7)	Testosteron (ng/ml) N*(2.62-15.9)
47,XXY	1	azospermi	43,49	27,32	0,59
47,XXY	1	azospermi	44.35	26.15	0.48
46,XY,der(7)(7pter→q36::3q24→qter),del(3)(q24→qter)	3.5	oligospermi	3.15	4.28	3.14
46,XY,der(5)(5pter→q35::6q21→qter),del(6)(q21→qter)	3	oligospermi	2,97	3,47	2,87
47,XXY	1	azospermi	37.72	18.26	0,49
47,XXY	1	azospermi	29,75	13,70	2,41
47,XXY	1	azospermi	55.04	30.63	0,48
47,XXY	1,5	azospermi	39,61	19.54	0,78
47,XXY	1	azospermi	23.42	16.31	5,32

N*=normal değerler aralığı

Toplam genetik anomali olgu sayısı 52 azospermik olguda 8 (%15.4), 25 oligospermik olguda 2 (%8) iken, oligoastenospemik bireylerde Y kromozom mikrolelesyonu ve karyotip açısından herhangi bir genetik anomali saptanamamıştır (Tablo 4).

Tablo 4. Azospermik oligospermik, hipospermik ve oligoastenospermik olgularda belirlenen Y kromozom mikrolelesyon ve kromozom anomali sıklıkları.

Spermiyogram sonuçları	n	Y kromozom mikrolelesyon	Kromozom anomali	Toplam genetik anomali
Azospermik	52 (%65)	1 (%1.9)	7*(%13.5)	8(%15.4)
Oligospermik	25 (%31.2)	-	2 ** (%8)	2** (%8)
Oligoastenospermik	3 (%3.8)	-	-	-
Toplam olgu	80	1 (%1.3)	9 (%11.3)	10 (%12.5)

* Cinsiyet kromozom anomalisi (Turner Sendromu, 47,XXY)

** Otozomal kromozom anomalisi {46,XY,der(5) (5pter→q35::6q21→qter), del(6)(q21→qter) ve 46,XY,der(7)(7pter→q36::3q24→qter),del(3)(q24→qter)}

Çalışma gurubu olarak belirlenen olguların yaş ortalamaları 32.69 ± 5.01 olarak bulunmuştur (ortalama \pm standart sapma). En genci 24 ve en yaşlısı 45 yaşında olan olguların tümü primer infertilite tanısı almıştır. Ortalama infertilite süresi 8.68 ± 5.25 yıl olup, minimum 2, maksimum 28 yıllık infertilite öyküsü alınmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Olguların yaş ve infertilite süresi.

	Ortalama \pm standart sapma	Minimum	Maksimum
Yaş	32.69 ± 5.01	24	45
İnfertilite süresi	8.68 ± 5.25	2	28

Olguların infertilite etimolojisi araştırıldığında 77'si idiyopatik (%96.3), 2'si varikosel, 1'i enfeksiyon olarak belirlenmiştir (Tablo 6)

Tablo 6. Olguların infertilite etimolojilerinin dağılımı.

Etimoloji	n	(%)
İdiyopatik	77	96.3
Varikosel	2	2.5
Enfeksiyon	1	1.3
Toplam	80	100

Olguların öyküsü incelendiğinde; 7 olguda 1. derece yakınında infertilite, 5'inde inmemiş testis, 4'ünde kabakulak, 2'sinde hipoplazik testis, 1'inde ülser ve 1'inde de depresyon öyküsü belirlenmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Olguların öyküleri

Öykü	n	(%)*
Çok eşlilik	4	5
1. derece yakınında infertilite	7	8.8
İnmemiş testis	3	3.8
Kabakulak orşiti	2	4.1
Hipoplazik testis	2	2.5
Ülser	1	1,3
Depresyon	1	1,3

* n /Toplam hasta sayısı(=80).

Çalışma serisini oluşturan 80 olgudan 49 olgunun FSH değerleri, 47 olgunun LH değerleri ve 46 olgunun testosteron değerleri elde edilmiştir. Olgulara ait serum hormon düzeyleri Tablo 8 de gösterilmiştir.

Tablo 8. Olgulara ait serum hormon düzeyleri.

	FSH		LH		Testosteron	
	n	%	n	%	n	%
Düşük	3	6.1	3	6.4	16	34.8
Normal	31	63,3	23	48,9	30	65.2
Yüksek	15	30.6	21	44.7	-	-
Toplam	49	100.0	47	100.0	46	100.0

PCR sonucunda primer infertilite ön tanılı 80 olgudan birinde Y kromozom mikrolelesyon gözlenmiştir. Delesyon saptanan olgunun alınan pedigrisinde özgeçmişinde herhangi bir özellik bulunmamıştır. Ailede infertilite olmadığı belirlenmiştir. Serum hormon düzeyleri normal olarak rapor edilmiştir (Tablo 9). Çalışmamızda Y kromozom mikrolelesyon saptadığımız olgunun babasında PCR ile yapılan analizde hiçbir delesyona rastlanılmamış ve delesyonun de novo olarak ortaya çıktığı kanısına varılmıştır.

Tablo 9 Y kromozom mikrolelesyon saptanan olgunun verileri.

Karyotip	Semen hacmi (ml)	Spermiyogram sonucu	FSH (mIU/ml) N*(1.5-14)	LH (mIU/ml) N*(1.5-7.7)	Testosteron (ng/ml) N*(2.62-15.9)
46,XY	1	azospermik	8.77	2.91	2.26

N*=normal değerler aralığı

AZFb, AZFc ve AZFd bölgelerine özgül sY142, sY164, sY277 (DAZ3), sY153 primerlerinin multiplex PCR analiz sonuçları

80 olguda AZFb, AZFc ve AZFd bölgelerine özgül sY142, sY164, sY277, sY153 ve kontrol olarak da normal erkek ve negatif kontrol primerleri kullanılmıştır. Bir olguda sY277 (DAZ3) (AZFc) ve sY153 (AZFd) primerlerinin amplifiye olmamasıyla delesyon saptanmıştır (Şekil 7).

AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd bölgelerine özgül sY82, RBM1, sY254, sY152 primerlerinin multiplex PCR analiz sonuçları

AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd bölgelerine özgül sY82, RBM1, sY254, sY152 primerleri ile normal erkek ve negatif kontrol primerleri kullanılarak 80 olguda multiplex PCR reaksiyonu ile analiz yapılmıştır. Hiç bir olguda delesyon saptanmamıştır.

AZFa, AZFb ve AZFd bölgelerine özgül sY81, sY127, sY145 primerlerinin multiplex PCR tekniği ile amplifiye edilmiş analiz sonuçları

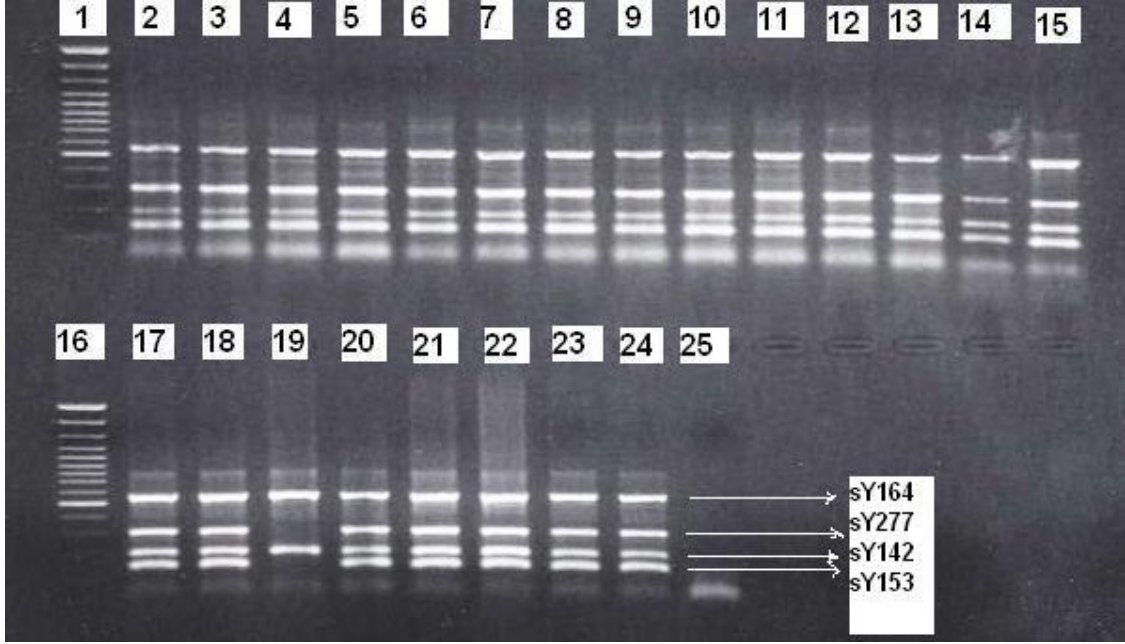
Tüm olgularda AZFa, AZFb ve AZFd bölgelerine özgül sY81, sY127 ve sY145 primerleri ile multiplex PCR reaksiyonu kullanılmıştır. Bu bölgelerde hiç bir olguda delesyon saptanmamıştır.

AZFa ve AZFc bölgelerine özgül sY84, BPY2, sY255 primerlerinin multiplex PCR tekniği ile amplifiye edilmiş analiz sonuçları

Tüm olgularda AZFa ve AZFc bölgelerine özgül sY84, BPY2, sY255 ve normal erkek kontrol ile negatif kontrol primerleri kullanılarak multiplex PCR reaksiyonu yapılmıştır. Bu bölgede hiç bir olguda delesyon saptanmamıştır.

AZFc bölgesine özgül CDY primerlerinin multiplex PCR tekniği ile amplifiye edilmiş analiz sonuçları

AZFc bölgesine özgül CDY primeri kullanılarak hedef bölge, PCR tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir. 38 olguda da bu bölgede delesyon gözlenmemiştir.



Şekil 7. Multiplex I primerleri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu oluşan ürünlerin bazılarının elektroforez sonucu oluşan görüntüsü. 1, 16: DNA Molekül Marker (100bp), 2-15, 16-18: Y mikrolelesyon tespit edilmeyen olgular, 19: sY277 ve sY153 bölgelerine mikrolelesyon saptatan olgu, 20-23: Y mikrolelesyon tespit edilmeyen olgular, 24: sağlıklı erkek birey, 25: negatif kontrol.

TARTIŞMA

Son yıllardaki çalışmalar erkek infertilitesi ile genetik arasındaki ilişkiyi açıkça ortaya koymaktadır. İnfertilite probleminde sahip çiftler arasında erkek faktörü vakaların yaklaşık %40-50'sini oluşturmaktadır. Bu tip vakalardaki genetik makroskobik defektler sitogenetik yöntemlerle (örn; karyotip analizi), genetik mikroskobik defektler ise moleküler biyoloji yöntemleri ile (örn; PCR) yapılmaktadır (1-71).

İnfertil Erkeklerdeki Kromozom Anomali Oranları

Erkek infertilitesinde genetik defektler, gonadotropin salıcı hormon yetmezliğinden, normal spermatogenez ve obstrüktif azospermiye kadar uzanan geniş bir spektrumda yer almaktadır. Erkek infertilitesinde genetik nedenlerin önemli ölçüde rol oynadığı son yıllarda yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Erkek bireyin infertiliteden sorumlu olduğu olgularda yapılan çoğu çalışmada, kromozomal anomalilerin fazla olduğu gözlenmiştir (2, 10, 37, 69-71). Bazı kromozomal düzensizlikler ile erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk geniş çalışma 6982 olgulu bir çalışma olup, kromozomal düzensizlik sıklığı %5,3 olarak bildirilmiştir, genel popülasyondaki sıklık ise %0,6 olarak verilmiştir (71).

Bu tip olgulara tedaviye yönelik olarak operasyonlar ve yardımcı üreme teknikleri (IVF gibi) başarıyla uygulanmaktadır. Dolayısıyla IVF'den önce hasta ve eşine doğacak çocukları hakkında genetik danışma hizmeti verilmesi için genetik araştırmacıların ve klinisyenlerin de erkek bireylerde reproduktif yetmezliğin genetik temellerini çok iyi bilmeleri gerekmektedir (2-4, 71-79)

Literatürde infertil erkeklerdeki kromozom anomali oranı %1.6 ile % 22.2 arasında değişmektedir (2, 8, 11, 25, 37, 47, 63, 80, 81, 83, 100-107, 109, 120). Bizim çalışmamızda ise major kromozom anomalisine sahip infertil erkeklerin oranı %8.8 (7/80) olarak elde edildi ve literatür ile uyumlu bulundu.

Çalışma popülasyonu seçilirken kriterlerdeki değişkenlik (olguların azospermik ya da oligospermik oluşları, idiyopatik ya da anidiyopatik oluşları), çalışma prosedürlerinin belirlenmesinde ve kromozom anomali tiplerinin seçimindeki (major,

minör, varyant) farklılıklardan dolayı, çalışmalarda bu oranlar bir hayli farklı olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmaların bir kısmında sadece azospermik ya da oligospermik bireyler ele alınırken, bir kısmında hem azospermik hem oligospermik, hem de normospermik olgular ele alınmıştır (2, 10, 69, 70).

Literatürde infertil erkeklerdeki kromozom anomali oranlarının azospermik erkeklerde %12,5- 31 arasında değiştiği ve oligospermik erkeklerde daha az görüldüğü (%1.76 – 5.8) bildirilmektedir (20, 71, 82, 83,). Bu çalışmada ise incelenen 80 olguda kromozom anomali oranı azospermik erkeklerde %13,5 (7/55) ve oligospermiklerde %8 (2/25) olarak saptanırken, oligospermik ve oligoastenospermik bireylerde saptanamamıştır. Oligospermiklerdeki yüksek oranının olgu sayısı azlığından (n=25) ileri geldiği düşünülmektedir.

Erkek bireylerde genetik anomali oranının idiyopatiklerde, anidiyopatiklere oranla daha yüksek olduğu bildirilmektedir (10, 17, 37, 71, 77, 84-91). Çalışmamızda olguların infertilite etimolojisi araştırıldığında 80 olgudan 77'inin idiyopatik (%96.3), 3'ünün de (%3.7) anidiyopatik olduğu ve tüm kromozom anomalilerinin idiyopatik olgular arasında görüldüğü tespit edilmiştir.

İnfertilite nedenlerinden biri olan genetik faktörler içinde en sık gözlenen, seks kromozomlarındaki anormalliklerdir. Literatürde cinsiyet kromozom anomali oranının azospermik grupta daha yüksek olduğu, otozomal anomalilerinin ise oligospermik grupta daha sık görüldüğünü bildirilmiştir (4, 20, 82, 92).

Gündüz 1992'de azospermik ve oligospermik erkek bireylerde yaptığı sitogenetik çalışmalarda azospermik bireylerde oligospermik bireylere göre daha çok kromozomal anomali bulmuş ve bunların çoğunda seks kromozom anomalileri olduğunu saptamıştır (92).

Çalışmamızda ise infertilite nedeniyle yapılan sitogenetik analizlerde 7 olguda belirlenen seks kromozom anomalisinin tamamının azospermik grupta olduğu ve 2 olguda belirlenen otozomal anomalisinin de oligospermik grupta olduğu tespit edilmiştir.

Azospermik infertil erkekler arasında en fazla görülen ve infertiliteye neden olan gonozomal kromozom anomali tipi olarak Klinefelter Sendromu gösterilmektedir (20, 30, 91, 93). Klinefelter Sendromunun yeni doğan erkek bireyler arasındaki oranı yaklaşık olarak %0,2'dir (1/500) (20, 94). Genetik araştırmalar, azospermik erkeklerin

% 11'inin ve oligospermik erkeklerin ise %0.7'sinin Klinefelter sendromuna sahip olduğunu bildirmiştir (13). Van Assche ve ark. (1996) 10728 erkeği kapsayan karyotip çalışmasında 47,XXY taşıyıcı oranını %3.5 olarak bulmuşlardır (82). Bu değer Kleiman (1999) tarafından %5.5 olarak bildirilmiştir (11). Bizim çalışmada azospermik idiyoatik bireyler arasında saptadığımız kromozom anomalilerinin tamamının Klinefelter Sendromu (47,XXY) olduğu tespit edilmiştir.

Klinefelter Sendromlu erkeklerin steril olmasına rağmen, mozaik ya da mozaik olmayan Klinefelter Sendromuna sahip erkeklerden sperm üretilebildiği ve dolayısıyla fertilitte gösterip baba olabildiği nadir olgularda bilinmektedir (95-97). Yeni yardımcı üreme teknikleri bu tür vakaların bazıları için fertilizasyon ve babalık için bir şans olarak görülmektedir (93, 95- 98).

İnfertil erkeklerde, cinsiyet kromozomu anomalilerinin dışında, Robertsian translokasyonlar, dengeli translokasyonlar, inversiyonlar (perisentrik ya da parasentrik), marker kromozomları gibi yapısal anomaliler de görülebilmektedir (99). İnfertil erkeklerdeki translokasyonların görülme sıklığı genel popülasyonla kıyaslandığında oligospermik erkeklerde daha yüksektir. Bu sıklık genel popülasyonda %0.012 iken, oligospermiklerde %1.9 ile %3.1 arasında değişmektedir (82). Literatürde görülen infertil erkeklerdeki kromozom anomalileri özet olarak tabloda 10'da gösterilmiştir.

Hormonal Durum ile İnfertilite Arasındaki İlişki:

Literatürde infertil erkeklerde sperm sonuçları ile hormon düzeylerini karşılaştıran ve farklı sonuçlar elde eden çok sayıda çalışma görülmektedir. Foresta ve arkadaşları (1997) spermiyogram sonuçlarına göre azospermi ve oligospermi görülen ve idiyoatik olarak değerlendirilen erkek bireylerde çalışmalar yapmışlardır. Çalışmaya dahil ettikleri azospermik hastaların çoğunun, LH ve testosteron düzeylerinin normal, FSH değerlerinin yüksek olduğunu gözlemişlerdir (10).

1996'da Quershi ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada yaş ortalaması 31 olan 31 infertil bireyde spermiyogram ve hormon düzeyleri değerlendirilmiştir. Azospermik olan bu bireylerde FSH hormonunun yüksek, LH

hormonunun düşük, serbest testosteron ve prolaktinin ise normal değerlerde olduğu bulunmuştur (69).

Yapılan çalışmalarda infertil erkeklerde, sperm sonuçları ve hormon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişkini olmadığına dair çalışmalar da bulunmaktadır (110). Çalışmamıza dahil ettiğimiz bireylerde spermiyogram ve hormon düzeyleri değerlendirilmiş ve serum LH, FSH ve testosteron düzeylerinin büyük oranda normal olduğu belirlenmiştir (Tablo 8).

Tablo10. İnfertil erkeklerde görülen kromozom anomalilerinin literatür özeti.

Olgu sayısı	Cinsiyet kromozomu	Otozom	Toplam	Referanslar
1000	27 (%2.7)	6 (%0.6)	33 (%3.3)	100
2372	33 (%1.4)	18 (%0.7)	51 (%2.1)	80
2542	176(%6.9)	40 (%1.6)	216 (%8.6)	101
1210			318 (%3.8)	102
164	3 (%1.8)	1 (%0.6)	4 (%2.4)	103
50	3 (%6)	1 (%2)	4 (%8)	104
72	9 (%12.5)	3 (%4.1)	12 (%16.6)	11
220	24 (%11)	12 (%5.4)	36 (%16.4)	105
2196	82 (%3.7)	52 (%2.4)	134(%6.1)	106
208	2 (%5.1)	5 (%2.4)	7 (%3.4)	2
373	3 (%1.8)	9 (%2.4)	12 (%3.2)	58
139	4 (%2.9)	2 (%1.4)	6 (%4.3)	107
103	6 (%5.8)	4 (%3.9)	10 (%9.7)	37
334			53 (15.9%)	83
71	1 (%1.6)		1 (%1.6)	109
61			2 (%3.3)	4
819	50 (%6.1)	17 (%2.1)	67 (%8.2)	71
80	7 (%8.8)	2 (%2.5)	9 (%11.3)	Bizim çalışma

İnfertil Erkeklerdeki Y kromozom mikrolelesyon Oranları

Erkek infertilitesinde Y kromozomunun önemi ilk olarak 1976'da Tiepolo ve Zuffardi'nin 1170 infertil erkekte yaptıkları karyotip analizi sonucu azospermi bulunanların 6'sında Y kromozomunun uzun kolunda (Yq) kayıp olduğunu gözlemlenmeleriyle başlamıştır (64). Bu çalışmadan sonra bir çok araştırmacı hem karyotip analizi hem de diğer moleküler genetik yöntemlerini kullanarak azospermik erkeklerde Y uzun kol delesyonlarını gözlemlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda insan Y kromozomu klonlanmaya başlandı ve tüm Y kromozomunu kapsayan PCR markırlarının bir haritası oluşturuldu (62, 77, 111, 112). İnfertil erkeklerden elde edilen DNA ile PCR markerleri kullanarak inserstitial delesyonlarla ilgili ilk çalışmalar yayınlandı (112, 113). Daha sonra binlerce infertil ve fertil erkekte alınan kan DNA örneklerine bu marker setleri uygulanarak delesyon analizleri yapıldı.

Mallidis ve ark. (1998), 783 normal erkek bireyde yaptıkları Y kromozom mikrolelesyon analizlerinde hiçbir delesyon bulgusuna rastlamamışlardır. Oysa daha sonra yapılan bir çalışmada sperm sayısı normal olan bir infertil erkekte ve spermiyogram sonuçları belirtilmeyen 4 fertil erkekte tek bir STS kaybı olan delesyonlar saptanmıştır (5).

Van Golde ve arkadaşları (2001), sperm sayısı 1 milyonun altında olan ve spermleri hareketsiz olan 300 erkekte Y kromozom mikrolelesyon oranını %2.7 olarak bulmuşlardır. Buldukları bütün mikrolelesyonlar AZFc bölgesinde görülürken diğer AZF bölgelerinde delesyona rastlayamamışlardır (115).

Kim ve arkadaşları (1999), 40 azospermik idiyopatik infertil erkek bireyde AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerine ait 37 STS kullanarak yaptıkları Y kromozom mikrolelesyon tarama çalışmasında toplam 8 (%20) hastada delesyon saptamışlardır. Sekiz hastanın tamamında AZFc delesyonu görülürken, AZF b delesyonu sadece 5 hastada görülmüştür (86).

Martinez ve arkadaşları (2000), 57 azospermik ve 71 oligospermik olmak üzere toplam 128 infertil erkekte Y kromozom mikrolelesyon çalışmışlardır. Y kromozomunun 3 farklı bölgesinden (AZFa, AZFb, AZFc) 9 STS seti kullanmışlar ve olguların 9'unda (%7) delesyon tespit etmişlerdir. AZFa bölgesi için sY84, sY85, sY86, AZFb bölgesi için sY124, sY125 ve AZFc bölgesi içinde sY149 ve sY157

bölgelerini kullanmışlardır. DAZ delesyonunun oranını %89 (8/9) olarak bulmuş ve olguların 5'inde AZFb delesyonu görmüşlerdir. Bu olguların 4'ünde aynı zamanda AZFc delesyonu da görülmüş. Olguların hiç birinde AZFa delesyonu görülememiştir. (116)

Österlund ve ark. (2000), İsveç toplumundaki mikrodelesyon sıklığını ortaya çıkarmak için 139 azospermik ve 53 oligospermik olmak üzere toplam 192 erkekte Y kromozom mikrodelesyon çalışmışlardır. Y kromozomunun farklı bölgelerindeki delesyonları araştırmak için; AZFa (sY84, sY86, sY87), AZFb [sY141, sY142, sY152, sY153] ve AZFc (sY147, sY149, sY158, sY232, sY233, sY254 (DAZ)) olmak üzere toplam 13 çift primer kullanmışlardır. Oligospermik hastaların hiç birinde delesyon saptanmazken, 139 azospermik hastanın 4'ünde (%2.1) delesyon saptamışlardır. Delesyonun, AZFb bölgesinin bir kısmı ile bütün AZFc bölgesini içeren sY153 ile sY158 arasındaki bölgede görüldüğünü bildirmişlerdir (117).

Quilter ve ark. (2003), 98 azospermik ve idiyopatik bireyde yapılan PCR analizlerinde, üç olguda (%3) AZFb ve AZFc bölgelerinde Yq delesyonu saptanmıştır (37).

Thangaraj ve arkadaşları (2003), toplam 340 azospermik bireydeki PCR analizinde 29 bireyde %8.5 oranında Y kromozom delesyonu saptamışlardır. Delesyon en çok AZFc bölgesinde (%82.8) olmak üzere daha sonra sırasıyla AZFb (%55.2) ve AZFa (%24.1) bölgelerinde görülmüştür (24).

36 azospermik ve 16 oligospermik olmak üzere toplam 51 infertil erkek bireyde yapılan Yq mikrodelesyon taramasında multiplex PCR yöntemi ile analiz yapılmış ve azospermik 5 erkek bireyde (%13.9) delesyon saptanmıştır. Delesyon AZFb ve AZFd bölgelerinde delesyon görülmüştür (35).

Sargın ve arkadaşları (2004) 48 azospermik ve 13 oligospermik olmak üzere toplam 61 infertil erkekte iki bireyde Y kromozom mikrodelesyonu (%3.3) saptamışlardır. AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerinde delesyon görmüşlerdir. Yine Türkiye'de 71 azospermik erkek bireyde yapılan Y kromozom mikrodelesyon çalışmasında AZF bölgeleri PCR ile analiz edilmiş ve 4 bireyde (%5.6) delesyon saptanmıştır. Delesyonlar bir bireyde AZFb bölgesinde saptanırken, diğere üç bireyde çoklu bölgelerde (AZFb+c+d ve AZFa+b+c+d) görülmüştür (4).

Song ve arkadaşları (2005) 143 infertil erkekte (62 idiyopatik infertil ve 81 nonidiyopatik infertil), multiplex PCR kullanarak yaptıkları Y kromozom mikrolelesyon analizlerinde; idiyopatik erkeklerin 12'sinde (12/62, %19.4) mikrolelesyon saptamışlardır. Delesyonlar AZFa, AZFb, AZFc ya da AZFb+c bölgelerinde görülmüştür. Varikosel ve kriptorşidizimli nonidiyopatik erkelerin ise 9'unda (9/81, %11.1) mikrolelesyon saptamışlardır (17).

AZF mutasyonlarının azospermi ve oligospermi ile ilişkisini araştırmak için yapılan bir başka çalışmada 46,XY karyotipli ve normal FSH, LH ve T düzeyli 67 erkek bireyde multiplex PCR analizleri yapılmış. Bu analizlerde: sY84, sY86, sY127, sY134, sY152, sY153, sY254, sY255, ve ZFX/Y primerleri kullanılmış ve 8 mikrolelesyon vakası tespit edilmiştir. Bu delesyonlardan 4'ünün AZFc, 2'sinin AZFa + AZFc, 1'inin AZFc + AZFb ve 1'inin de AZFb bölgesinde görüldüğü ve sıklığının %11.94 olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak Yq'daki mikrolelesyonların azospermi ve oligospermi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (90).

Zhou-Cun ve arkadaşları (2006) 256 azospermik ve 102 oligospermik olmak üzere toplam 319 idiyopatik ve normal karyotipli (46,XY) infertil erkekte multiplex PCR kullanarak yaptıkları Y kromozom mikrolelesyon analizlerinde; olguların 46'sında (14.4%) AZF bölgesinde mikrolelesyon saptanmıştır. Mikrolelesyon sıklığı, azospermik bireylerde % 15 ve oligospermiklerde %13.1 olmuştur. En sık rastlanan mikrolelesyon AZFc olmuş ve bütün AZFa mikrolelesyonları sadece azospermik bireylerde görülmüştür (91).

Çalışmamızda 52'si azospermik (%65), 25'i (%31.2) oligospermik ve 3'ü (%3.8) de oligoastenospermik olmak üzere toplam 80 infertil erkekte multiplex PCR analizi ile Y kromozom mikrolelesyon ve sitogenetik yöntemlerle de kromozom anomaliler araştırıldı. Vakaların etimolojileri incelendiğinde % 96.3'ünün (77/80) idiyopatik ve geriye kalan %3.7'sinin (3/80) anidiyopatik olduğu görüldü. Çalışmamızda Yq11.23'de delesyon saptamak için "hot spot" bölge olarak bilinen interval VI'da AZF lokusunun AZFa, AZFb AZFc ve AZFd bölgelerine ait ve Y kromozomunun ökromatik bölgesinde dağılışı gösteren, sY81, sY82 sY84 (AZFa), sY127, sY142, sY164, RBM1 (AZFb), sY254, sY255, sY257, CDY, BPY2 (AZFc), sY145, sY152, sY153 (AZFd), olmak üzere toplam 15 Y-spesifik STS kullanılarak, her AZF bölgesinden en az üç STS lokusu analiz edildi ve azospermik bir olguda Y

kromozom delesyonuna rastlandı. Delesyon bulunan olgunun klinik etimolojisine bakıldığında idiyopatik infertilite tanısı aldığı spermiyogram sonucu azospermik olduğu gözlenmiştir. Oligospermik ve oligoastenospermiklerde delesyon görülmedi. Yq delesyon oranı azospermiklerde %1.9 (1/52) iken toplamda bu oran %1.3 (1/80) olarak elde edildi. Çalışmamızda kromozom anomali oranı toplamda %11.3 (9/80) olarak bulundu. Toplam genetik anomali oranı ise %12.5 (10/80) olarak bulundu.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda; AZFa, AZFb, AZFc ve AZFd delesyonlarına ait farklı sıklıklar elde edilmiştir (Tablo 11). Azospermik erkeklerde delesyon görülme sıklığı, oligospermiklerden çok daha fazladır. Delesyonu olan azospermiklerin sadece %7.6'sında delesyon AZFc bölgesine ait olup, geri kalanında AZFb delesyonu sorumludur (118).

Büyük AZFb delesyonları mayozda olgunlaşma bloğu ya da SCO sendromuna neden olur.(22, 119-121). Tüm AZFb bölgesini yok eden delesyonlar için TESE sonucu sperm bulma oranı sıfırdır ve ilgili fenotip farklılaşmanın spermatosit ya da spermatid evresinde düzeyinde durmasıdır. Olgun spermatid ya da spermatozoa sadece DFFRYthe Y-linked homologue of the DFFRX (Drosophila fat-facets related X gene) geni delesyonu olduğunda saptanabilir (122). TESE yapılan 181 hastanın 11 tanesinde AZFb bölgesini kapsayan mikrolelesyon (5 tanesinde sadece AZFb delesyonu) saptanmıştır. Delesyon saptanan hastaların hiçbirinde TESE sonucu sperm bulunmadığı rapor edilmiştir (123). AZF d ile sınırlı delesyonlarda ise hafif oligospermik ya da anormal sperm morfolojisinde normal sayıda sperm görülebilir (22, 120).

Birden çok AZF bölgesini kapsayan mikrolelesyonlar genellikle SCO ya da ileri derecede oligospermi ile eşleşmektedir ve bu delesyonu taşıyan erkeklerin çoğunda olgun sperm hücreleri bulunamamaktadır (122). AZFb bölgesine ek olarak diğer bölgelerden herhangi birinin veya bir kaçının görüldüğü delesyonlar SCO ile ya da spermatogenik tutulum ile kendini gösterir. Buna karşılık bölgenin belli bir parçasının ya da tek bir markerin delesyonu daha heterojen fenotipe yol açar (124, 125).

Bizim çalışmamızda ise azospermik bir olguda hem AZFc hem de AZFd bölgesinde delesyon görülmüştür. Olgunun azospermik oluşu, FSH ve LH

düzeylerinin normal sınırlarda ancak testosteron düzeyinin düşük olması literatür bulgularını desteklemektedir.

Literatürde bazı çalışmalarda hem kromozom anomalisi hem de Yq mikrodelesyonunu birlikte taşıyan olgulara da rastlanmaktadır (63, 83). Ancak bizim çalışmamızda böyle bir birlikteliğe rastlanamamıştır.

Tablo 11. Literatürde geçen Y kromozom mikrodelesyon oranları

Hasta sayısı	Spermiyogram sonuçlarına göre olgu sayısı		Delesyon oranı		Toplam	Referans
	A	O	A	O		
65			10 (%15.3)		10 (%15.3)	113
89	89		12 (%13.5)		12 (%13.5)	112
35		35		2 (%5.7)	2 (%5.7)	114
60	50	10	10 (%15.3)	1 (%10)	11 (%18.3)	85
98	51	47	1 (%2)	3 (%6.4)	4 (%4.1)	69
33	19	14	4 (%21)	2 (%14.3)	6 (%18.2)	126
38	16	22	6 (%37.5)	5 (%22.7)	11 (%29)	10
148	106	142	4 (%3.8)	3 (%7.1)	7 (%4.7)	72
130	19	111		7 (%6.3)	7 (%5.4)	103
46	42	44	11 (%26.2)		11 (%18.3)	127
200					18 (%9)	128
168	74	94	2 (%2.7)	3 (%3.2)	5 (%2.9)	129
81	51	30	10 (%19.6)	4 (%13.3)	14 (%17.3)	130
180	55	135	19 (34.5)	21 (%15.6)	40 (%22.2)	84
40	40		8 (%20)		8 (%20)	86
153	128	28	7 (%5.4)	1 (%3.6)	8 (%6)	11
134	66	53	3 (%4.7)		3 (%2.2)	131
128	57	71	5 (%8.8)	4 (%5.6)	(%7)	116
192	139	53	4 (%2.9)		4 (%2.1)	117
402					8 (%2.2)	132
104	46	58	4 (%8.7)		4 (%3.8)	15
300		300		8 (%2.7)	8 (%2.7)	115
373	49	324	1 (%2)	2 (%0.6)	3 (%0.8)	58

139	25	84	4 (%16)	1 (%1.2)	5 (%3.6)	107
47		47		5 (%10.5)	5 (%10.5)	108
52	36	16	5 (%9.6)		5 (%13.9)	35
103	60	43	3 (%5)	2 (%4.7)	5 (%4.9)	133
30	3	27	1 (%33.3)	2 (%7.4)	3 (%10)	60
60	29	31	2 (%6.9)	2 (%6.5)	4 (%6.7)	63
340	340		28 (%(.5)		28 (%(.5)	24
98	40	58	3 (%7.5)		3 (%3.1)	37
272	134	138	26 (%19.4)	21(%15.2)	47 (%17.4)	87
334	218	116	18 (%8.3)	12 (%10.3)	30 (%9.0)	83
71	71		4 (%5.6)		4 (%5.6)	109
61	48	13	2 (%3.3)		2 (%3.3)	4
70			4 (%5.7)	5 (%7.1)	9 (%12.8)	134
148					11 (%7.4)	135
64	14	50	3 (%21.4).	8 (% 16).	11 (%17.2)	88
30	30		4 (%13)		4 (%13)	89
34	18	16	2 (%11.1)	1 (%2.9)	3 (%8.8)	136
180	54	126	6 (%11.1)	2 (%1.6)	8 (%4.4)	20
96	78	18	7 (%11.5)		7 (%9)	137
98	45	43	%29	%30,5	%16	138
177	71	106	6 (%8.5)		6 (%3.4)	19
143	63	80	14 (%22.2)	7 (%8.75)	21 (%14.7)	139
358	256	102	%15	%13.1	%5.25	91
73	52	22	1 (%1.9)		1 (%1.3)	Bizim çalışmada

A:azospermik, O:oligospermik.

Eskiden Y kromozomu mikrolelesyonlarının *de novo* olduğu ve babadan oğula geçemeyeceği düşünülüyor ise de günümüzde artık bu geçiş ile ilgili çok sayıda vaka rapor edilmiştir. İlk *de novo* dikey geçiş raporu Chang ve arkadaşlarının 1999 yılındaki çalışması ile sunulmuştur (140). Azospermik babadan 4 infertil oğula DAZ delesyonu geçişi rapor edilmiştir. Bir çok çalışmada daha babadan oğula dikey geçiş rapor edilmiştir (73- 79).

Erkek infertilitesinin tedavisinde ICSI güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Y kromozomunun kalıtımı her zaman baba üzerinden olacağından, kısmi Y kromozomu delesyonu taşıyan erkeklerin yardımcı üreme teknikleri sayesinde benzer genetik hasarı taşıyan erkek çocukları olabilir. Bu nedenle ICSI öncesi yeni döle aktarılamayan mikrodelesyonlar, ICSI ile yeni döle geçebilmektedir. Mikrodelesyonu babasından alan erkek çocuk aynı infertilite problemini yaşayacaktır (72-79, 103). Ailelere yapılan açıklamalar sonrasında mikrodelesyon taşıyan çiftlerin azımsanmayacak kadarının (%21) ICSI'den vazgeçtiği rapor edilmiştir (115).

Çalışmamızda Y kromozom mikrodelesyon saptadığımız olgunun babasında PCR ile yapılan analizde hiçbir delesyona rastlanılmamış ve delesyonun de novo olduğu ortaya çıkmıştır.

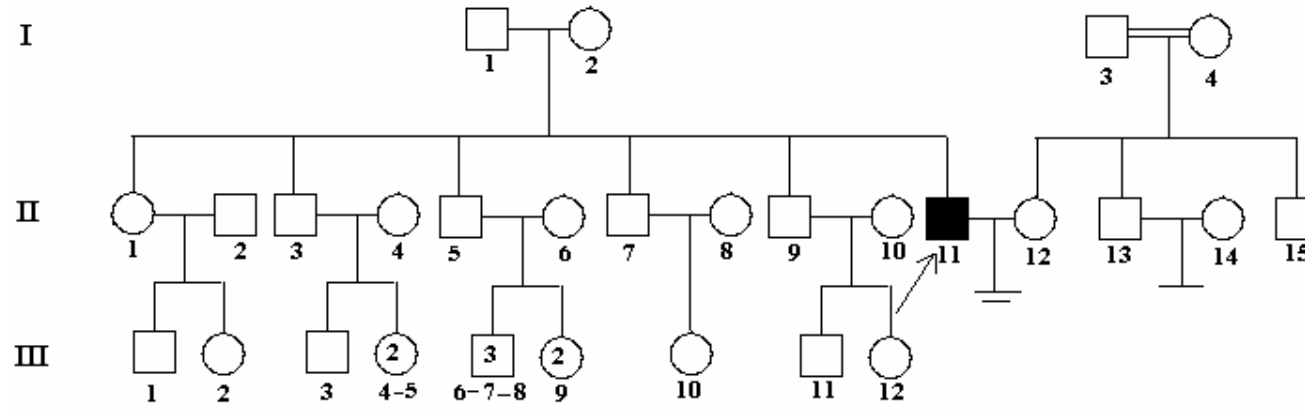
Yapılan çalışmalarda ICSI sonucu doğan erkek çocukların %9.4 oranında Y kromozom mikrodelesyonu taşıdığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlar ileri derecede oligospermik ve azospermik erkeklerin yardımcı üreme tekniklerine başvurmadan önce Y delesyon analizi yaptırmaları gerekliliğini göstermektedir (72, 74, 76, 78, 79). ICSI uygulaması sonucu kontrol gurubu ile (239 ICSI uygulaması) Y mikrodelesyonu taşıyan grup (19 ICSI uygulaması) karşılaştırıldığında Y Mikrodelesyonu taşıyan erkeklerin grubunda döllenme oranı ve embriyo kalitesi anlamlı oranda düşük bulunmuştur (115).

Literatürde belirtilen Yq delesyon oranlarında %0.6 ile % 55 arasında değişen büyük varyasyonlar görülmektedir (19). Bu durumun etnik farklılıklar, hasta seçim kriterleri ve metodolojik özelliklerin farklılığından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (117). Delesyon sıklığını etkileyen bir diğer etmen kullanılan primerlerin uygunluğu ve sayısıdır (23, 119). Şimdiye kadar yapılan çalışmaların her birinde infertil erkek bireyde Yq'daki mikrodelesyonları belirlemek için uygulanan PCR tekniğinde farklı sayıda aday genlerdeki delesyonu saptamak için farklı sayıda primer kullanılmıştır. Kan hücreleri (lenfositler) mezodermden ve gametler endodermden ve deri hücreleri ektoderm gibi farklı embriyonik dokulardan geliştikleri ve farklı genetik lezyonlar içerebildikleri için, delesyon sıklığını etkileyebilmektedirler (78). Kleiman ve ark. (1999) azospermik ve oligospermik olgularda hem lenfosit DNA, hem semen ve hem de yanak hücre DNA'sındaki Y kromozom delesyonlarını çalışmışlardır. Farklı

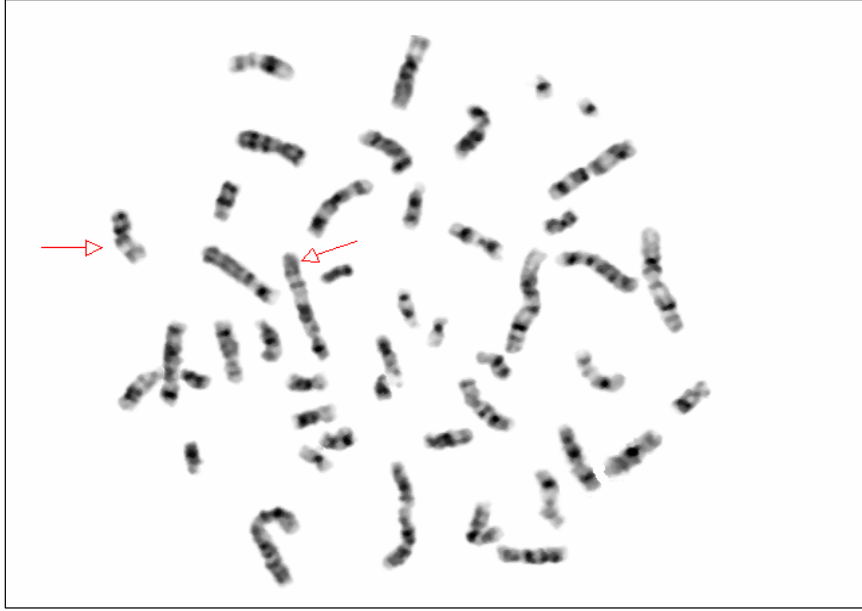
dokuların DNA'sında mikrolelesyon sıklıklarının da farklı olduğunu gözlemişlerdir (11).

Sonuç olarak, olgu sayısını artırarak, klinik verilerin daha homojen olmasını sağlamak amacı ile seçici davranarak ve kullanılan primerlerin lokalize olduğu bölgelerin dışında kalan loküsleri tarayabilmek için primer sayısını artırarak, farklı dokularda çalışmaya devam edilmesinin Türkiye'deki infertil bireylerdeki mikrolelesyon sıklığının ortaya çıkarılmasında faydası olacağı düşünülmektedir.

BULGULARIN ŐEKİLLERİ

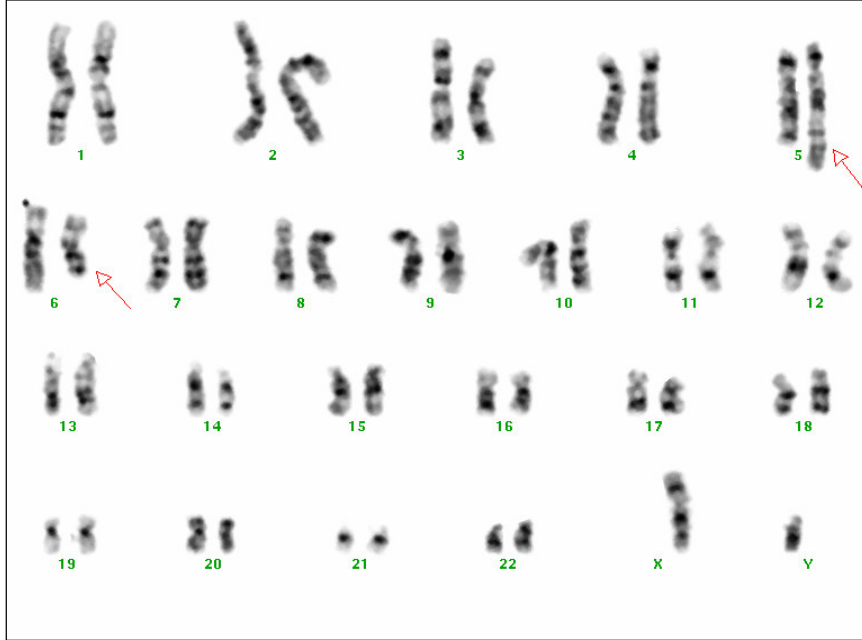


Şekil 8. 46,XY,der(5) (5pter→q35::6q21→qter), del(6)(q21→qter kromozom kuruluşuna sahip olguya ait pedigri



Case: 2006-305 Slide:

Cell: 1 Patient: B.G.



Case: 2006-305 Slide:

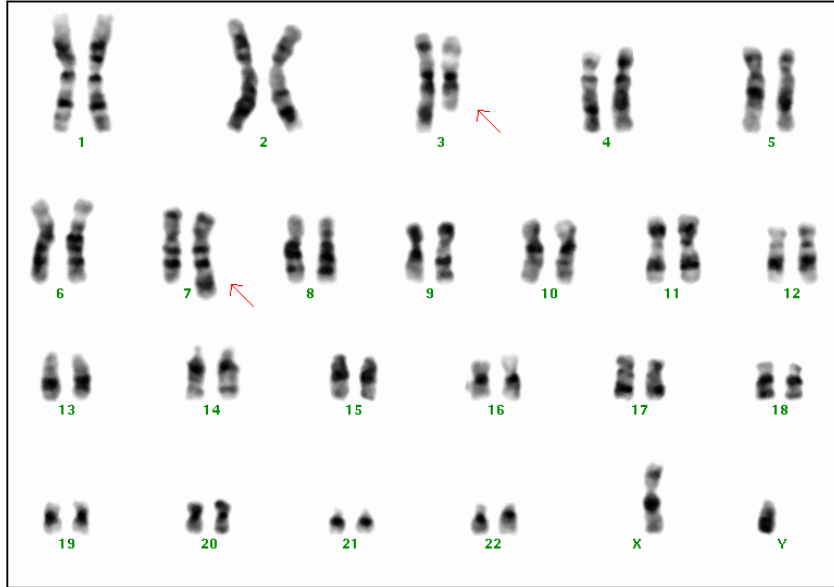
Cell: 1 Patient: B.G.

Şekil 9. 46,XY,der(5) (5pter→q35::6q21→qter), del(6)(q21→qter) kromozom kuruluşuna sahip olguya ait metafaz ve karyotip.



Case: 2006-122 Slide:

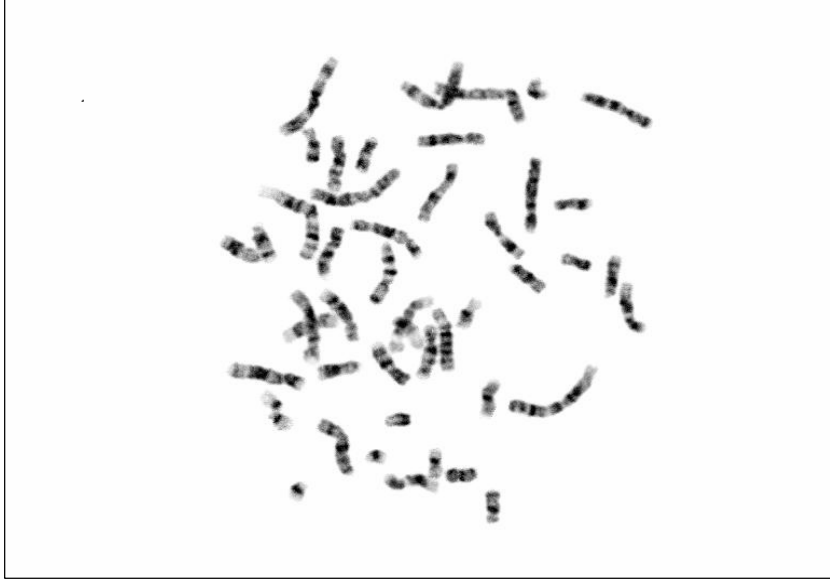
Cell: 1 Patient: A.K.



Case: 2006-122 Slide:

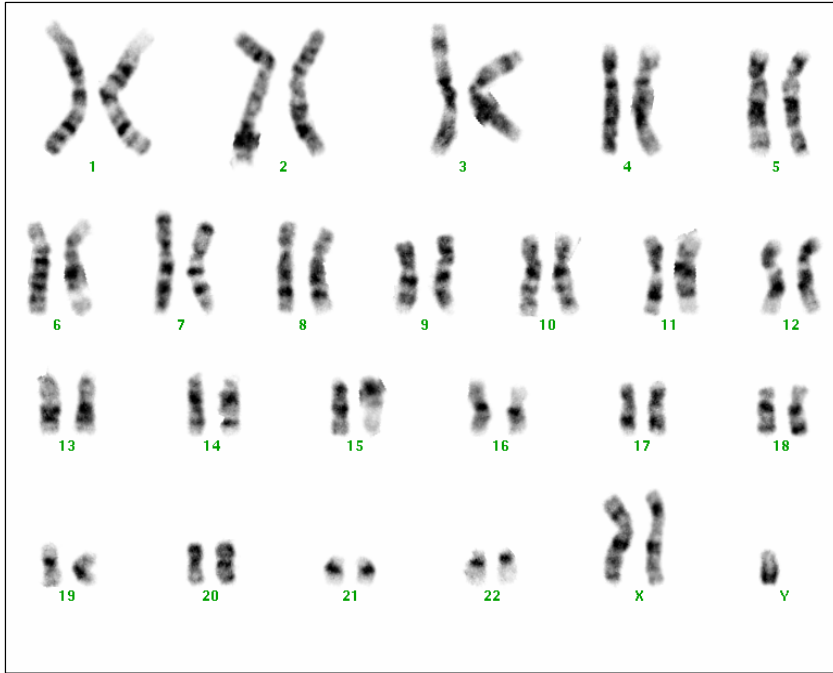
Cell: 1 Patient: A.K.

Şekil 10. 46,XY,der(7) (7pter→q36::3q24→qter), del(3)(q24→qter) kromozom kuruluşuna sahip olguya ait metafaz ve karyotip.



Case: 2006-734 Slide:

Cell: 1 Patient: A.V.T



Case: 2006-734 Slide:

Cell: 1 Patient: A.V.T

Şekil 11. Klinefelter Sendromlu (47,XXY) bir olguya ait karyotip

Kaynaklar

1. Jewelewicz R, Wallach EE 1995: Evaluation of the infertile couple. Wallach EE, Zacur HA (Ed): Reproductive Medicine and Surgery, Mosby-Year Book, Inc., St.Louis, First Ed.
2. Vicdan A. 2002: Genetic Aspects of Human Male Infertility: The Frequency of Chromosomal Abnormalities and Y-Chromosome Microdeletions in Severe Male Factor Infertility. PhD Thesis. ODTÜ. Fen Bilimleri Enst.
3. Sargin CF 2000: İnfertil Erkeklerde Y Kromozomu Üzerindeki mikrolelesyonların PCR ile Saptanması. Y.L. Tezi. Akdeniz Üni. Fen Bilimleri Enst.
4. Sargin CF, Berker-Karauzum S, Manguoglu E, Erdogru T, Karaveli S, Gulkesen KH, Baykara M, Luleci G 2004: AZF microdeletions on the Y chromosome of infertile men from Turkey. *Ann Genet*, 47: 61-68.
5. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN 2003: Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions, *Hum Reprod.*, 18(8):1660-5.
6. Pryor, J.L., Kent-First, M., Muallem, A., Van Bergen, A.H., Nolten, W.E., Meisner, L. and Roberts, K.P. 1997: Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N. Engl. J. Med.*, 336, 534–539.
7. Irvine D. 1998: Epidemiology and etiology of male infertility. *Hum Reprod* 13(suppl 1):33-44.
8. Aydos K Androloji Erkek Sağlığı Ulaşılabilirliği adres: [www.kaanaydos.net/ kord SV deferens uretra.php](http://www.kaanaydos.net/kord%20SV%20deferens%20uretra.php))
9. Cooke H.J.; Hargreave T.; Elliott D.J. 1998: Understanding the genes involved in spermatogenesis: a progress report, *Fertility and Sterility*, 69(6):989-995.
10. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barboux S, Bortoli A. 1997: Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 82, 1075-1080.

11. Kleiman, S.E., Yogev, L., Gamzu, R., Hauser, R., Botchan, A., Lessing, J.B., Paz, G., Yavetz, H. 1999: Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod* 14: 33-38.
12. Vogt PH. 1997: Genetics of idiopathic male infertility: Y chromosomal azoospermia factors (AZFa, AZFb, AZFc). Baillieres, *Clin Obstet Gynaecol.* 11(4):773-95.
13. Yoshida A, Nakahori Y, Kuroki Y, Motoyama M, Araki Y, Miura K and Shirai M 1997: Dicentric Y chromosome in an azoospermic male, *Molecular Human Reproduction*, 3: 709-712.
14. Seifer I, Amat S, Delgado-Viscogliosi P, Boucher D, Bignon YJ. 1999: Screening for microdeletions on the long arm of chromosome Y in 53 infertile men, *Int J Androl*, 22: 148-154.
15. Tse JYM, Yeung WSB, Lau EYL, Ng EHY, So WWK, Ho PC 2000: Deletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in Hong Kong Chinese men with severe male-factor infertility: controlled clinical study. *HKMJ*,6:143-6.
16. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z and Schlegel PN 2003: Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions, *Hum Reprod.*; 18, (8), 1660-1665.
17. Song NH, Wu HF, Zhang W, Zhuo ZM, Qian LX, Hua LX, Guo L, Feng NH 2005: Screening for Y chromosome microdeletions in idiopathic and nonidiopathic infertile men with varicocele and cryptorchidism. *Chin Med J (Engl)*. 118(17):1462-7.
18. Singh AR, Vrtel R, Vodicka R, Dhaifalah I, Konvalinka D, Janikova M and Santavy J 2005: Y Chromosome and Male Infertility. *Int J Hum Genet*, 5(4): 225-235.
19. Singh AR, Vrtel R, Vodicka R, Dhaifalah I, Konvalinka D, and Santavy J 2006: A Comparative Study of AZF Deletions and TSPY Gene Variation in Czech and Indian Infertile Men, *Int J Hum Genet*, 6(3): 209-217
20. Dada R, Gupta NP, and Kucheria K 2006: Cytogenetic and Molecular Analysis of Male Infertility Y Chromosome Deletion During

- Nonobstructive Azoospermia and Severe Oligozoospermia. *Cell, Biochemistry and Biophysics*, 171(44) :171–177.
21. Krausz C, Degl'Innocenti S 2006: Y chromosome and male infertility: update, *Front Biosci*,.11(1):3049-61. Review
 22. Briton-Jones C, Haines CJ. 2000: Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility. *Hong Kong Med J*, 6:184-9.
 23. Okutman-Emonts Ö. 2001: İnfertil Erkeklerde AZF Bölgelerini Kapsayan Y Kromozom Mikrodelesyon Taraması. Y.I.Tezi, Ege Üni. Fen Bil. Enst.
 24. Thangaraj K, Gupta NJ, Pavani K, Reddy AG, Subramainan S, Rani DS, Ghosh B, Chakravarty B, Singh L 2003: Y chromosome deletions in azoospermic men in India. *J Androl*. 24(4):588-97.
 25. Yıldırım M. 1999: İnsan Anatomisi.Nobel Tıp Kitapevleri Ltd.Şti. 224-229,
 26. Moudgal NR and Sairam MR 1998: Is there a true requirement for follicle stimulating hormone in promoting spermatogenesis and fertility in primates? *Hum Reprod.*; 13(4), 916-919.
 27. Erkek üreme sistemi. <http://www.medibul.com/files.php?p=pp&cid=32>
 28. İnsan üreme sistemi. Tübitak.
<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/ureme/01.swf>
 29. Nusbaum R. L., mcInnes R. R., Willard, H, F., 2005: Thompson&Thompson *Tıbbi Genetik*. Güneş Kitabevi, 167.
 30. Ma K, Mallidis C and Bhasin S 2000: The role of Y chromosome deletions in male infertility, *European Journal of Endocrinology*. 142 418–430
 31. Özgün O, Maya Tüp Bebek ve Kadın Sağlığı Merkezi ulaşılabilirliği adres; www.mayatip.com).
 32. Dubin L and Amelar RD 1971: Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 22, 469–474
 33. Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ and Thompson W 1996: A comparison of baseline and induced DNA damage in human

- spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay *Mol. Hum. Reprod.* 2: 613-619
34. Craft, I., Tsirigotis, M., Courtauld, E. and Farrer-Brown, G. 1997: Testicular needle aspiration as an alternative to biopsy for the assessment of spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 12, 1483–1487.
 35. Calleja Macias IE, Martinez Garza SG, Gallegos Rivas MC, Ortiz Lopez R, Gomez Guerra L, Barrera Saldana HA, Gutierrez Gutierrez AM. 2003: Y chromosome microdeletion identification infertile males *Ginecol Obstet Mex.* 71:25-31.
 36. Başaran N. 1996: Tıbbi Genetik. Bilim Teknik Yayınları. 101-108
 37. Quilter CR, Svennevik EC, Serhal P, Ralph D, Bahadur G, Stanhope R, Sütterlin M, Delhanty joy DA Taylor KA. 2003: Cytogenetic and Y chromosome Microdeletion screening of a random group of infertile males. *Fertility and Sterility.* 79(2): 301-307.
 38. Açıkgöz A, Öztürk U, Aşçı R. *Ulaşma adresi:*
[http://www.androloji.org.tr/file/DID_6_infertilite 8-21.pdf](http://www.androloji.org.tr/file/DID_6_infertilite%208-21.pdf)
 39. Oates, RD 2004: The genetics of male reproductive failure: What every clinician needs to know. *Sexuality, Reproduction & Menopause*, 2(4), 213-218.
 40. Xiao XS, Liu XY, Wang YQ, Zhang YH, Yang YH, Liao LB, Cai ZM 2004f: A cytogenetic and molecular genetic study on microdeletion of AZF region on Y chromosome. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 21(3):267-8.
 41. Foster JW, Graves JA 1994: An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 91: 1927-1931.
 42. Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow PN 1993: SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum Mol Genet*, 12: 2013-2018.
 43. Bachtrog D and Charlesworth B 2001: Towards a complete sequence of the human Y chromosome, *Genome Biology*, 2(5):reviews1016.1–1016.5

44. Lahn BT, Page DC 1999. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science*, 286: 964-967.
45. Lahn BT, Pearson NM, Jengalian K 2001: The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet*, 2: 207-216.
46. Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC 1996: The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet*, 14: 292-299.
47. Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Page DC 2003: Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*, 423: 873-876.
48. Graves JA 1995: The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes-an evolving understanding. *Bioessays*, 17: 311-320.
49. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC 2001: The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet*, 29: 279-286.
50. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. 2003: The malespecific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423: 825-837.
51. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo Silber SJ, Repping S 2002: Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod Update*, 8: 217-229.
52. Marshall GJA 2000: Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis- a feminist view. *Biol Reprod*, 63: 667-676.
53. Silber SJ, Repping S 2002: Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod. Update*. 8(3):217-29.

54. Genest P, Genest FB 1985: The influence of the length of the human Y chromosome on spontaneous abortions. A prospective study in family lines with inherited polymorphic Y chromosomes. *Ann Genet*, 28: 143-148.
55. Patil SR, Lubs HA 1977: A possible association of long Y chromosomes and fetal loss. *Hum Genet*, 35: 233-235.
56. Ali S, Hasnain SE 2003: Genomics of the human Y-chromosome - 1. Association with male infertility, *Gene* 321: 25-37.
57. Güler C, Şamlı M. 2003: ulaşma adresi;
<http://www.androloji.org.tr/Şle/infertilite6.pdf>
58. Bor P, Hindkjær J, Kølvrå S, Jakob H Ingerslev HJ 2002: Y-Chromosome Microdeletions and Cytogenetic Findings in Unselected ICSI Candidates at a Danish Fertility Clinic. *J Assist Reprod Genet*. 19(5):224-31.
59. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C 2003: The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men, *J Med Genet*; 40:18–24.
60. Raicu F, Popa L, Apostol P, Cimponeriu D, Dan L, Ilinca E, Dracea LL, Marinescu B, Gavrilă L. 2003: Screening for microdeletions in human Y chromosome--AZF candidate genes and male infertility. *J Cell Mol Med*. 7(1):43-8
61. Tilford CA, Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Rozen S, Brown LG, Rosenberg M, McPherson JD, Wylie K, Sekhon M, Kucaba TA, Waterston RH, Page DC 2001: A physical map of human Y chromosome. *Nature*, 409: 943-945.
62. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC 1992: The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, 258: 52-59.
63. SaoPedro SL, Fraietta R, Spaine D, Porto CS, Srougi M, Cedenho AP, Avellar MC 2003: Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of nonobstructive azoospermic and severely oligozoospermic men. *Braz J Med Biol Res*, 36: 787-793.

64. Tiepolo L, Zuffardi O 1976: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of human Y chromosome long arm, *Hum Genet*, 34: 119-124.
65. Affara N 2001: The role of the Y chromosome in male infertility, *Expert Rev. Mol. Med.*, Cambridge University Press, Cambridge, , <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/>
66. Simoni, M. 2001: Molecular diagnosis of Y chromosome micro-deletions in Europe: state-of-the-art and quality control. *Hum Reprod.*; 16, 402–409.
67. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meisner L, Chandley A, Gouchy G, Jorgensen L, Havighurst T, Grosch J 1999: 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*, 53: 27-41.
68. Kirsch S, Weiß B,. Miner TL,. Waterston RH,. Clark RA,. Eichler EE, Münch C, Schempp W and Rappold G 2005: Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome, *Genome Res.*15: 195-204.
69. Qureshi SJ, Ross AR, Ma K et al. 1996: Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol. Hum. Reprod.*, 2:775-779.
70. Tateno T, Sasagawa I, Ichianagi O, Ashida J, Nakada T, Saito H, Hiroi M 1999 : Microdeletion of the DAZ (deleted in azoospermia) gene or the YRRM (Y chromosome ribonucleic acid recognition motif) gene does not occur in patients with Klinefelter's syndrome with and without spermatogenesis, *Fertil Steril.* 71(4):746-9.
71. Şamlı H, Solak M, İmirzalıoğlu N, Şamlı MM 2005: Nonobstruktif Azoospermik ve Şiddetli Oligozoospermik Erkeklerde Saptanan Kromozomal Anomaliler, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 6: 7-11
72. Girardi SK, Mielnil A, and SCHlegel PN 1997: Submicroscopic Deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum. Reprod.* 12(8): 1635-1641.

73. Calogero AE, Garofalo MR, Barone N, Longo GA, De Palma A, Fichera M, Rappazzo G, D'Agata R, Vicari E 2002: Spontaneous transmission from a father to his son of a Y chromosome microdeletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) gene. *J Endocrinol Invest.* 25(7):631-4.
74. Komori S, Kato H, Kobayashi S, Koyama K, Isojima S 2002: Transmission of Y chromosomal microdeletions from father to son through intracytoplasmic sperm injection, *J Hum Genet.*;47(9):465-8.
75. Rolf C, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E 2002: Natural transmission of a partial AZFb deletion of the Y chromosome over three generations: case report. *Hum Reprod.* 17(9):2267-71.
76. Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, Kuroda-Kawaguchi T, de Vries JW, Oates RD, Silber S, van der Veen F, age DC, Rozen S. 2003: Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection, *Nat Genet.*35(3):247-51.
77. Vogt PH, Fernandes S J. 2003: Polymorphic DAZ gene family in polymorphic structure of AZFc locus: Artwork or functional for human spermatogenesis? *APMIS.* 111(1):115-26.
78. Katagiri Y, Neri QV, Takeuchi T, Schlegel PN, Megid WA, Kent-First M, Rosenwaks Z Palermo GD 2004: Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children. *Reprod Biomed Online.* 8(3):307-18.
79. Lynch M, Cram DS, Reilly A, O'Bryan MK, Baker HW, de Kretser DM, McLachlan RI 2005: The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility. *Mol Hum Reprod.*11(7):507-12.
80. Chandley AC 1979: The chromosomal basis of human infertility. *Br Med Bull.* 35(2):181-6.
81. Kleiman SE, Yogev L, Paz G, Yavetz H 2002: The prognostic value of the site and extent of Y chromosome microdeletions on spermatogenesis, *Harefuah.* 141(2):178-80, 222, 221.

82. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, et al. 1996: Cytogenetics of infertile men . In: Steirteghem AV, Devroey P, and Liebaers I, editors Genetics and Assisted Human Conception. *Hum Reprod*, (11) 4:1-24.
83. Chiang HS, Yeh SD, Wu CC, Huang BC, Tsai HJ, Fang CL 2004: Clinical and pathological correlation of the microdeletion of Y chromosome for the 30 patients with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Asian J Androl*. 6(4):369-75.
84. Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C 1999: Human male infertility and Y chromosome deletions: role of AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod* 14:1710-1716.
85. Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, Naseeruddin S, de Kretser DM, Baker HW, McLachlan RI, et al. 1996: Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab.*;81(4):1347-52.
86. Kim SW, KIM KD and Paick JS 1999: Microdeletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in patients with idiopathic azoospermia. *Fertility and Sterility*. 72(2): 349-353.
87. Yang Y, Zhang SZ, Peng LM, Ding XP, Lin L, Wang J. 2003: Studies on molecular epidemiology of Y chromosome azoospermia factor microdeletions in Chinese patients with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 20(5):385-9.
88. Cui XF, Xing JP, Sun JH, Zhang Z, Wang XY 2005: Analysis of Yq microdeletions in idiopathic infertile males with azoospermia and oligospermia in Shaanxi Province, *Zhonghua Nan Ke Xue*. 11(3):185-8.
89. Isidoro-Garcia M, Gonzalez-Sarmiento R, Cordero M, Garcia-Macias C, Corrales-Hernandez JJ, Miralles-Garcia JM 2005: Study of AZF regions of Y chromosome in males with idiopathic infertility. Analysis of two methods of molecular diagnosis. *Med Clin (Barc)*. 26;125(19):731-3.

90. Jia YF, Wu AH, Qiu Y, Qu JY, Song CZ 2006: Azoospermia factor microdeletions in idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia, *Zhonghua Nan Ke Xue*. 12(2):108-11
91. Zhou-Cun A, Yang Y, Zhang SZ, Zhang W, Lin L 2006: Chromosomal abnormality and Y chromosome microdeletion in Chinese patients with azoospermia or severe oligozoospermia. *Yi Chuan Xue Bao*. Feb ;33(2):111-6.
92. Gündüz GG 1992: infertil erkeklerde sitogenetik çalışmaları. Yüksek lisans Tezi. Akdeniz Üni. F.B.E. Antalya.
93. Harari O, Bourne H, Baker G, Gronow M, Johnston I. 1995: High fertilization rate with intracytoplasmic sperm injection in mosaic Klinefelter's syndrome, *Fertil Steril*. 63(1):182-4.
94. Nielsen J, Wohler M. 1991: Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from a 13 year incidence study in Aarhus. Denmark. *Hum. Genet*. 70:81-83.
95. Glander HJ 2005: Infertility in the Klinefelter syndrome, *MMW Fortschr Med*. 10;147(45):39-41.
96. Okada H, Goda K, Muto S Maruyama O, Koshida M, Horie S 2005: Four pregnancies in nonmosaic Klinefelter's syndrome using cryopreserved-thawed testicular spermatozoa. *Fertil Steril*. 84(5):1508.
97. Chioka K, Utsunomiya N, Kohei N, Ueda N, Inoue K, Terai A 2006: Adult onset of declining spermatogenesis in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril*. 2006;85(5):1511.e1-2.
98. Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN 2005: Success of testicular sperm injection and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 90(11):6263-7.
99. In't Veld PA, Halley DJ, van Hemel JO, Niermeijer MF, Dohle G, Weber RF. 1997: Genetic counselling before intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*. 16;350(9076):490.
100. Koulischer L. 1975: studies of the mitotic and meiotic chromosomes in infertile males. *J. Hum. Genet.*, 23:58-70.

101. Zuffardi, O., and Tiepolo, L. 1982: Frequencies and types of chromosome abnormalities associated with human male infertility. In genetic control, Gametic Production and Function, pp261-273, Eds PG Crosignani& BL Rubin, London: Academic pres.
102. Pandiyan N, Jequier AM. 1996: Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. *Hum Reprod.* 11(12):2604-8.
103. Kremer JA, Tuerlings JH, Meuleman EJ, Schoute F, Mariman E, Smeets DF, Hoefsloot LH, Braat DD, Merkus HM. 1997: Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum Reprod.*;12(4):687-91.
104. Tüzün C, Vicdan K, Kahraman S, Özgür S, Işık AZ, Biberoğlu K 1998: The Frequency of Chromosomal Abnormalities in Men With Azoospermia and Oligoasthenoteratozoospermia: A Preliminary Study. *Tr.J. Medical Sciences*, 28:93-95.
105. Chiang H, Wei H and Chen H 2000: Genetic screening for patients with azoospermia and severe oligo-asthenospermia. *Int.J.Androl.*, 23:20-25.
106. Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carre-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B 2001: Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod.* 16(1):82-90.
107. de Vries JW, Hoffer MJ, Repping S, Hoovers JM, Leschot NJ, van der Veen F 2002. Reduced copy number of DAZ genes in subfertile and infertile men: *Fertility and Sterility*, Volume 77, Issue 1, Pages 68-75.
108. de Vries, J.W., Repping, S., van Daalen, S.K., Korver, C.M., Leschot, N.J. and van der Veen, F. 2002b: Clinical relevance of partial AZFc deletions. *Fertil. Steril.*, 78, 1209–1214.
109. Okutman-Emonts O, Pehlivan S, Tavmergen E, Tavmergen-Goker EN, Ozkinay F. 2004: Screening of Y chromosome microdeletion which contains AZF regions in 71 Turkish azoospermic men. *Genet Couns*;15(2):199-205.

110. Wang LQ, Huang HF, Jin F, Qian YL, Cheng Q 2005: High frequency of Y chromosome microdeletions in idiopathic azoospermic men with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril.* 83(4):1050-2.
111. Foote S 1992: The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region, *Science*, 258:60-66.
112. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, et al. 1995: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene, *Nat Genet.*10(4):383-93.
113. Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, Komaki R, Tomita K, Matsushita I, Namiki M, Iwamoto T, Tamura S, Minowada S, et al. 1994: PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis, *Hum. Mol. Genet.* 3(11):1965-7.
114. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. 1996: Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome, *Lancet.* 11;347(9011):1290-3.
115. van Golde RJ, Wetzels AM, de Graaf R, Tuerlings JH, Braat DD, Kremer JA 2001: Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome, *Hum. Reprod.*,16(2):289-92.
116. Martinez MC, Bernabe MJ, Gomez E, Ballesteros A, Landeras J, Glover G, Gil-Salom M, Remohi J, Pellicer A. . 2000: Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J Androl*, 21(5):651-5.
117. Osterlund C, Segersteen E, Arver S, Pousette A 2000: Low number of Y-chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish andrology centre. *Int J Androl.* 23(4):225-9.
118. Lee DF, Castillo MB, Turek PJ, Pera RA 2000: Y chromosome deletion analysis and the DAZ genes. *Andrology 2000: Proceedings of the 1st European congress of andrology.* Collana di studi abruzzesi, L'Aquila.

119. Le Bourhis C, Siffroi JP, McElreavey K and Dadoune JP 2000: Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males *Molecular Human Reproduction*, 6(8), 688-693.
120. Cram D S, Ma K, Bhasin K, Arias J, Pandjaitan M, Chu B, Audrins P, Saunders D, Quinn F, Dekretser D and McLachlan R. 2000: Y-chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: Vertical transmission of deletions and rarity of *de novo* deletions. *Fertil. Steril.*, 74, 909 – 915.
121. Foresta, C., Ferlin, A., Garolla, A., Moro, E., Pistorello, M., Barboux, S. & Rossato, M. 1998: High frequency of welldefined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod.*;13, 302–307.
122. Kleiman S, Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Paz G Yavetz H2001: The prognostic role of the extent of Y-microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum Reprod.*; 16:399-402.
123. Chan, P. T. Mielnik, A. Cook, C. A. Liotta, D. Ye, Z. Veeck, L. L. 2000: The Prognostic Value of Y Chromosome Microdeletions Involving the AZFb Region in Testicular Sperm Extraction. *Fertility and Sterility*, 74 (3;) 94.
124. Krausz, C., Quintana-Murci, L. & McElreavey, K. 2000b: What is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod.*; 15(7), 1431–1434.
125. Kent-First M, Kol S, Muallem A, et al. 1996: The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their fathers. *Molec. Hum Reprod.*; 2:943-50.
126. Stuppia L, Mastroprimiano G, Calabrese G, Peila R, Tenaglia R, Palka G. 1996: Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermia. *Cytogenet Cell Genet.*;72(2-3):155-8.

127. Paick JS, Kim K, Kim s, et al. 1997: DNA analysis of the Y chromosome in Korean men with azoospermia by multiplex PCR. Proceedings of the VI. Int. Con.of And., Salzburg Int. *J..Androl*, 20(1):5
128. Pryor, J. L., Kent-First, M., Muallem, A., Van Bergen, A. H., Nolten, W. E., Meisner, L. & Roberts, K. P. 1997: Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New England Journal of Medicine* 336, 534–539.
129. Simoni, M., Gromoll, J., Dworniczak, B., Rolf, C., Abshagen, K., Kamischke, A. et al. 1997: Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertility Sterility* 67, 542–547.
130. Silber, S. J., Alagappan, R., Brown, L. G. & Page, D. C. 1998: Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod.*; 13, 3332–3337.
131. Krausz, C., Bussani-Mastellone, C., Granchi, S., McElreavey, K., Scarselli, G. & Forti, G. 1999a: Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing ICSI procedure. *Hum Reprod.*; 14, 1717–1721.
132. Van Landuyt L, Lissens W, Stouffs K, Tournaye H, Liebaers I, Van Steirteghem A. 2000: Validation of a simple Yq deletion screening programme in an ICSI candidate population. *Mol Hum Reprod.* 6(4):291-7.
133. Chen SU, Lien YR, Ko TM, Ho HN, Yang YS, Chang HC 2003: Genetic screening of karyotypes and azoospermic factors for infertile men who are candidates for ICSI. *Arch Androl.* 49(6):423-7.
134. Swarna M, Babu SR, Reddy PP. 2004: Y chromosome microdeletions in infertile males from Andhra Pradesh, SouthIndia. *Genet Test. Fall*; 8(3):328-35.
135. Cai ZM, Xiao XS, Liu XY, Wang YQ 2005: A genetic study on microdeletion of azoospermia factor region on Y chromosome of

- azoospermia and oligozoospermia patients, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 22(1):85-7.
136. Abdelmoula NB, Sallemi A, Chakroun N, Keskes L, Amouri A, Rebai T 2006: Evaluation of DAZ microdeletions in 34 infertile men. *Arch Androl*. 52(3):175-8.
 137. Fernando L, Gromoll J, Weerasooriya TR, Nieschlag E, Simoni M 2006: Y-chromosomal microdeletions and partial deletions of the Azoospermia Factor c (AZFc) region in normozoospermic, severe oligozoospermic and azoospermic men in Sri Lanka. *Asian Journal of Andrology*, 8(1): 39-42.
 138. Hadj-Kacem L, Hadj-Kacem H, Ayadi H, Ammar-Keskes L, Chakroun-Fki N, Rebai T, Bahloul A, Mhiri MN 2006: Screening of Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile men. *Arch Androl*. May-Jun;52(3):169-74.
 139. Song NH, Wu HF, Zhang W, Hua LX, Zhou ZM, Feng NH, Zhang J, Qiao D, Zhang JX 2006: Detection of Y chromosome microdeletions in patients with severe oligozoospermia and azoospermia, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 30;86(20):1376-80.
 140. Chang PL, Sauer MV, Brown S 1999: Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod*.; 14(11):2689-94